

## О Т З Ы В

официального оппонента о диссертационной работе

**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)

Диссертационная работа А.С. Македошина посвящена решению одной из актуальных экологических проблем, связанной с необходимостью разработки мероприятий по предотвращению коррозионных биоповреждений металлических изделий. Известно, что биологическая коррозия металлов наносит заметный ущерб различным видам оборудования в нефтегазовой промышленности, подземным коммуникациям, системам водоснабжения и водоотведения промышленных предприятий, морскому и речному флоту, гидросооружениям. В частности, около 80% коррозионных повреждений нефтепромыслового оборудования, стоимость которых несоизмерима со стоимостью самого материала, вызвано деятельностью микроорганизмов. Ключевую роль в развитии коррозионных процессов играет биологическая коррозия, вызываемая микробными ассоциациями, состоящими из различных таксономических групп бактерий, и определяемая, в первую очередь, адгезированными на поверхности металла клетками. Прогрессом в решении указанных экологических проблем является возможность использования солей тетразолия для экспресс-оценки стойкости различных сталей и контроля качества изделий, эксплуатирующихся в жидких биологически-активных средах и подверженных коррозии, индуцируемой микроорганизмами. Существующая оценка коррозионной активности бактерий по реакции солей тетразолия имеет ограничения, связанные с регистрацией отклика не всего микробного сообщества, а только её части. В этой связи диссертационная работа А.С.Македошина по выяснению причин различной восстановительной способности микроорганизмов по отношению к солям тетразолия имеет особую **актуальность**.

В исследовании, выполненном А.С.Македошиным, реализован комплексный подход, включающий определение взаимосвязи между скоростью восстановления иоднитротетразолия хлорида (ИНТ) химическими компонентами бактерий, суспензированных в физиологическом растворе, и строением клеточной стенки, определяющей диффузию реагента в клетки. К несомненным достоинствам работы относится осознание автором не только различной таксономической принадлежности бактерий и различной активности, но и наличия различной организации клеточной стенки бактерий, что осложняет установление корреляций «метаболическая активность бактерий – восстановительная способность».

## **Содержание диссертации, ее завершенность**

Диссертация изложена на 105 страницах, состоит из введения, 3 выстроенных в логической последовательности глав, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы содержит 139 источников.

Во введении обсуждается актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и задачи, научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

**В первой главе** представлен развернутый обзор и анализ литературы, который полностью соответствует предмету исследования и подробно и на современном уровне информирует о состоянии проблемы, Автор вводит основные сведения о многообразии солей тетразолия, включая подробную характеристику их строения и свойств. Далее автор описывает ступенчатые механизмы и продукты восстановления солей тетразолия, включая рассмотрение взаимосвязи между восстановлением солей тетразолия и природой клеточных доноров электронов, а также описание принципов организации электронного транспорта в клетках. А.С. Македошиным делается логичное предположение о том, что в проявлении солями тетразолия способности к восстановлению одним из факторов может быть их транспорт через клеточную стенку, периплазматическое пространство к мембранным сайтам восстановления.

Более подробно А.С.Македошин останавливается в обзоре на применении солей тетразолия в экологических исследованиях по показателю интенсивности их восстановления, указывающему на жизнеспособность микроорганизмов. Большой раздел в этом разделе главы отведен описанию метода мультисубстратного тестирования (МСТ) для подсчета живых микроорганизмов в естественном микробном сообществе с последующим их отнесением к физиологическим группам и изучением жизнеспособности клеток. Автор указывает на то, что в тесте регистрируется отклик не всего микробного сообщества, а его части, и логично заключает о важной роли диффузии солей тетразолия в клетку, что и предопределило цель настоящего диссертационного исследования. В качестве замечания к этой главе следует отметить, что глава обзора литературы не разделена на тематические разделы, тем самым затрудняя понимание ее структуры.

**В экспериментальной части** приводятся подробные сведения об использованных приборах, реактивах, методах. Дается подробная характеристика процедуры пробоподготовки питательных сред, лабораторной посуды и вспомогательного оборудования. Автор детально приводит описание последовательности и процедуры микробиологических операций для обеспечения стерильности процессов и биосинтеза микроорганизмов. Важной является часть по изучению степени биокоррозионных разрушений образцов низкоуглеродистой стали методом АСМ. Доботно и полностью описаны кинетические эксперименты. Весьма подробно и детально описаны процедуры по определению концентрации пероксида водорода в экссудате на поверхности металла, включая как

процедуру выращивания бактериальных культур на плотной питательной среде, так и способ количественного определения пероксида водорода.

**В главе «Результаты и их обсуждение»** приводятся основные результаты, полученные автором, по исследованию кинетики восстановления иоднитротетразолия хлорида химическими компонентами бактерий. В качестве особого достоинства работы следует отметить углубленное исследование роли транспорта ИНТ в клетки на эффективные кинетические характеристики восстановления тетразолия хлорида клеточными компонентами бактерий, суспензированных в физиологическом растворе путем определения зависимости начальной скорости восстановления ИНТ от исходной концентрации реагента при участии бактерий, различающихся строением клеточной стенки; от температуры и осмолярности дисперсионной среды в суспензии бактерий, с одной стороны, и использование серьезных подходов количественной обработки множества кинетических данных, с другой. Это позволило автору получить эффективные количественные кинетические характеристики восстановления ИНТ клеточными компонентами бактерий. Весьма интересным и важным результатом работы стала не только впервые установленная роль диффузии ИНТ в кинетике восстановления ИНТ клетками бактерий, суспензированных в физиологическом растворе, но и открытие о превышении скорости восстановления ИНТ в клетках грамположительных бактерий более чем на порядок по сравнению с таковым в клетках грамотрицательных бактерий. Нельзя не отметить завершающую часть главы «Результаты и их обсуждение», посвященную исследованию стимулированной бактериями-органотрофами коррозии низкоуглеродистой стали. Автором продемонстрировано хорошее владение техникой микроскопического эксперимента, которое позволило получить достоверное подтверждение активного стимулирующего воздействия грамотрицательных бактерий с низкой восстановительной способностью к ИНТ на коррозию стали.

**Наиболее значимыми результатами, определяющими новизну исследования, являются:**

Впервые методами химической кинетики показано, что на восстановление ИНТ оказывает влияние строение клеточной стенки бактерий, определяющее диффузию соли тетразолия в клетку и эффективную скорость её восстановления.

- На основании количественных кинетических характеристик сделано предположение о том, что отклик микроорганизмов на соль тетразолия может определяться соотношением в сообществе грамположительных (с высокой восстановительной способностью) и грамотрицательных (с низкой восстановительной способностью) бактерий.

- Установлена линейная зависимость начальной скорости восстановления ИНТ с участием бактерий от исходной концентрации реагента, что является критерием пассивной диффузии вещества в клетку.

- Показано, что бактерии, вне зависимости от их восстановительной способности к ИНТ, активно заселяют поверхность стали в условиях,

благоприятных для их жизнедеятельности, выделяют пероксид водорода как продукт биотрансформации кислорода и оказывают стимулирующее воздействие на коррозию низкоуглеродистой стали до сопряжения её с электрохимическими и химическими факторами.

По каждой главе и работе в целом имеются выводы, которые соответствуют целям и задачам исследования, а также положениям, выносимым на защиту.

Наиболее значимыми **следует отметить следующие выводы:**

Жизнеспособные бактерии не всегда проявляют восстановительную способность к соли тетразолия. На основе полученных автором кинетических данных в ряду жизнеспособных бактерий их восстановительная способность к ИНТ может отличаться более, чем на порядок, что напрямую зависит от организации клеточной стенки и транспорта соли тетразолия в клетку.

Определение соответствия между проявлением восстановительной способности бактерий к ИНТ и их активностью позволяет повысить объективную оценку индикаторных методов на основе солей тетразолия в решении экологических задач.

Анализ диссертации свидетельствует о высокой научной квалификации диссертанта, определившего актуальное направление исследования, выполнившего глубокий анализ современной научной литературы по изучаемой проблеме, выбравшего корректные методы изучения проблемы. Особенно следует отметить ее междисциплинарность, что потребовало от автора владения как теоретическими представлениями и методами физической химии и анализа кинетических данных, так и овладения смежной дисциплиной: техникой выполнения микробиологического эксперимента. Приведенные результаты позволяют обосновать вынесенные на защиту положения и приведенные выводы. Научная квалификация А.С. Македошина соответствует ученой степени кандидата химических наук.

**Достоверность представленных в работе результатов и обоснованность выводов** подтверждается большим количеством экспериментальных данных, обеспечивается применением независимых современных методов анализа, включая кинетические и микробиологические методы анализа, спектроскопические методы, АСМ-метод, метод сканирующей электронной микроскопии, механические испытания, потенциалом для практического использования.

Полученные автором результаты отличаются существенной научной новизной и большими перспективными исследованиями в плане их практического использования в части количественной оценки восстановительной способности бактерий-органотрофов по отношению к ИНТ, что делает возможным повышение точности индикаторных методов на основе солей тетразолия в решении целого ряда экологических проблем, включая прогнозирование и регулирование антропогенного воздействия на

экологию окружающей среды, исследование коррозионной активности бактерий-органотрофов

**К работе имеются следующие вопросы и замечания:**

1. на стр. 9 литобзора указано, что ... В слабоосновных растворах (при pH  $\approx$  10) происходит разрыв тетразольного цикла по четвертичному атому азота с образованием окрашенных формазанов. Следует отметить, что некорректно называть растворы "слабоосновными", тем более с pH 10. Это указание применяют к аминам, ионитам и т.д.
2. на стр. 48 эксп. части указывается, что перед АСМ-сканированием образцы полимера были прикреплены к образцам металлов. Не понятно о каких полимерах идет речь.
3. На стр. 57 и далее при оценке воздействия различных микроорганизмов на восстановительную способность ИНТ не указывается концентрация клеток (титр), что делает неполным сравнение степени их воздействия. Также на стр. 57 при обсуждении данных рис. 3.1a есть указание о переходе графических зависимостей в плато, и на основании последнего делается вывод о причине неполного восстановления ИНТ (см. далее). Однако на графике плато не является выраженным, что делает дискуссионным вывод о влиянии ИМФ, связанного с мембранными компонентами клетки, на доставку реагента к сайтам восстановления.
4. стр. 59: Есть ли у автора какие-нибудь предположения о причине отсутствия восстановительной способности *E.coli* (Бификол) ИНТ (стр. 59). не ясным из текста работы является также различие в восстановительной способности ИНТ бактерий *E. coli*, выделенных из препарата "Бификол", и бактерий такого же вида, выделенных из почвы.
5. Вопрос к интерпретации линейных зависимостей (на стр. 65) в биологических экспериментах как свидетельстве пассивной диффузии вещества в клетку. Означает ли это, что в какой-то момент диффузия прекращается?
6. Вывод 2 констатирует результаты и не является выводом, его следовало бы дополнить обоснованием, чем обусловлено превышение скорости восстановления ИНТ в клетках грамположительных бактерий над грамотрицательными бактериями.
7. с. 81- нет изображения СЭМ для исходного образца стали, что делает проблематичным представление исходного образца стали.
8. не все количественные параметры имеют статистические характеристики.

Указанные замечания и вопросы не носят принципиальный характер и могут рассматриваться как рекомендации к дальнейшей работе.

Диссертация апробирована на специализированных научных форумах, ее результаты опубликованы в 10 научных трудах, включая 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Полученные автором результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы. Автореферат полностью соответствует основным положениям диссертации и отражает ее содержание.

### Заключение

Представленная к защите диссертационная работа А.С.Македошина имеет целостный характер, по актуальности, научной новизне и значимости основных положений и выводов, практической полезности достигнутых результатов полностью отвечает требованиям ВАК РФ (п. 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г № 842 (с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ от 21.04.2016 г № 335): является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития физической химии и экологии – установлена роль строения клеточной стенки в кинетических характеристиках восстановления иоднитротеразолия хлорида суспензией бактерий в физиологическом растворе, выявлена одна из причин ограничения тетразолиевого индикаторного метода в экологических исследованиях. Автор работы, Македошин Александр Сергеевич, достоин присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.04 – Физическая химия (химические науки) и 03.02.08 – Экология (химические науки).

Доктор химических наук

(02.00.03- органическая химия, 02.00.04 - физическая химия),  
профессор ФГБОУ ВО "Московский авиационный институт  
(национальный исследовательский университет)»,  
кафедра "Материаловедение"

К.А. Кыдралиева

Почтовый адрес: 125993, Москва, А-80, ГСП-3, Волоколамское шоссе, д. 4;  
Телефон: +7 499 158-58-62, 158-51-35; Факс: +7 499 158-29-77;  
Электронная почта: kydralieva@biochimmash.ru

Дата 30.08.2018 г.

Подпись К.А. Кыдралиевой заверяю



*Handwritten signature in blue ink, likely belonging to the official reviewer or the author, overlapping the stamp.*