

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Ерохина Павел Сергеевича "Атомно-силовая микроскопия как инструмент определения чувствительности бактерий к факторам биотической и абиотической природы", представленной на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02. - "Биофизика"

Целью настоящего исследования являлось изучение действия различных факторов биотической и абиотической природы на морфологию и функции микроорганизмов и их сообществ (биопленок) методом атомно-силовой микроскопии, а также разработка новых алгоритмов и методических подходов для изучения поставленных задач.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) - один из методов сканирующей зондовой микроскопии, в основе которого лежит силовое взаимодействие атомов (обменное взаимодействие атомов зонда и исследуемого образца). В настоящее время благодаря трем возможным режимам работы этим методом (контактный, прерывистого контакта и бесконтактный) АСМ быстро развивается и имеет большие перспективы использования в медицине и биологии, в частности в исследовании микроорганизмов и биологических макромолекул.

Важную роль в получении хорошего изображения в АСМ играет приготовление образцов. В ряде случаев особого приготовления образцов не требуется (например, при наблюдении поверхности графита). Однако при работе с микроорганизмами, биохимическими веществами и молекулами, их обычно каким-то образом адсорбируют на подложке. В представленной работе автором обоснован выбор метода фиксации для оценки морфологии и ультраструктуры бактериальных клеток. В исследовании было проверено влияние денатурирующих и аддитивных фиксаторов на морфологию и ультраструктуру бактериальных клеток с целью выбора оптимальных методов для полноценного изучения микроорганизмов с помощью АСМ. В качестве денатурирующего фиксатора оценивали различные концентрации этилового спирта и глутарового альдегида. Оценка влияния глутарового альдегида, как аддитивного фиксатора показало, что использование 2,5% раствора для фиксации не образующих споры микроорганизмов приводит к минимальному нарушению клеточной поверхности и полному сохранению ультраструктуры клеточной поверхности, такие как пили, жгутики и другие структуры. Полученные результаты согласуются с данными зарубежных исследователей, которые отмечают, что фиксация спиртами способна разрушать липиды, формировать обширные поры в клетке и повреждать поверхностные макромолекулы бактериальной клетки, тогда как глутаровый альдегид является более мягким и оптимальным фиксатором.

Далее разработанный алгоритм, методика обработки изображений и выбранные методы фиксации диссертантом были использованы в микробиологических исследованиях с помощью комплекса методов атомно-силовой микроскопии. На примере микроорганизмов были получены биопленки, изучены их биофизические характеристики (шероховатости, силы адгезии к подложке). Для исследования формирования биопленок грамположительных (*S.aureus*) и грамотрицательных (*E.coli*) микроорганизмов автором был сформирован набор изображений на основе комплексного подхода, включающего три метода режима прерывистого контакта, методов постоянной силы, латеральных сил и модуляции силы, АСМ спектроскопии режима непрерывного контакта, с этапом совмещения изображений. Для получения дву- и трехмерных изображений бактерий были использованы полуконтактный метод и метод постоянной силы АСМ. Эти же методы АСМ автором были использованы также определения физических и геометрических параметров биопленок (средняя арифметическая и среднеквадратичная шероховатость, сила адгезии). Полученные данные свидетельствовали о неравномерном распределении клеток в сообществе (моно- или мультислои), а также наличия пептидогликана на клеточной поверхности. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, изучающих аналогичные процессы.

Обобщая необходимо отметить, что автором были изучены не только биологические процессы, но и разработаны новые алгоритмы и методические подходы, которые позволили ускорить процессы подготовки материала и прибора АСМ к биофизическим исследованиям микроорганизмов и исследованиям формирования биопленок бактериями для более глубокого понимания этих процессов.

Работа представляется актуальной и многоплановой, выполнена в полном объеме поставленных задач. Автореферат является полноценным научно-исследовательским трудом, выполненным автором на высоком научном уровне. Автореферат составлен грамотно, стилистически выдержан, содержит новую информацию. В работе использованы современные подходы и методы. Представленный материал обширен, выводы, сделанные диссертантом, соответствуют полученным результатам. Замечаний к автореферату не имеется.

Таким образом, судя по результатам, представленным в автореферате и публикациям, диссертационная работа П. С. Ерохина соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает искомой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 - Биофизика.

Руководитель группы "Биоинженерии" Института биохимии НАН РА,
старший научный сотрудник, канд. биол. наук

Г. В. Гюльханданян

Подпись Г.В. Гюльханданяна заверяю,
Ученый секретарь Института биохимии НАН РА,
доцент, канд. биол. наук

Р. Л. Айрапетян

