

## **О Т З Ы В**

**о диссертации Павла Сергеевича Ерохина**

**«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**

Диссертация Павла Сергеевича Ерохина посвящена оптимизации методики атомно-силовой микроскопии микробиологических объектов и ее использования для изучения морфологических и физиологических особенностей бактерий и их сообществ при воздействии различных биотических и абиотических факторов.

Актуальность оппонируемой работы не вызывает сомнения и определяется, на мой взгляд, следующими обстоятельствами. Развитие микробиологии, как науки изучающей строение и жизнедеятельность микроорганизмов, невозможно представить без микроскопических методов исследования. Так, именно с первым изображениями бактериальных клеток, увиденных с помощью оптического микроскопа Левенгуком в XVII веке, начался описательный этап развития микробиологии. С тех пор методы визуализации непрерывно совершенствовались, и на сегодняшний день у исследователей имеется целый арсенал всевозможного микроскопического инструментария, являющегося, однако, разновидностями двух видов микроскопов – светового и электронного. В микробиологии световая микроскопия является бесспорным лидером среди всех методов визуализации в силу доступности, относительной простоты приготовления исследуемых образцов, а также возможности изучения биологических структур в близких к природным условиям. Слабой стороной оптических приборов является ограниченная дифракционным пределом разрешающая способность. Именно поэтому ультраструктуру микроорганизмов удалось изучить и описать лишь с появлением электронной микроскопии в 40-е годы XX века. Однако, электронная микроскопия, до настоящего времени являющаяся единственным методом визуализации нанометрового разрешения, имеет целый ряд недостатков, главные из которых – сложность приготовления препаратов и необходимость проведения исследований в условиях высокого вакуума.

В 1981 г. Гердом Биннигом и Генрихом Рорером был изобретен сканирующий зондовый микроскоп (Нобелевская премия 1986 г.), в основе работы которого лежит регистрация взаимодействия, возникающего между зондом и поверхностью образца при сканировании. Результатом сканирования является цифровое трехмерное изображение поверхности изучаемых структур с нанометровым латеральным и пространственным

разрешением. В настоящее время существует целое семейство зондовых микроскопов, один из которых – атомно-силовой микроскоп (АСМ), наиболее активно используется для изучения биологических образцов микронного и субмикронного уровня организации благодаря простой процедуре пробоподготовки и возможности визуализации объектов практически в любой биологической среде. Многочисленные исследования, проводимые в течение последних десятилетий, позволили переосмыслить возможности и раскрыть новые аспекты использования АСМ. Так АСМ уже является не просто методом визуализации, а нанотехнологическим инструментом, позволяющим манипулировать отдельными атомами, исследовать межмолекулярные силы взаимодействия, а также картировать физико-химические и иные свойства поверхности отдельных молекул и микроорганизмов. Благодаря своим возможностям, АСМ может быть использована для комплексной оценки состояния бактериальных клеток в различных условиях и при действии различных экологических (токсикологических) факторов. АСМ открыла новые возможности в исследовании клеток бактерий в условиях максимально приближенных к нативным: АСМ позволяет исследовать биологические объекты без специальных фиксаторов и красителей, на воздухе или в жидкой среде.

Тем не менее, несмотря на кажущуюся простоту пробоподготовки, для получения качественного изображения с высоким пространственным разрешением целых микробных клеток, биопленок, отдельных органелл требуется подбор оптимальных режимов работы микроскопа и надлежащая подготовка образцов для исследования. Именно решению этих проблем во многом посвящена представленная на суд оппонентов и диссертационного совета работа, что и определяет, на наш взгляд, **актуальность, научную новизну и практическую значимость** диссертации Павла Сергеевича Ерохина.

Теперь позвольте перейти к содержательной части работы. Диссертация построена по классическому плану и состоит из введения, обзора литературы, раздела собственных исследований, включающего четыре главы. Далее следуют заключение, выводы, список цитируемой литературы, включающий 209 источников. Работа изложена на 126 страницах; 41 рисунок и 7 таблиц адекватно иллюстрируют текстовую часть диссертации.

Во **введении** автор обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, характеризует научную новизну и практическую значимость работы. К сожалению, в этом разделе, как и в автореферате, не указано на базе каких лабораторий выполнялись исследования и каков личный вклад автора в получение результатов.

**Глава 1** – литературный обзор – изложена на 19 страницах и разбита на две части. В обзоре литературы приводятся современные данные о возможностях применения методов



зондовой микроскопии в микробиологических исследованиях. Особое внимание уделено вопросам использования АСМ для изучения ультраструктуры микроорганизмов. Литературный обзор в полной мере вводит читателя в контекст исследований в этой области и подводит к направлению, выбранному диссертантом. Обзор, в целом, написан хорошим литературным научным языком, прозрачно и логично и служит основой для ознакомления с основной частью диссертации. Некоторое удивление вызывает отсутствие в литературном обзоре и, соответственно, в списке литературы ссылок на работы ведущих российских специалистов в области АСМ биологических объектов: групп академика И.Г. Атабекова (МГУ), проф. Б.Б. Дзантиева (Институт биохимии РАН), проф. С.Г. Игнатова (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии).

В **методической главе**, уместившейся всего на 4 страницах, автор приводит данные об использованных объектах исследования (штаммах бактерий), реактивах и оборудовании, методах статистической обработки результатов. Небольшой объем этой главы, на мой взгляд, совершенно оправдан, поскольку описание экспериментальных методик, предложенных самим диссертантом, приводится в разделах, посвященных результатам исследований и их обсуждению. К их анализу, собственно, мы и переходим.

**Глава 3** посвящена адаптации параметров АСМ-сканирования для изучения микроорганизмов и повышению качества получаемых изображений. На первом этапе работы автором были разработаны алгоритмы определения оптимальных диапазонов основных параметров сканирования бактерий методом АСМ: амплитуды и фазы колебаний кантилевера, скорости сканирования, условий взаимодействия зонда с поверхностью клеток, коэффициента усиления цепи обратной связи. После чего П.С. Ерохиным оптимизирована методика обработки АСМ-изображений бактерий программными методами. Несомненно, что для получения положительных результатов П.С. Ерохину необходимо было освоить как технические условия работы на микроскопе, так и фундаментальные биофизические принципы атомно-силовой микроскопии.

Следует с уважением отметить, что автором осуществлен очень большой объем экспериментальной работы, вследствие чего были определены оптимальные параметры условий сканирования бактериальных клеток в различных режимах микроскопирования и получения качественных изображений. По результатам этой работы были изданы методические рекомендации «Оптимизация параметров исследования микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии», которые, я надеюсь, найдут многих благодарных читателей.

Единственным несущественным замечанием к этой главе является некоторое злоупотребление автором английскими терминами, имеющими полные русскоязычные аналоги: амплитуда, фаза, частота, рабочая точка, усиление и др.

**Глава 4** посвящена разработке условий подготовки микроорганизмов к АСМ-сканированию. В качестве количественных показателей влияния фиксаторов на клетки совершенно обосновано были использованы отношения ширина/высота клетки и показатель шероховатости клеточной поверхности (стандартное отклонение всех значений высот в пределах выбранной области). Диссертантом были опробованы различные методы фиксации образцов бактериальных клеток и определены оптимальные параметры подготовки проб с использованием глутарового альдегида. Опять следует отметить весьма большой объем экспериментальных исследований, результаты которых нашли отражение в методических указаниях «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I-IV групп патогенности», утвержденных главным государственным санитарным врачом Российской Федерации.

Заключительная **5 глава** диссертации посвящена изучению морфо-функциональной реакции бактерий на различные воздействия методами АСМ. С помощью оптимизированных схем АСМ-исследования и пробоподготовки, разработанных автором на начальных этапах работы, диссертант оценил уровень цитотоксичности антибиотика цефазолина по отношению к кишечной палочке и стафилококку, а также изменения морфологии бактериальных клеток в условиях экстремально низких или высоких показателей кислотности среды. Кроме того, автор получил приоритетные данные о морфологических и структурных изменениях поверхности микроорганизмов и силе адгезии клеток к подложке на начальных этапах формирования биопленки.

В разделе «**Заключение**» диссертации суммируются полученные результаты и предлагаются шесть вполне обоснованных выводов из проведенного исследования. В целом, диссертация написана грамотно (хотя встречаются некоторые стилистические погрешности), ясно и логично, очень хорошо проиллюстрирована. Автореферат диссертации полностью отражает ее основные положения.

Переходя к итоговой оценке диссертации, хочу подчеркнуть, что высказанные в отзыве некоторые критические замечания не касаются сути исследования и в существенной степени могут рассматриваться как пожелания автору.

Таким образом, можно констатировать, что диссертационная работа Павла Сергеевича Ерохина, успешно сочетающая как фундаментальное, так и прикладное направление, выполнена на весьма высоком методическом уровне. Полученные экспериментальные



данные интерпретированы на основе тщательного осмысления литературного материала и представляют безусловный интерес для широкого круга исследователей и практиков в области биофизики, микробиологии, биотехнологии и микроскопии. Не вызывают сомнения ни научная, ни, особенно, методическая значимость работы. Материалы диссертации достаточно широко представлены в печати, в материалах международных и российских конференций (22 работы).

Изложенное выше дает основание заключить, что диссертационная работа «Атомно-силовая микроскопия как инструмент определения чувствительности бактерий к факторам биотической и абиотической природы» представляет собой целостное оригинальное экспериментальное исследование, которое по актуальности, достоверности, научной и практической значимости соответствует критериям, предъявляемым к кандидатской диссертации «Положением о присуждении ученых степеней» (п. 9), утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор Павел Сергеевич Ерохин заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории иммунохимии  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института биохимии и физиологии  
растений и микроорганизмов  
Российской академии наук  
доктор биологических наук  
старший научный сотрудник

Л.А. Дыкман

E-mail: dykman@ibppm.sgu.ru

410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, 13

Тел.: +7(8452)970403

Подпись Л.А. Дыкмана «ЗАВЕРЯЮ»  
Ученый секретарь ИБФРМ РАН, к.б.н.



Т.Е. Пылаев

31.03.2015 г.