



Утверждаю

Ректор ФГБОУ ВО РГАТУ

Н.В. Бышов

02 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А.Костычева» (ФГБОУ ВО РГАТУ) на диссертационную работу Гусева Александра Анатольевича «Экотоксикологические характеристики высокодисперсного кристаллического углерода», представленную в диссертационный совет Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биологические науки)

Рецензируемая диссертационная работа представляет собой большое законченное исследование, изложенное на 239 страницах. Работа посвящена оценке экотоксикологических эффектов, оказываемых наноструктурным углеродным материалом (МУНТ) на представителей разных систематических групп, включая микроорганизмы, высшие растения и млекопитающих.

Актуальность диссертационного исследования А.А. Гусева не вызывает сомнений, т.к. углеродные наноматериалы, в частности углеродные нанотрубки, являются перспективным материалом для высокоэффективных адсорбентов, структурных модификаторов конструкционных материалов, добавок в смазочные композиции, лаки и краски, элементов радиоэлектроники, а также для биологических и медицинских применений. Поскольку в результате широкого промышленного использования углеродные наноматериалы могут попасть в окружающую среду и вступить в природный круговорот, необходимы тщательные исследования всех возможных последствий взаимодействия их с живыми системами.

Диссертация построена классическим образом и включает в себя введение, обзор литературы, отражающий современное состояние исследований, методической и нормативно-правовой базы в области безопасности углеродных наноматериалов, главу «Материал и методы

исследований», а также главы отражающие результаты проведенных исследований, включая моделирование, оценку влияния МУНТ на бактерий, гидробионтов, высшие растения и млекопитающих. Итоги исследования отражены в восьми выводах.

Во **введении** диссертации отражены все необходимые пункты. Значимость и необходимость проведенного исследования отражены в разделе «Актуальность». Диссертантом четко и грамотно сформулирована цель исследования и поставлены соответствующие цели задачи:

1. Оценить валидность метода концептуального моделирования экологических рисков для определения степени потенциальной опасности МУНТ.

2. Разработать методический комплекс по анализу содержания наночастиц (на примере МУНТ) в природных средах и созданию коллоидных систем на их основе для обеспечения эколого-биологических исследований.

3. Выявить закономерности морфофизиологических реакций организмов различных эколого-функциональных групп на воздействие коллоидных водных растворов МУНТ.

4. Установить возможность проникновения и биоаккумуляции МУНТ в тканях высших растений, оценить возникающие при этом биохимические и морфофизиологические эффекты.

5. Определить характеристики острого и субхронического воздействия МУНТ на млекопитающих.

6. Выявить особенности экологических эффектов кристаллических и аморфных углеродных наноматериалов на примере МУНТ и сажи.

7. Определить параметры экологической безопасности МУНТ, а также выявить тест-объекты и тест-функции для разработки норм воздействия МУНТ на живые организмы.

Научная новизна, практическая и теоретическая значимость исследования подтверждается полученными результатами, в частности Гусевым А.А.:

- разработана методология экологической оценки МУНТ, включая применение средств объективного контроля их содержания в средах, а также экспериментальная модель поступления МУНТ в биообъекты посредством создания водных суспензий;

- впервые методом концептуального моделирования оценен уровень потенциальной опасности МУНТ;

- разработана и проведена комплексная оценка эколого-биологических эффектов МУНТ с использованием представителей различных эколого-функциональных групп организмов;

- показаны различия в биологических эффектах, связанные с особенностями структуры углеродных материалов на примере сажи (технического углерода по ГОСТ 7885-86) и МУНТ;

- созданы научно-методические основы для определения пределов толерантности биообъектов по отношению к МУНТ и разработки экологически обоснованных норм их содержания в средах.

Большинство предлагаемых методов является экспрессными и доступными широкому кругу исследователей, что обуславливает практическую значимость работы.

В ходе работ диссертантом были зарегистрированы объекты интеллектуальной собственности:

- база данных «Биобезопасность наноматериалов» (свид. № 2011620488 от 29.06.2011 г.)

- ноу-хау «Способ ультразвуковой обработки многокомпонентных смесей» (свид. №2012-0002 от 17.09.2012 г.),

- ноу-хау «Способ приготовления водных суспензий высокодисперсных материалов с использованием ультразвуковой обработки» (свид. №2013-0002 от 19.06.2013 г.).

Результаты исследований используются в учебном процессе в ТГУ имени Г.Р. Державина по дисциплинам «Биоиндикация окружающей среды», «Расчёты и прогнозирование в экологии», «Экологическая токсикология», «Техногенные системы и экологический риск» у студентов специальности «Экология и природопользование». Разработаны учебно-методический комплекс «Токсикологическое влияние наночастиц на здоровье млекопитающих» и учебное пособие «Безопасность наноматериалов».

Высокий уровень диссертационного исследования показывает то, что его результаты использовались при выполнении финансируемых НИР: «Исследование цитотоксического эффекта многостенных углеродных нанотрубок на тест-объектах различных систематических групп» – № 11 208, 2010-2011 (Минобрнауки); «Изучение механизмов физиологических реакций репродуктивной системы животных и растений на воздействия нового ксенобиотика – многостенных углеродных нанотрубок» – № 16.740.11.01-94, 2010-2012 (Минобрнауки); «TEMPUS-RUDECO Профессиональная подготовка для устойчивого развития сельских территорий и экологии» – № 159357-TEMPUS-1-2009-1-DE-TEMPUS-JPHES, 2010-2013 (Европейский Союз); «Анализ правовых норм обеспечения и контроля безопасности

производства и продукции наноиндустрии, используемых в международной практике» – № 16.648.11.3001, 2011 (Минобрнауки); «Состояние дисперсной фазы в водных суспензиях нанопорошков для разработки методик тестирования наноматериалов в физиологических жидкостях» № 07-03/2012, 2012 (III Межвузовский конкурс исследовательских проектов НИ ТПУ); «Разработка методики экологически чистой молекулярно-клеточной фитоконверсии компонентов шламов металлургической индустрии» № 14.512.12.0002, 2013 (Минобрнауки); «Разработка антибактериальных покрытий на основе углеродных наноматериалов» – №09-25/25МУ-13, 2013 (Управление образования и науки Тамбовской области); №14-08-06824 мол_г_1, 2014 «Научный проект организации и проведения II Всероссийского конкурса научных докладов студентов «Функциональные материалы: разработка, исследование, применение» (РФФИ); №15-34-10118 мол_г_1, 2015 «Проект организации и проведения III Международной молодежной научно-практической конференции «Междисциплинарные проблемы нанотехнологий, биомедицины и нанотоксикологии»» (РФФИ); государственное задание на выполнение проекта № 37.901.2014 (Минобрнауки), грант № 8.2.57.2015 (программа «Научный фонд им. Д.И. Менделеева Томского государственного университета», 2016); №16-38-10174 мол_г, 2016 «Проект организации конкурса научных докладов молодых ученых «Функциональные наноматериалы в биомедицине» в рамках IV Международной научно-практической конференции «Наноматериалы и живые системы»» (РФФИ) и др.

Практическое применение результатов исследований выразилось в разработке внедренных в производство рекомендаций, исключающих попадание МУНТ на слизистые оболочки персонала, задействованного при исследовании, производстве, хранении, транспортировке и утилизации УНМ (Акт о внедрении от 21.04.2014).

Работа была доложена и обсуждена на многочисленных российских и международных научных мероприятиях.

По теме диссертации опубликовано 49 статей и 2 учебно-методических пособия.

Положения, выносимые на защиту, являются правомерными и обоснованными.

Обзор литературы включает в себя разбор большого количества источников по тематике исследования и состоит из нескольких разделов. В данной главе приведена краткая характеристика нанотехнологий и наноматериалов, обоснована необходимость проведения исследований по

оценке безопасности углеродных наночастиц, описаны возможные источники поступления наночастиц в окружающую среду, их миграция и экологические эффекты наночастиц, а также дан критический анализ результатов полученных другими авторами с выявлением пробелов имеющихся в сфере безопасности углеродных наноматериалов. Кроме того в литературном обзоре описана нормативно-правовая база в области безопасности нанотехнологий, включающая как российские, так и зарубежные документы.

В главе 2 «Материал и методы исследований» подробно охарактеризован исследуемый наноматериал (МУНТ марки «Таунит»). Важно отметить, что данный материал производится крупнотоннажно (ООО «НаноТехЦентр», г. Тамбов), что ещё раз показывает значимость проведенного исследования. В главе прописаны методики исследования, включая электронно-микроскопические исследования МУНТ, определение концентрации наночастиц в атмосфере, получение водных дисперсий на основе многостенных углеродных нанотрубок. Приведено концептуальное моделирование уровня потенциальной опасности наноматериала, оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок на выживаемость бактерий *E. coli* и *B. Cereus*, оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок по интенсивности гашения биоломинесценции бактерий *E. coli* M-17, оценка экотоксичности многостенных углеродных нанотрубок по выживаемости цериодафний *C. affinis*, оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок по выживаемости микроскопических зеленых водорослей *Sc. quadricauda*, оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок по выживаемости и цитогенетическим эффектам личинок насекомых *Ch. riparius*, оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок на высшие растения, оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок на организм млекопитающих.

Необходимо отметить, что использование диссертантом современных, обоснованных методов и высокотехнологичного оборудования подтверждает достоверность полученных результатов и высокий уровень работы.

В главе 3 показаны результаты исследования микроструктуры исходных образцов МУНТ проводимого с помощью электронной микроскопии. Применение методов просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии позволило автору идентифицировать исследуемый материал как МУНТ и описать его важнейшие структурные характеристики, что позволило из 8-ми образцов различных партий отобрать для дальнейших

исследований 2 образца МУНТ: 1- нанотрубки, имеющие среднее значение внешнего диаметра 28 нм и 2 – с внешним диаметром 15 нм.

Исследование содержания МУНТ в зоне производства показало, что наночастицы способны переходить в состояние аэрозолей.

Важной научно-методической задачей, решенной на данном этапе, было создание однородных водных суспензий наночастиц для последующих экотоксикологических исследований, с учетом их гидрофобности и склонности к агрегации, т.к. образование агрегатов наночастиц в коллоидных системах может существенным образом влиять на их токсичность. Диссертантом был использован способ ультразвуковой обработки суспензии, что позволило не использовать стабилизатор и избежать синергетических эффектов. Эффективность метода диспергирования определялась по скорости агрегации и седиментации суспензий. По результатам экспериментальных исследований свойств полученных суспензий наноматериала автором установлено, что в водных суспензиях наиболее легко диспергируются углеродные нанотрубки с меньшим диаметром и большей удельной поверхностью, поэтому для дальнейших исследований был выбран второй образец нанотрубок (средний диаметр -15 нм).

В главе 4 проведена оценка степени потенциальной опасности многостенных углеродных нанотрубок методом концептуального моделирования. Моделирование широко применяется в различных отраслях науки и является важным этапом оценки воздействия наноматериалов на живые системы. Для разработки модели автором было проанализировано большое количество статей, обзоров, мета-исследований и нормативно-методических документов о свойствах МУНТ, влияющих на их потенциальную опасность. Классификация и систематизация данных позволила диссертанту выделить важнейшие характеристики наноматериалов влияющие на оказываемые ими экотоксикологические эффекты, эти особенности наноматериалов вошли в состав модели. Моделирование уровня потенциальной опасности наноматериалов проведено путем создания генеральных определительных таблиц, в результате анализа функциональных блоков модели определены итоговая оценка опасности D и мера неопределенности U.

Глава 5 демонстрирует результаты исследования влияния МУНТ на микроорганизмы. В качестве тест-объектов автором использовались бактерии *E. Coli* и *B. Cereus*, биосенсор «Эколюм» (*E. coli* M-17),

одноклеточные зеленые водоросли *Sc. Quadricauda*, цериодафнии *C. Affinis*, личинки комаров *Ch. riparius*. Расчеты полулетальных и безвредных концентраций показали, что наименее чувствительными к действию МУНТ являются личинки *Ch. riparius* и цериодафнии *C. affinis*, а максимальная рефлексия установлена для бактерий и водорослей. Наибольший токсический эффект был отмечен для *E. coli* М-17. Относительно *Ch. riparius* отмечены выраженные цитогенетические эффекты. Согласно результатам биотестирования МУНТ относятся к умеренно опасным веществам. Это соответствует классу опасности такого высокодисперсного углеродного материала, как сажа. Полученные диссертантом результаты могут позволить сделать выводы о воздействии МУНТ на эффективность процессов биодеструкции и функционирования водных экосистем, а также могут быть учтены при разработке норм безопасности при производстве, хранении, транспортировке, эксплуатации и утилизации продукции, содержащей УНМ. Таким образом, использованные в данной главе методы, за исключением показавших нелинейные концентрационные эффекты тестов на бактериях *E. coli* и *B. cereus* и теста на выживаемость *Ch. riparius*, проявившего низкую чувствительность, вполне применимы для проведения экологической экспресс-оценки углеродных наноматериалов.

В главе 6 А.А. Гусевым исследовалось влияние МУНТ на высшие растения по морфометрическим и биохимическим параметрам, с учетом возможной биоаккумуляции нанотрубок в тканях растений. Растения являются важным звеном трофической цепи, вследствие чего очевидно их использование как тест-объекта в экотоксикологическом исследовании. В данной работе оценивалось влияние МУНТ на процессы раннего онтогенеза *O. arenaria*.

Результаты свидетельствуют о негативном влиянии МУНТ на процессы прорастания семян, в тоже время было отмечено положительное влияние на прирост корней (до 76,7%) при разнонаправленном действии МУНТ на развитие стеблей.

Анализ биохимического статуса проростков показал преимущественное снижение активности каталазы и пероксидазы под действием наноматериала, что возможно связано с возникновением окислительного стресса. Данные, полученные диссертантом, согласуются с результатами других авторов, рассматривающих окислительный стресс, как возможный механизм токсичности наночастиц. Также результаты биохимического исследования показали, что наличие МУНТ в среде прорастания семян оказывает значительный эффект на концентрацию

фитогормонов в проростках *O. arenaria* – при добавлении нанотрубок в культивационную среду значительно увеличилась концентрация индолилуксусной кислоты и гиббереллинов, а концентрация цитокининов значительно уменьшилась. Рост концентрации «стрессового» гормона растений – абсцизовой кислоты свидетельствует об угнетающем действии МУНТ.

В ходе эксперимента автором было отмечено потемнение корней, стеблей и листьев проростков в присутствии МУНТ. Анализ тотальных препаратов проростков с помощью световой микроскопии показал, что конгломераты темно-серого и черного цвета локализируются как на поверхности корней проростков, так и во внутренних зонах корней, стеблей и листьев, присутствуют в клетках и межклеточном пространстве. Применение ПЭМ установило, что в вариантах 100 и 1000 мг/л имело место массовое образование конгломератов из МУНТ и, вероятно, графитизированного углерода в тканях корня и листа. Результаты работы однозначно подтверждают факт фитоаккумуляции МУНТ, что представляет интерес как с позиций экологической безопасности, так и для таких отраслей, как растениеводство и биотехнологии, поскольку на базе углеродных наночастиц могут быть созданы эффективные наноконтейнеры для доставки разнообразных молекул в клетки растений. Тот факт, что повышенная концентрация МУНТ наблюдалась в районе устьиц, указывает на важную роль процесса транспирации в бионакоплении наночастиц. Отмеченная автором способность МУНТ к проникновению и биоаккумуляции в растениях указывает на высокую потенциальную опасность данного материала и подтверждает результаты проведенного моделирования.

В седьмой главе диссертационного исследования А.А. Гусевым проведен анализ патофизиологических, гистологических и репродуктивных эффектов многостенных углеродных нанотрубок на лабораторных мышах. Одно из основных направлений современной экотоксикологии напрямую связано с исследованием патологических изменений организма при острых и хронических токсических воздействиях. Большую помощь в изучении механизмов развития морфофункциональных осложнений острой и хронической интоксикации могут оказать эксперименты на лабораторных животных, среди которых наиболее распространенными в экотоксикологических исследованиях являются грызуны. В связи с чем выбор лабораторных мышей в качестве тест-объекта в данном исследовании является оправданным и целесообразным.

Результаты исследования показали, что в ходе острого и подострого экспериментов не зафиксировано случаев гибели животных ни в одной из групп. Отклонений в общем состоянии животных не отмечено, за исключением незначительных нарушений двигательной активности экспериментальных особей, получавших МУНТ в максимальной дозе в подостром эксперименте. Гистологические исследования висцеральных органов мышей в остром эксперименте, в т.ч. печени, почек, селезенки, легкого и семенников никаких патологических изменений не выявили. В ходе подострого эксперимента автором установлено, что исследованные МУНТ в среднесуточной дозировке 30 мг/кг приводит к гипотрофии печени. Выявлено негативное дозозависимое воздействие на структуру печени, почек и лёгких, приводящее к нарушению кровообращения вплоть до кровоизлияний, появлению многочисленных лимфоидно-гистиоцитарных инфильтратов, активизации макрофагальной системы. Схожие эффекты отмечались разными авторами при проведении экспериментов с другими типами наночастиц. Использование просвечивающей электронной микроскопии для поиска мест локализации МУНТ в тканях сердца, легких, пищевода, желудка, кишечника, печени, почек, тимуса, селезенки, семенников не дало результатов, что диссертант связывает с возможной биодegradацией нанотрубок под действием каталитически активных пероксидаз.

Цитогистологический анализ семенников мышей с расчетом индекса сперматогенеза отклонений у животных экспериментальных групп не выявил.

В ходе определения уровня кортикостерона в плазме крови самцов мышей было выявлено снижение исследуемого показателя относительно показателей контрольной группы, что свидетельствует о выраженной адаптивной реакции. Также было зафиксировано снижение уровня свободного тестостерона в плазме крови самцов мышей группы получавшей максимальную дозировку МУНТ (30 мг/кг).

Важной проблемой экологической оценки МУНТ является определение их репродуктивных эффектов. Несмотря на то, что токсичность МУНТ по отношению к самцам, самкам и эмбрионам мышей ранее изучалась однозначных выводов о наличии или отсутствии репродуктивной токсичности сделано не было. А.А. Гусевым было проанализировано количество и качество потомства самцов каждой из групп, а также произведен расчет их оплодотворяющей способности. Результаты исследования оплодотворяющей способности мышей показали дозозависимый угнетающий эффект во всех экспериментальных группах.

Полученные в данной главе выводы могут быть использованы при разработке научно-обоснованных норм содержания МУНТ в природных средах, а также техногенных отходах.

В заключительной, **восьмой главе** А.А. Гусевым был проведен анализ полученных в предыдущих разделах теоретических и экспериментальных результатов, на основании которого определены тест-объекты и тест-функции организмов, применимые для разработки экологически обоснованных норм воздействия МУНТ на биообъекты, что соответствует одной из задач диссертационного исследования.

В целом, диссертационная работа А.А. Гусева производит очень благоприятное впечатление, однако, можно выделить следующие недостатки и вопросы.

1. В диссертации и автореферате имеется ряд технических ошибок и опечаток, например, в таблице 1 автореферата нарушен порядок нумерации разделов.

2. При исследовании углеродного наноструктурного материала помимо метода электронной микроскопии можно было использовать метод рамановской спектроскопии, который позволяет однозначно установить наличие специфической кристаллической структуры.

3. Использованный для анализа суспензий МУНТ метод динамического светорассеяния в большей степени подходит для исследования частиц сферической формы.

4. С чем связана разница в эффектах воздействия МУНТ, отмеченная для бактерий *E. coli* и *B. cereus*?

5. Может ли обнаруженная в работе биоаккумуляция МУНТ в растениях привести к передаче их по пищевым цепям? Ставились или планировались ли соответствующие эксперименты?

6. С чем связан рост концентрации абсцизовой кислоты в тканях растений в группе «МУНТ 1 г/л» и последующее ее снижение в группе «МУНТ 10 г/л»?

7. Чем обусловлен выбор поиска мест локализации МУНТ в организме мышей (сердце, легкие, пищевод, желудок, кишечник, печень, почки, тимус, селезенка, семенники)?

Данные замечания носят не принципиальный характер и не снижают качества диссертационной работы.

В целом диссертационная работа представляет собой законченное научное исследование, характеризующееся актуальностью, новизной и практической значимостью. Работа А. А. Гусева является уникальной,

производит очень хорошее впечатление, выполнена на необходимом методическом уровне и заслуживает высокой оценки.

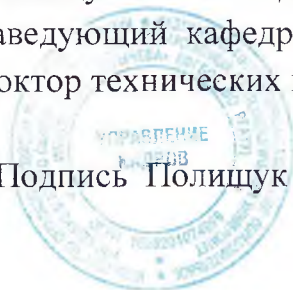
Диссертация «Экотоксикологические характеристики высокодисперсного кристаллического углерода», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки), является законченной научно-квалификационной работой, имеет существенное значение для биологии, полностью соответствует требованиям п. 9 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, а ее автор, Гусев Александр Анатольевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).

Отзыв на диссертацию обсужден и одобрен на расширенном заседании кафедры химии ФГБОУ ВО РГАТУ, протокол № 6 от 14 февраля 2017 г.

Отзыв составил:

Полищук Светлана Дмитриевна
заведующий кафедрой химии,
доктор технических наук, профессор

Подпись Полищук С. Д. заверяю



Лав. Ч.К.

Prof. E. V. Serebrennikov

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А.Костычева» (ФГБОУ ВО РГАТУ).

Почтовый адрес: 390044, г.Рязань, ул.Костычева д.1.

Телефон: 8(4912)35-88-31

E-mail: university@rgatu.ru

Сайт учреждения: www.rgatu.ru