

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Ахмеда Абдуллаха Хасана Ахмеда «Роль ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути в адаптивной реакции бактериального метаболизма *Sphaerotilus natans* при разных типах питания», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 — биохимия

Для очистки сточных вод используются биотехнологические системы, основой которых является активированный ил. Одной из основных эксплуатационных проблем таких систем является чрезмерный рост нитчатых бактерий. Такое зарастание системы приводит к ухудшению массообменных характеристик и, как результат, снижению эффективности очистки. *Sphaerotilus natans*, относящиеся к классу β -протеобактерий, считаются первичными организмами, которые вызывают зарастание.

Эта бактерия наряду со способностью к хемогетеротрофному росту обладает и диссимильаторным серным метаболизмом, позволяющим отдельным представителям расти в хемолитоавтотрофных условиях. Знание углеродного метаболизма и его связи с серным метаболизмом позволит в итоге разрабатывать специальные меры по снижению зарастания систем очистки.

Способность к литотрофии в присутствии восстановленных соединений серы часто проявляется у *S. natans* в микроаэробных условиях. В связи с этим изучение основных ферментов серного метаболизма, цикла Кребса и глиоксилатного шунта при разных уровнях обеспеченности кислородом в присутствии восстановленных соединений серы или без них является чрезвычайно актуальной задачей.

Целью диссертационной работы Ахмеда Абдуллаха Хасана Ахмеда являлось исследование активности, изоферментного состава и экспрессионной регуляции ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного шунта в бактериях *S. natans* при росте в хемоорганотрофных условиях и при частичной реализации литоорганотрофного роста. Для достижения поставленной цели диссертант поставил 8 задач, в которые входило:

- С помощью различных условий кислородного снабжения и смены типов питания культур смоделировать условия, при которых активируются некоторые участки метаболизма, присущие росту в хемолитотрофных условиях;

- Изучить изменение активности и изоферментного состава ключевых ферментов ЦТК, глиоксилатного пути и глюконеогенеза: аконитатгидратазы, сукцинатдегидрогеназы и изоцитратлиазы у бактерий *S. natans* при смене условий кислородного культивирования и типа питания.

- Исследовать уровень экспрессии *icl*-, *sdh*-, и *aco*-транскриптов в разных штаммах *S. natans* при росте в хемоорганотрофных и модельных условиях.

- Получить высокоочищенные препараты разных форм аконитазы и сукцинатдегидрогеназы и определить K_m и pH-оптимум для их сравнительной характеристики

- Предложить гипотетическую схему трансформации углеродного метаболизма в бактериях *S. natans* при смене условий культивирования и типов питания.

Научная новизна. Установлено, что у бактерий *S. natans* в условиях, моделирующих включение хемолитогетеротрофного метаболизма, индуцируется глиоксилатный цикл. Об этом свидетельствует появление высокой активности изоцитратлиазы и высокий уровень транскриптов *icl*. Увеличение активности сукцинатдегидрогеназы и аконитазы в этих же условиях сопровождалось индукцией дополнительных изоформ этих ферментов и возрастанием концентрации транскриптов их генов *aco* и *sdh*.

Практическая значимость. Результаты диссертационной работы расширяют и углубляют знания о роли ключевых ферментов цикла Кребса, глиоксилатного пути и глюконеогенеза в адаптивной реакции бактериального метаболизма разных штаммов *S. natans* при переходе с органотрофных на литогетеротрофные условия роста.

Материалы диссертации, судя о диссертации, используются в учебном процессе на медико-биологическом факультете Воронежского госуниверситета при чтении лекций по биохимии, микробиологии, а также спецкурсах «Молекулярная биология», «Энзимология» и др. Полученные результаты применяются при проведении практикумов и выполнении курсовых, бакалаврских и магистерских работ.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка опубликованных работ и цитируемой литературы.

Обзор литературы содержит 5 разделов, в которых описаны особенности серного метаболизма *S. natans*, особенности регуляции сукцинатдегидрогеназы, изоцитратлиазы и аконитазы, а также молекулярные аспекты функционирования ферментов цикла Кребса и глиоксилатного цикла.

В целом литературный обзор охватывает необходимый и достаточный для понимания проблемы круг вопросов.

Материалы и методы, результаты и их обсуждение объединены в диссертации в раздел «Экспериментальная часть». Материалы и методы включают все использованные в работе методы, начиная от культивирования микроорганизмов и проведением экспериментов с растущими культурами, проходя через выявление разных

изоформ ферментов, их выделение, и завершая анализом транскриптов исследуемых ферментов. С точки зрения оппонента все необходимые методы (за исключением ИК-спектроскопии) описаны, причем сделано это с достаточной подробностью. Чтение данного раздела приводит читателя к выводу о широком спектре используемых микробиологических, биохимических и молекулярно-биологических подходов, что свидетельствует о высоком уровне подготовленности диссертанта

Раздел **Результаты и обсуждение** последовательно описывает ход проводимых исследований, начиная с отработки модельных условий, имитирующих хемолитогетеротрофию в условиях миксотрофии. Выбор штаммов для исследований оказался очень удачным и позволил найти модельные условия для тех штаммов, которые способны к литотрофии и в дальнейшем сравнить их адаптационный потенциал со штаммом, не способным к литотрофии.

Подобранные модельные условия активно использованы в дальнейших сравнительных исследованиях активности сукцинатдегидрогеназы, аконитазы и изоцитратлиазы у двух штаммов (D-501 и D507) и показано, что активность этих ферментов возрастает в модельных условиях. При этом возрастает и уровень транскриптов генов, кодирующих эти ферменты. Более того, показано, что в модельных условиях появляются и изоформы ферментов, что автор увязывает с изменениями направленности метаболизма.

В целом результаты представлены понятно, с достаточной степенью подробности и логично направлены на достижение поставленной цели. Полученные результаты являются **достоверными**. Обсуждение приведено одновременно с описанием результатов и выглядит логично. В качестве вывода из анализа результатов и литературных данных автор предлагает гипотетическую схему изменения углеродного метаболизма при переходе культур от гетеротрофного типа питания к литогетеротрофному. В виде полемики, а не замечания, хотелось бы отметить, что эта схема основана на экспериментальных данных, но не является единственной. Так например, в литотрофных условиях наряду с глиоксилатным циклом возможно функционирование и цикла Кребса. Повышенная активность изоцитратлиазы в этих условиях может быть связана с возросшей потребностью клеток в восполнении пула шавелевоуксусной кислоты вследствие повышенного отбора интермедиатов цикла Кребса для анаболизма. Об этом может свидетельствовать повышенная в модельных условиях скорость роста культур. Другой причиной возрастания роли глиоксилатного шунта может стать и лимитирование культур кислородом в модельных условиях. В этих условиях у культур может возникнуть проблема сброса избытка восстановителя. Обход части реакций цикла Кребса позволяет

сохранить скорость потока масс через цикл с пониженной скоростью синтеза восстановителя. Проверкой такого предположения могло бы стать измерение содержания кислорода в среде в середине культивирования.

Выводы вытекают из полученных результатов и являются обоснованными.

Список цитированной литературы оформлен единообразно и аккуратно. Разумное использование обзоров и монографий в качестве цитируемой литературы позволило создать компактный список цитируемой литературы.

Все результаты работы **опубликованы** и представлены на ряде конференций. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Диссертация хорошо проиллюстрирована, изложена четко и логично. Схемы, таблицы, рисунки занимают на ее страницах соответствующее место, согласующееся с излагаемым текстом. В некоторых случаях наличие таблиц и рисунков даже избыточно. Судя по автореферату и диссертации, **автор внес определяющий вклад** в постановку задачи, разработку и проведение экспериментов и написание диссертации.

Если не считать некоторых описок и опечаток, оппонент **не обнаружил разделов, требующих специальных замечаний.**

Диссертационная работа Ахмеда Абдуллаха Хасана Ахмеда представляет собой **завершенную** научно-исследовательскую работу.

Таким образом, диссертация Ахмеда Абдуллаха Хасана Ахмеда «Роль ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути в адаптивной реакции бактериального метаболизма *Sphaerotilus natans* при разных типах питания» на соискание ученой степени кандидата наук является научно-квалификационной работой, в которой представлены результаты по изучению взаимодействия цикла Кребса и глиоксилатного цикла при разных типах питания и соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней». Автор диссертационной работы Ахмед Абдуллах Хасан Ахмед заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

28.11.2017

Доктор биологических наук,

Цыганков Анатолий Анатольевич

Цыганков Анатолий Анатольевич:

Место работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук. web-сайт организации: www.ibbp.psn.ru

Должность: заведующий лабораторией

Адрес: 142290, Институтская, Пушкино Московской обл.

e-mail: ttt-00@mail.ru

тел.: +7 (4967) 73-18-68



Подпись Цыганкова А.А. удостоверяю
Зав. канцелярией
Института фундаментальных проблем биологии
Российской академии наук А.А. Цыганков