

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Трубицина Ивана Васильевича «Диссимиляционная нитратредукция у представителей серобактерий рода *Thiothrix*: очистка и характеристика респираторной нитратредуктазы, скрининг генов, участвующих в процессах денитрификации», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Диссертационная работа Трубицина Ивана Васильевича посвящена исследованию процесса анаэробного дыхания у микроорганизмов - представителей бесцветных серных бактерий рода *Thiothrix*. Бактерии рода *Thiothrix* известны как типичные аэробы, осуществляющие катаболический процесс окисления восстановленных серных соединений. Эти бактерии довольно широко распространены в различных экосистемах, как естественных (сероводородные источники) так и искусственных (очистные сооружения). Такие местообитания характеризуются неравновесными физико-химическими условиями, однако гибкий метаболизм бесцветных серобактерий позволяет им доминировать во многих средах обитания.

Изучение способности использовать нитраты в качестве конечного акцептора электронов в электронтранспортной цепи в условиях перехода от аэробноз к анаэробнозу представляет большой научный интерес. Исследование путей энергетического и конструктивного метаболизма является основополагающей задачей в биохимии. Нитратное дыхание является первой ступенью процесса денитрификации. Денитрификация, в свою очередь, является важной частью энергетического метаболизма у прокариот. Нитратное дыхание, как альтернативный путь получения энергии, активизируется только в анаэробных условиях. Способность переключать свой метаболизм с одного пути получения энергии на другой при изменении условий окружающей среды - основополагающий фактор выживания микроорганизмов.

Исследование способности бактерий рода *Thiothrix* адаптироваться к смене условий окружающей среды с аэробных на анаэробные, а также детальное изучение свойств респираторной нитратредуктазы, катализирующей первый этап процесса денитрификации - актуальные задачи, которые были выполнены в ходе диссертационной работы. Однако автор не ограничился изучением лишь первой ступени процесса денитрификации, молекулярно-биологические и химические методы анализы были применены также для установления наличия процессов нитрит-, NO-и N₂O-редукции у бактерий рода *Thiothrix*. И это безусловно увеличивает ценность полученных в диссертации результатов и выводов; стоит отметить также часть работы, посвященную детекции ферментов, осуществляющих восстановление нитрита до газообразного азота.

Диссертация И.В. Трубицина «Диссимиляционная нитратредукция у представителей серобактерий рода *Thiothrix*: очистка и характеристика респираторной нитратредуктазы, скрининг генов, участвующих в процессах денитрификации» изложена на 135 страницах машинописного текста. Диссертация построена по общепринятому плану: включает введение, обзор литературы, методы исследования, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы, список литературы, приложение. Иллюстрационный материал содержит 47 рисунков и 14 таблиц. Список использованной литературы включает 155 наименований, в том числе 17 на русском и 138 на английском языке. Примерно треть источников опубликована после 2004 года, что служит одним из показателей выполнения работы И.В. Трубицина на современном уровне.

Обзор литературы, представленный на 43 страницах, отражает современное представление о проблеме диссимиляционной нитратредукции у прокариот и отличается информативностью. Обзор содержит необходимые сведения по азотному метаболизму, подробно описывает строение и свойства уже изученных нитратредуктаз, особое внимание уделено характеристике рода *Thiothrix*. В целом обзор написан очень конкретно, логично, на

достаточно высоком профессиональном уровне и вполне подготавливает читателя к восприятию экспериментального материала.

В главе «Методы исследования» автор приводит подробное описание материалов и основных использованных методик, в числе которых методы молекулярной биологии (выделение ДНК, РНК, постановка ПЦР, ОТ-ПЦР), биохимии (хроматографические методы очистки белка, постановка ПААГ-электрофореза), микробиологии (культивирование микроорганизмов), а также биоинформатики (работа с электронными базами данных, разработка праймеров, анализ аминокислотных последовательностей генов). Комплексное использование перечисленных выше методов позволило выполнить работу на высоком профессиональном уровне и получить достоверные научные данные, обладающие существенной научной новизной.

Центральное место в диссертации занимает третья глава, где представлены основные результаты, полученные автором. Так, Трубициным И.В. впервые показано, что некоторые представители серобактерий рода *Thiothrix* способны к анаэробному дыханию в присутствии нитратов: нитратному дыханию и денитрификации. Способность к денитрификации может варьировать в пределах разных штаммов одного вида и коррелирует с физико-химическими параметрами их среды обитания. Нитратное анаэробное дыхание свойственно большинству представителей рода *Thiothrix* и осуществляется при участии респираторной нитратредуктазы, которая кодируется геном *narG* последний экспрессируется в анаэробных условиях. В ходе исследования автору удалось получить гомогенный препарат респираторной нитратредуктазы NarGH из *T. lacustris* AS. Выделение высокоочищенного препарата фермента само по себе является непростой задачей. При налаживании методики автором было уделено специальное внимание подбору условий культивирования биомассы с целью ее максимального прироста и увеличения содержания целевого фермента. Грамотное использование приемов препаративной энзимологии, сочетающей методы колоночной хроматографии и препаративного

электрофореза позволило достигнуть хорошей степени очистки (около 80 раз) и достаточно высокой специфической активности фермента. Следует отметить, что предложенная диссертантом схема быстрой очистки фермента, позволяющая получить электрофоретически гомогенный препарат респираторной нитратредуктазы является несомненным достижением автора, которое найдет практического применения и в других лабораториях. В этой же части работы автором была проведена оценка молекулярной массы и субъединичного состава респираторной нитратредуктазы, ее температурной и рН-зависимости, а также основных кинетических параметров.

Весьма интересным результатом является обнаружение у представителей рода *Thiothrix* функционирующих нитритредуктазы NirS; и цитохром *c* зависимой NO-редуктазы CnorB, осуществляющей восстановление окиси до закиси азота.

Четвертая глава представляет собой обсуждение результатов исследований. Данный раздел позволяет правильно проанализировать полученные данные. Сформулированные автором основные научные положения и выводы новы, достоверны и хорошо аргументированы.

Научно-практическая значимость работы определяется тем, что в ней, как уже было отмечено, получен гомогенный препарат нитратредуктазы из бактерий рода *Thiothrix* и разработана схема его очистки, которая может быть использована для очистки респираторной нитратредуктазы и из других представителей рода *Thiothrix*. Автором были разработаны родоспецифичные праймеры для генов *narG*, *nirS* и *cnorB*, которые также могут в дальнейшем использоваться для работы с микроорганизмами - представителями рода *Thiothrix*.

В приложении к диссертационной работе, занимающем 3 страницы, приведены нуклеотидные последовательности генов, полученные в ходе исследования с указанием номеров, под которыми они депонированы в GenBank.

Основные результаты диссертационной работы И.В. Трубицина опубликованы в 11 работах, среди которых 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Результаты диссертации докладывались на 4 научных конференциях, в том числе 3 международных. Данные публикации подтверждают высокую квалификацию соискателя. Автор диссертации И.В. Трубицин продемонстрировал в своей работе научную эрудицию, хорошую методическую подготовку, мастерство экспериментатора и зрелый аналитический ум.

Диссертационная работа И.В. Трубицина является завершенным научным исследованием, содержащим решение актуальной научной задачи и свидетельствующим о личном вкладе автора в науку. Достоверность полученных данных не вызывает сомнения, т.к. выводы диссертационной работы экспериментально и теоретически обоснованы, автореферат адекватно отражает содержание работы.

К работе имеется ряд пожеланий и замечаний:

1. При оформлении списка использованной литературы автором допущены некоторые технические недочеты, такие как погрешности в расстановке знаков препинания, опечатки.
2. Использование праймеров для идентификации гена *nosZ* не выявило последнего в геноме бактерий рода *Thiothrix*. Однако согласно данным химического анализа, по образующемуся продукту N_2 можно судить о возможности протекания реакции $N_2O \rightarrow N_2$. Требуются дополнительные молекулярно-биологические исследования с целью поиска функционального гена N_2O -редуктазы.
3. В ходе выполнения данной работы был получен электрофоретически гомогенный препарат респираторной нитратредуктазы, при этом фермент имел форму гетеродимера. Однако в ряде литературных источников имеется информация о получении препарата данного фермента в форме гетеротримера. Возможно, следует

модифицировать схему очистки с целью получения нитратредуктазы без потери субъединицы. По своей актуальности, научно-методическому уровню, новизне полученных результатов и практической значимости диссертационная работа Трубицина И.В. «Диссимиляционная нитратредукция у представителей серобактерий рода *Thiothrix*: очистка и характеристика респираторной нитратредуктазы, скрининг генов, участвующих в процессах денитрификации» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Трубицин Иван Васильевич достоин присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

Старший научный сотрудник
НИИ физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского МГУ
им. М.В. Ломоносова
доктор биологических наук

khailova@gene.fee.msu.ru
8(916)370.59.67
Khailova (Хайлова Л.С.)

Подпись заверяю:

Директор НИИ физико-химической
биологии имени А.Н. Белозерского
Академик РАН



[Signature] (В.П. Скулачев)

08.12.2014

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

Адрес: г. Москва, ГСП-1,
Ленинские горы, д.1,
почтовый индекс 119991