

96

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук
д.х.н., профессор



С.Ю. Щеголев

« 8 » декабря 2014 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Трубицина Ивана Васильевича

«Диссимиляционная нитратредукция у представителей серобактерий рода *Thiothrix*: очистка и характеристика респираторной нитратредуктазы, скрининг генов, участвующих в процессах денитрификации» по специальности 03.01.04 – биохимия

Диссертационная работа Трубицина Ивана Васильевича посвящена исследованию механизма анаэробного дыхания в присутствии нитратов у представителей серобактерий рода *Thiothrix*. Известно, что факультативно аэробные серобактерии являются важным компонентом экосистем, поскольку обменные процессы, протекающие с участием их ферментативного аппарата, служат своеобразным связующим звеном между циклами серы, азота и углерода. Для обитающих в приливно-отливной зоне морской литорали или проточных водных экосистемах с высоким содержанием сульфидов представителей бактериального рода *Thiothrix* была выявлена способность к анаэробному дыханию на нитратах. Процесс смены аэробного дыхания на анаэробный у данных бактерий может иметь глубокий экологический адаптационный смысл. Однако сведения об очистке респираторной нитратредуктазы бактерий рода *Thiothrix*, катализирующей начальную реакцию денитрификации, в отечественной и зарубежной научной литературе отсутствовали. Следует отметить достаточно ограниченное количество работ по изучению свойств респираторных нитратредуктаз прокариот вследствие трудности работы с ними. В этой связи, актуальность изучения продуцируемой *Thiothrix* spp. нитратредуктазы, включающего этапы ее выделения, очистки и характеристики, не вызывает сомнения.

Диссертация написана по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, а также списка цитируемой литературы, включающего 155 литературных источников, в том числе 17 – на русском языке, и приложений. Материалы диссертации изложены на 135 страницах и иллюстрированы 47 рисунками и 14 таблицами.

В обзоре литературы обобщены молекулярно-биологические аспекты дыхания на нитратах. Отдельно следует отметить разделы, посвященные анализу генетических основ способности ассимиляции нитрата, а также характеристике, особенностям структурной организации, распространению и функциональной активности ассимиляционных и диссимиляционных нитратредуктаз. В обзоре приведена подробная характеристика таксономии и филогении бактерий рода *Thiothrix* – основного объекта исследований. Сведения, представленные в обзоре, грамотно изложены, систематизированы и критически осмыслены автором. Обзор литературы позволяет сделать заключение, что диссертант осведомлен о современном состоянии исследований в данной области науки в полной мере. Не остается сомнений в обоснованности и актуальности темы исследования.

Целью диссертационной работы И.В. Трубицина было выявление и изучение процесса анаэробного дыхания у представителей серобактерий рода *Thiothrix*, выделение и характеристика ключевого фермента диссимиляционной нитратредукции – респираторной нитратредуктазы.

Для достижения цели исследования были поставлены адекватные задачи, которые удалось полностью решить с использованием широкого набора современных и классических биохимических, молекулярно-генетических методов, с привлечением методов биоинформационного анализа.

В разделах «Результаты исследований» и «Обсуждение результатов» автор подробно и убедительно раскрывает содержание выполненных исследований. Из наиболее значимых результатов, изложенных в диссертационной работе, заслуживают упоминания следующие.

Анализ способности к анаэробному дыханию представителей двух групп *Thiothrix* spp. позволил выявить рост всех исследуемых штаммов в присутствии доноров электронов (органического субстрата и тиосульфата) и нитратов в

98

качестве терминального акцептора электронов. Автором была изучена динамика восстановления нитратов до нитритов, показана активность респираторной нитратредуктазы, обнаружен функциональный ген *narG*, кодирующий α -субъединицу респираторной нитратредуктазы NarGH, а также показана его экспрессия в анаэробных условиях.

Для выделения респираторной нитратредуктазы *T. lacustris* AS была использована специально разработанная схема быстрой четырехстадийной очистки фермента. Степень очистки составила 78,3, а удельная активность фермента – 97,75 Е/мг. Применение денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле позволило выявить гетеродимерную организацию молекулы нитратредуктазы NarGH с молекулярной массой субъединиц NarG – около 100 кДа, а NarH – около 80 кДа. Для полученного препарата белка автором были изучены физико-химические и кинетические характеристики респираторной нитратредуктазы, что позволило провести сравнительный анализ характеристических параметров выделенного фермента с нитратредуктазами других прокариот.

Было показано, что исследуемый фермент проявлял активность в относительно широком диапазоне значений рН среды, но быстро терял активность при ее защелачивании. Определение термостабильности респираторной нитратредуктазы выявило снижение ее активности вдвое при инкубации в течение 2 ч при 50 °С, а при 60 °С наблюдалось снижение активности фермента до 30 % от начального уровня в течение 1 ч экспозиции. Ингибиторный анализ показал, что бета-меркаптоэтанол и азид натрия в концентрациях 10-50 мМ подавляют активность нитратредуктазы.

Скрининг функциональных генов, участвующих в диссимиляционных реакциях восстановления нитритов, окиси и закиси азота, позволил выявить ген *nirS*, кодирующий нитритредуктазу, у 4-х из 9-ти исследуемых штаммов *Thiothrix*, для штамма *T. lacustris* AS показана экспрессия гена *nirS*. У бактерий штаммов *T. lacustris* AS, *T. caldifontis* G1, G3, *T. unzii* A1, TN был выявлен ген *cnorB*, кодирующий цитохром-с зависимую NO-редуктазу. Филогенетический анализ показал, что данный ген был подвергнут горизонтальному переносу перед отделением современных видов *Thiothrix* из последнего общего предка этого рода.

Все полученные результаты являются приоритетными. Научно-практическая значимость работы не вызывает сомнений. Отработанная и оптимизированная с учетом изучаемого фермента схема очистки респираторной нитратредуктазы может быть использована без существенных изменений для выделения очищенных препаратов респираторных нитратредуктаз из других представителей рода *Thiothrix*. Подобранные родоспецифичные праймеры для гена *narG* позволяют быстро и достоверно проводить скрининговый анализ наличия в геноме бактерий *Thiothrix* гена α -субъединицы респираторной нитратредуктазы NarGH. Охарактеризованная способность к диссимиляционной нитратредукции бактерий *Thiothrix* spp. позволяет рекомендовать их использование для очистки водных экосистем от нитратов. Представленные в диссертации материалы были включены в методическое пособие по метаболизму соединений азота прокариотами. Полученные в работе материалы могут быть использованы при чтении курсов лекций по микробиологии в высших учебных заведениях.

Говоря о работе в целом, необходимо заключить, что она написана хорошим научным языком и прекрасно оформлена. Рисунки и таблицы отлично иллюстрируют полученные автором результаты. Каждый раздел завершается кратким резюме, что удобно для понимания этой большой и емкой работы.

В работе отсутствуют сколь-нибудь значимые недостатки. Можно лишь отметить некоторые погрешности оформления, выражающиеся в наличии незначительного количества опечаток, например, на стр. 78 по тексту и в названии рисунка 27, стр. 103 – в названии главы 4; в таблице 9 указана степень очистки фермента 78,8, а далее по тексту и в выводах – 78,3. Однако эти недочеты никоим образом не умаляют высокую значимость предпринятых диссертантом усилий в получении результатов высокого научного уровня.

Результаты диссертации широко известны научной общественности. Они были неоднократно доложены на представительных научных форумах, проводимых в нашей стране и за рубежом. Основные положения диссертационной работы полноценно изложены в автореферате и отражены в 11 публикациях, в том числе 4 статьях в российских и международных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований.

30

Резюмируя изложенное, следует заключить, что диссертационная работа И.В. Трубицина, несомненно, является оригинальным экспериментальным исследованием, выполненным на самом высоком методическом уровне, и представляет собой цельный законченный научный труд, который вносит существенный вклад в развитие биохимии микроорганизмов.

Таким образом, по объему выполненных исследований, научному и методическому уровню, новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа соответствует специальности 03.01.04 – биохимия, удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Трубицин Иван Васильевич – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук. Работа обсуждена на расширенном заседании лаборатории биохимии (протокол №224 от 17 ноября 2014 года).

Заведующий лабораторией биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук
Заслуженный деятель науки РФ,
доктор биологических наук, профессор

В.В. Игнатов

Подпись Владимира Владимировича Игнатова заверяю:
Ученый секретарь ИБФРМ РАН,
кандидат биологических наук

Т.Е. Пылаев

410049 Саратов, Проспект Энтузиастов, д. 13, ИБФРМ РАН
Тел.: (8452) 970444, E-mail: room308@ibppm.sgu.ru
г. Саратов, 8 декабря 2014 г.

Подпись	В.В. Игнатова
	Т.Е. Пылаева
Зав. канцел.	
	« 17 » 11 2014 г.