

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Новотоцкой-Власовой К.А.  
*«Холодоактивные липолитические ферменты психротрофных микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых осадков»*

В последние десятилетия во многих странах мира проводятся интенсивные исследования низкотемпературных экосистем, направленные, прежде всего, на попытки прогнозирования сценариев и возможных последствий наблюдаемого в Арктическом регионе резкого повышения температуры, вызывающей активное таяние ледников и изменение границы промерзания почв. Глобальное потепление приводит к высвобождению огромных количеств пресных вод, а также увеличивает поступление в атмосферу важнейших парниковых газов - метана и углекислоты. Изменение климатических показателей не может не сказаться на биологических параметрах полярных экосистем. Для России, обладающей значительными территориями в Арктическом регионе, где сосредоточено более 70% разведанных запасов нефти, порядка 93% природного газа, значительные залежи каменного угля, комплексные исследования Арктики становятся в последние годы одной из первостепенных задач.

Изучение микроорганизмов, адаптированных к постоянно низким температурам и не только сохраняющих жизнеспособность при длительной консервации в мерзлых почвах и породах, но и активно функционирующих при отрицательных температурах, представляет несомненный фундаментальный и практический интерес. В последние годы достигнут заметный прогресс в исследовании микроорганизмов, выделенных из вечномерзлых отложений различного возраста. На основании секвенирования геномов выявлены разнообразные механизмы адаптации микроорганизмов к условиям низких температур. Структурные изменения многих клеточных компонентов под влиянием низких температур, выработка антифризных белков-криопротекторов и осмолитов, предполагает функционирование у психрофильных микроорганизмов широкого спектра

холодоактивных ферментов. Однако, несмотря на значительный прогресс в области изучения психрофильных и психротолерантных микроорганизмов, многие вопросы их физиологии и адаптации к низким температурам до сих пор остаются неизученными. Поэтому не вызывает сомнения, что задача выделения новых психрофильных микроорганизмов из арктических экосистем, исследование особенностей их физиологии и метаболизма обладает несомненной **научной новизной** и крайне **актуальна** для понимания механизмов адаптации клеток прокариот к обитанию в криогенных экосистемах. Материалы диссертации могут быть рекомендованы для использования в учебной деятельности, а результаты данного исследования – в научно-исследовательской работе профильных институтов.

В качестве объектов исследования были выбраны образцы арктических криопэгов, отобранных на полуостровах Ямал и Аляска, а также в тундровой зоне Колымской низменности. Основными задачами работы было выявление жизнеспособных бактерий в составе микробных сообществ криопэгов, изучение их таксономического положения, создание коллекции психрофильных и галофильных микроорганизмов, обладающих липолитической активностью, а также детальное изучение холодоактивных липолитических ферментов *Psychrobacter cryohalolentis*.

**Диссертация изложена** на 171 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы исследования и главу «Результаты и обсуждение», заключения, выводов и списка литературы, куда включено более 280 литературных источников, в том числе на английском языке более 260. Диссертационная работа хорошо проиллюстрирована и содержит 30 таблиц и 41 рисунок.

**Литературный обзор** оставляет очень хорошее впечатление. Автору удалось собрать и в достаточно краткой и лаконичной форме изложить самые современные представления о криосфере как среде обитания многих физиологических групп микроорганизмов, подробно описать основные

механизмы адаптации прокариот к низким температурам, а также обосновать физиологическую роль липолитических ферментов в регуляции клеточного метаболизма, в том числе и у психрофилов. Автором также представлены самые современные данные о классификации бактериальных липаз, методах определения их активности, особенностях тонкой структуры холодоактивных липаз психрофилов, а также возможности применения низкотемпературных липаз в битехнологии.

**Материалы и методы.** Диссертантом использован широкий спектр методик, включающий микробиологические, молекулярно-генетические методы филогенетического анализа выделенных микроорганизмов, получения рекомбинантных холодоактивных липолитических ферментов, их очистка и биохимическая характеристика. Автором дается детальное описание методов определения общей численности микроорганизмов с использованием флуоресцентной микроскопии, выделения накопительных и чистых культур бактерий из арктических образцов, определения у выделенных изолятов липолитической активности. Не менее подробно описаны протоколы получения рекомбинантных белков из клеток *E. coli*, их выделение и очистка, а также определение липолитической активности, термостабильности, оптимума pH, влияние некоторых анионов и катионов. Не вызывает сомнения, что работа выполнена на мировом методическом уровне с использованием комплекса методик, использующихся в международной практике проведения подобных микробиологических и биохимических исследований разных групп микроорганизмов и продуцируемых ими ферментов.

В главе «**Результаты и обсуждение**» подробно представлены экспериментальные данные, полученные автором в процессе работы.

Данные эпифлуоресцентной микроскопии показали достаточно высокую численность микроорганизмов в исследуемых образцах криопэгов (до  $1,8 \times 10^6$  кл/мл). С использованием традиционных микробиологических методов автору удалось выделить из этих образцов коллекцию чистых

культур аэробных галофильных микроорганизмов. Скрининг полученных чистых культур показал, что среди полученных штаммов, 20 обладали липазной активностью, а 8 из них утилизировали в качестве субстрата как трибутирин, так и оливковое масло. На основании филогенетического анализа установлено, что среди выделенных штаммов с липазной активностью преобладали бактерии филума *Actinobacteria*, а также было выделено несколько представителей *Fermicutes*.

Однако, для более детального исследования липолитической ферментной системы и холодоактивных липолитических ферментов диссертантом был выбран коллекционный психротолерантный штамм *P. cryohalolentis*, выделенный ранее из криопэга Арктики. Выбор этого организма, а не какого-либо штамма из полученных непосредственно автором, требует, на наш взгляд дополнительного обоснования, позволяющего связать экологический блок исследований с биохимическим и молекулярно-биологическим.

Дальнейшие исследования автора были посвящены поиску в геноме *P. cryohalolentis* последовательности гена *estPc*, кодирующего холодоактивную липазу, и экспрессию этого гена в *E.coli*. К.А. Новотоцкой-Власовой удалось получить и очистить рекомбинантный белок EstPc, а также детально исследовать его субстратную специфичность, активность в зависимости от pH, температуры, концентрации солей, ионов металлов и детергентов. По аналогии с EstPc в геноме *P. cryohalolentis* были обнаружены последовательности нуклеотидов, кодирующие другие липазы Lip1Pc и Lip2Pc, которые также удалось экспрессировать в *E.coli*, получить и очистить рекомбинантные белки и исследовать их биохимические свойства. Сравнительный анализ полученных липолитических ферментов продемонстрировал их высокую активность в широком диапазоне температур, включая и температуры ниже 10°C, что существенно отличает исследованные автором липазы от известных ранее.

Сформулированные **выводы** в целом соответствуют основным результатам, полученным в работе.

Несмотря на **отсутствие принципиальных замечаний** по рецензируемой диссертационной работе, имеются некоторые вопросы, которые возникли при ознакомлении с разными главами диссертации:

1. Не совсем понятно, почему в названии диссертации указано «...выделенных из многолетнемерзлых осадков», в то время как все исследованные арктические образцы были отобраны из криопэгов?
2. Не совсем удачным представляется термин «психротрофные», вынесенный в название. В настоящее время более распространены названия «психрофильные и психроактивные микроорганизмы».
3. В обзоре литературы хотелось бы видеть более подробное заключение, позволяющее автору четко сформулировать основные задачи собственных экспериментальных исследований, обоснование и схемы постановки экспериментов для их решения.
4. Для выделения накопительных и чистых культур автор использовал достаточно богатые питательные среды с широким спектром органических субстратов, что не исключает еще на уровне накопительных культур потерю целого ряда микроорганизмов, рост которых был бы возможен только в условиях «бедных» сред.

Высказанные замечания не снижают общей высокой оценки, работы. Из криопэгов автору удалось выделить и охарактеризовать коллекцию психрофильных галофильных микроорганизмов, обладающих липолитической активностью. Несомненной заслугой автора является также отработка схемы и получение нескольких рекомбинантных липаз, обладающих высокой липолитической активностью при низких температурах и относительной термостабильностью, что открывает

перспективы использования полученных ферментов психрофилов в биотехнологии.

Основные результаты и выводы сформулированы на основе большого экспериментального материала и их достоверность не вызывает сомнения. Автором освоены и успешно применены в работе современные инструментальные и компьютерные методы и подходы, которые активно используются в лучших отечественных и зарубежных профильных лабораториях. Автореферат и опубликованные статьи отражают содержание диссертации.

В заключении следует отметить, что по постановке задач, подходам и методам, используемым в работе, а также анализу полученных результатов, диссертационная работа К.А. Новотоцкой-Власовой полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» №842, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013г., а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Заместитель директора ИНМИ РАН,  
зав. лабораторией реликтовых  
микробных сообществ,  
доктор биологических наук

Николай Викторович Пименов

117312, г. Москва, Проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
микробиологии им. С.Н.Виноградского Российской академии наук (ИМНИ  
РАН)

Тел.: +7 (499) 135-31-75

E-mail: npimenov@mail.ru



СОБСТВЕННОРУЧНАЯ ПОДПИСЬ  
ТОВ. Н. В. Пименова  
УДОСТВЕРЯЕТСЯ.  
Подпись Николай Викторович Пименов

нац. д-ра 10.04.2015.