

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОПИОНЕНТА**

на диссертационную работу Петушковой Екатерины Павловны  
«Ассимиляция ацетата пурпурной несерной бактерией *Rhodobacter capsulatus* B10»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.02.03 – микробиология

### **Актуальность темы диссертации.**

Диссертационная работа Петушковой Е.П. посвящена изучению метаболизма углерода несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus*. Ацетат является центральным промежуточным продуктом в общем углеродном цикле. Большинство бактерий ассимилируют ацетат через цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). При использовании ацетата в качестве единственного источника углерода из ЦТК происходит отток промежуточных продуктов на биосинтетические нужды клетки. Поддержание уровня щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) в ЦТК у большинства микроорганизмов происходит через глиоксилатный шунт, ключевыми ферментами которого являются изоцитратлиаза и малатсинтаза. Не смотря на то, что в геноме *Rhodobacter capsulatus* B10 имеются гены, кодирующие изоцитратлиазу и малатсинтазу, однозначный ответ на вопрос о функциональной активности этих ферментов до сих пор не был найден. Принимая во внимание изложенное выше, следует признать, что тема диссертационной работы Петушковой Е.П., а именно, изучение ассимиляции ацетата пурпурной несерной бактерией *Rhodobacter capsulatus* B10, несомненно, актуальна.

### **Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.**

В ходе проделанной работы были определены основные причины существовавших разногласий в отношении использования пурпурной несерной бактерией *Rba. capsulatus* глиоксилатного цикла при фотогетеротрофном росте на среде с ацетатом в качестве единственного источника углерода. Применяя современные методические подходы, автором была реконструирована метаболическая схема путей восполнения пула ЩУК в ЦТК, необходимых прокариотическим организмам при использовании ацетата в качестве единственного углеродного субстрата. Проведен анализ данных о полном геноме исследуемой бактерии и о транскрипционной активности генов фототрофных культур *Rba. capsulatus*, выросших на среде с ацетатом, посредством которого обнаружены несколько путей, способных осуществлять вклад в пополнение пула ЩУК у данной бактерии. Это позволяет объяснить рост *Rba. capsulatus* на ацетате в отсутствие активности ИЦЛ. Диссертационная работа Петушковой Е.П. основана на большом экспериментальном материале. Результаты и выводы диссертационной работы достоверны, рассматриваемая работа обладает новизной.

### **Содержание диссертации.**

Диссертационная работа Петушковой Е.П. составлена из традиционных разделов, она включает введение, обзор литературы, описания объектов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы.

Материалы изложены на 132 страницах машинописного текста, содержат 12 таблиц, иллюстрированы 21 рисунком, список литературы насчитывает 288 источников.

Во **введении** диссертантом кратко обоснована актуальность темы, обозначена цель работы, а именно - изучение особенностей ассимиляции ацетата пурпурной несерной

бактерией *Rba. capsulatus*. Для выполнения исследований было сформулировано несколько задач, в том числе: определение факторов, влияющих на измерение активности изоцитратлиазы в бесклеточных экстрактах *Rba. capsulatus* B10; изучение влияния физиологического состояния культуры на активность изоцитратлиазы у *Rba. capsulatus* B10 и идентификация генов, вовлеченных в ацетатный метаболизм *Rba. capsulatus* B10; выявление активных путей восполнения пула ЦУК.

**Обзор литературы**, разграничен автором на пять разделов: Систематическое положение *Rba. capsulatus* (п. 1.1), общая характеристика и физиология пурпурных несерных бактерий. Отличительные особенности *Rba. capsulatus* (п. 1.2), углеродный метаболизм пурпурных несерных бактерий (п. 1.3), современные подходы изучения метаболизма бактерий (п. 1.4), практическое значение изучения метаболизма ацетата в *Rba. capsulatus* (п. 1.5.). Обзор является обобщением наиболее важных результатов исследований направленных на всесторонний анализ углеродного метаболизма пурпурных несерных бактерий. Объем литературного обзора, его содержание и качество, дает достаточное обоснование актуальности темы, выбранной для диссертационного исследования.

В разделе **материалы и методы** (п. 2) очень аккуратно и подробно приведены использованные в работе методы. Материалы этой главы диссертации показывают, что работа выполнена с использованием впечатляющего разнообразия методов, описание которых позволяет не только повторить отдельные методы анализа другими исследователями, но и предлагает им методологию исследований несерных пурпурных бактерий на современном уровне.

Научные **результаты**, представленные в диссертационной работе, автор разделяет на три подраздела: метод определения ИЦЛ активности (п. 3.1), влияние условий культивирования на ИЦЛ активность в фотогетеротрофных культурах *Rba. capsulatus* (п. 3.2) и выяснение альтернативных глиоксилатному шунту путей восполнения пула ЦУК в *Rba. capsulatus* (п. 3.3.).

В подразделе 3.1 диссертантом приведены результаты свидетельствующие о том, что при разрушении клеток в аэробных условиях ИЦЛ теряет активность вследствие окисления и протеолиза. С учетом полученных данных диссертантом усовершенствован метод определения ИЦЛ активности в бесклеточных экстрактах. Материалы данного подраздела имеют особый интерес и, несомненно, будут востребованы в будущем при изучении ИЦЛ активности бактерий.

В следующем подразделе изложены результаты собственных экспериментальных исследований автора, направленных на изучение влияния условий культивирования *Rba. capsulatus* (рН, фаза роста, интенсивность освещения и смена ростового субстрата) на ИЦЛ активность. Диссертантом было установлено, что инокулят *Rba. capsulatus*, выросший на среде с лактатом, не обладал ИЦЛ активностью, а при пассаже клеток на среду с ацетатом – ИЦЛ активность зависит от фаз роста культуры и времени пребывания инокулята в стационарной фазе роста. Впервые было показано, что в процессе роста *Rba. capsulatus* при смене ростового субстрата с ацетата на лактат в новых клетках культуры наблюдается синтез активной ИЦЛ в отсутствие ацетата в питательной среде.

В подразделе 3.3 отражены результаты осуществленного поиска альтернативных путей восполнения пула интермедиатов ЦТК, которые могли бы функционировать у *Rba.*

*capsulatus* B10 при росте на среде с ацетатом в отсутствие ИЦД активности. Анализ и систематизация отобранных реакций позволили создать единую метаболическую схему, включающую известные и ранее неизвестные пути восполнения пула ЦУК. В результате проведенных исследований выяснены пути восполнения пула ЦУК в ЦТК, имеющие генетический потенциал у *Rba. capsulatus*, и определено, какие из них экспрессируются этой бактерией в фотогетеротрофных условиях с использованием ацетата. В результате биоинформационных исследований диссертантом реконструирована универсальная метаболическая карта всех возможных анаэробных путей восполнения пула ЦУК в ЦТК у прокариот. Кроме того, в ходе проведенного анализа были обнаружены новые метаболические пути и последовательности реакций, которые ранее не учитывались исследователями при изучении путей восполнения пула ЦУК в ЦТК. При создании метаболической карты автором выявлены закономерности, ставшие основой для создания современной классификации путей восполнения интермедиатов ЦТК по образуемому в них метаболиту (глиоксилату, пропионил-КоА, пирувату или фосфоенолпирувату).

Анализ экспериментальных материалов диссертации указывает на то, что оппонируемая работа отличается достаточным объемом экспериментальных и биоинформационных исследований. Научные положения диссертации обладают внутренним единством, раскрывают новые особенности ассимиляции ацетата пурпурными несерными бактериями.

**Выводы** диссертационной работы сформулированы в соответствии с полученными теоретическими и экспериментальными данными, обоснованы, в целом отражают полученные результаты и имеют научно-практическую ценность.

В **списке литературы**, принятой во внимание автором, в полной мере представлены публикации по теме исследований.

Работа не лишена некоторых **недостатков**.

В разделе «Материалы и методы» с описанием источника используемых диссертантом общедоступных экспериментальных данных о транскрипционных профилях исследуемой бактерии (их входного номера, имен авторов, проводивших эксперименты) не описано, какие работы, основанные на анализе указанных данных, уже опубликованы другими исследователями.

Естественным образом присутствуют и опечатки разных типов (стр. 35, 53, 54, 59, 61, 62, 64, 103, 104), на страницах 72 и 87 неясно на какой рисунок ссылается диссертант. Но число их незначительно. Следует отметить, что указанные выше замечания не имеют принципиального значения и не снижают высокого уровня диссертационной работы Петушковой Е.П., представляющей собой цельное завершенное исследование, результаты которого имеют как теоретическую, так и практическую ценность.

В целом диссертационная работа Петушковой Е.П. характеризуется хорошим научным стилем, ясностью и грамотностью изложения, четкостью формулировок, хорошо иллюстрирована, имеет завершенный характер.

Анализ содержания диссертации показывает, что автором получены приоритетные данные, степень обоснованности научных положений, достоверности результатов, безусловно имеющих высокую научную и практическую значимость, не вызывают сомнений.

## Опубликование результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертационных исследований Петушковой Е.П. представлены в 11 научных публикациях, две из которых напечатаны в изданиях, включенных ВАК Министерства науки и образования РФ в Перечень журналов, в которых должны быть опубликованы научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Основные результаты диссертации обсуждались на 9 международных и отечественных научных мероприятиях различного уровня.

### Содержание автореферата

Автореферат работы Петушковой Е.П. отражает основные положения диссертации.

### Заключение

По содержанию, научной ценности, новизне, практическому значению результатов диссертационная работа Петушковой Екатерины Павловны «Ассимиляция ацетата пурпурной несерной бактерией *Rhodobacter capsulatus* В10», являющаяся научно-квалификационной работой, полностью соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 30.07.2014), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Петушкова Екатерина Павловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 –микробиология.

кандидат биологических наук,  
врио заведующего лабораторией молекулярной  
диагностики (ЦКП Биоинженерия)  
Федерального государственного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»,  
119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2  
Тел. 8(499)135-12-40  
e-mail: denisgrouzdev@gmail.com

  
Груздев Денис Сергеевич

Подпись Груздева Д.С. заверяю.

к.б.н. Н.Г. Степанова

Ученый секретарь  
Научно-технического совета  
Института биоинженерии  
Федерального государственного  
учреждения «Федеральный  
исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»

