

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Елены Базыровны Эрдынеевой «**Микробные сообщества щелочных озер пустыни Бадаин Жаран (Китай) и функциональная активность протеолитических бактерий**», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биологические науки).

**Актуальность и значимость работы.** Диссертационная работа Эрдынеевой Е.Б. посвящена актуальной теме исследования галоалкалофильных микробных сообществ и индивидуальных бактерий, обладающих протеолитической активностью, экстремальных экотопов (содово-соленых озёр). Объекты исследования – микробные сообщества содово-соленых озёр пустыни Бадаин Жаран (территория Китая), которые характеризуются разнообразием по минерализации, рН, химическому составу, и являются малоизученными, в том числе, в плане микробного разнообразия. Ранее не проводилось полномасштабных экологических и микробиологических исследований этих экстремальных экосистем. Представляет несомненный интерес выделение и всестороннее исследование новых галофильных и алкалофильных бактерий, которые могут быть перспективны для использования в биотехнологических целях. Диссертационная работа направлена на изучение протеолитических бактерий, функционирующих в микробных сообществах уникальных экстремальных водных систем (содово-соленых озёр) пустыни Бадаин Жаран.

**Соответствие диссертации и автореферата требованиям положения ВАК.** Диссертационная работа Е.Б. Эрдынеевой построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, главы собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложения. Работа изложена на 139 страницах машинописного текста, иллюстрирована 15 таблицами и 22 рисунками. Работа написана автором лично, изложена хорошим литературным языком. Список использованной литературы включает 238 наименования, из которых 222 ссылки на иностранном языке.

Во введении обосновывается актуальность проводимых исследований, а также научная новизна и научно-практическая значимость работы.

Обзор литературы, представленный на 43 страницах, свидетельствует о хорошем знании диссертантом публикаций по теме работы. Обзор включает три раздела. Первый раздел посвящен общей характеристике современных содово-соленые озёр, являющихся широко распространенными природными щелочными/засоленными средами на Земле, и, конкретно, формированию озер в пустыне Бадаин Жаран. Во втором разделе обзора приведены сведения о алкалофильных и галофильных микробных сообществах, описаны имеющиеся в научной литературе данные о распространении галоалкалофильных бактерий в содово-соленых озерах Монгольского плато (Китай, Внутренняя Монголия, Забайкальский край). Третий раздел обзора посвящен характеристике внеклеточных протеолитических ферментов алкалофильных, галофильных бактерий и подробному анализу имеющихся публикаций о микробных аминопептидазах, их применению. В Заключении к литературному обзору обобщен материал, касающийся темы исследований, и дается обоснование цели и задач диссертационной работы.

В экспериментальной части (раздел «Объекты и методы исследования») диссертационной работы Е.Б. Эрдынеевой дана географическая характеристика исследуемых содово-соленых озёр пустыни Бадаин Жаран, подробно описаны классические и современные микробиологические, молекулярно-биологические, аналитические и биоинформатические методы, используемые в работе. Для исследований из 7 содово-соленых озер были отобраны образцы воды, донных осадков, микробных матов, солевых корок. Всего в работе было использовано 12 образцов, которые были охарактеризованы физико-химическими и гидрохимическими методами. Для исследования галоалкалофильных микробных сообществ применялись классические методы учета численности и выделения чистых культур бактерий, методы определения внеклеточной протеолитической активности, а также набор молекулярно-генетических методов, в том числе: методы выделения суммарной ДНК из исследуемых образцов; выделение геномной ДНК из биомассы бактерий; методы амплификации (ПЦР) генов 16S рРНК, секвенирования и анализа выявленных нуклеотидных последовательностей.

Полученные автором экспериментальные данные изложены в главе «Результаты и обсуждение», содержащей пять разделов. В разделе 3.1. «Характеристика экологических условий среды обитания микробных сообществ» приводятся результаты анализа гидрохимического состава отобранных образцов исследуемых содово-соленых озер; на основании статистической обработки полученных данных образцы озёр пустыни Бадаин Жаран были выделены в 4 группы. Показано, что исследуемые озёра характеризуются высоким уровнем минерализации и щелочности, что создает благоприятные условия для функционирования галоалкалофильных микробных сообществ. В разделе 3.2. описывается таксономическое разнообразие микробных сообществ в 12 образцах содово-соленых озёр (воды, корковой соли, донных осадков и микробных матов). Впервые для изучения таксономического разнообразия исследуемых экотопов озёр пустыни Бадаин Жаран использовался метод высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК (на платформе MiSeq, Illumina). Было показано, что экологические факторы, такие как - высокая солёность и щёлочность, выявленные в образцах, обуславливают развитие галоалкалофильного микробного сообщества. Установлена связь между таксономическим составом микробных сообществ и минерализацией. Так, умеренные галофильные бактерии выдерживали солёность только до 200 г/л, например, бактерии рода *Desulfonatronum*. Галофильные бактерии родов *Halochromatium*, *Lyngbya*, *Halomonas* и *Spiribacter* доминируют в образцах с солёностью до 277 г/л, что демонстрирует их высокий адаптационный механизм к различной минерализации. В экстремально галофильных средах, где солёность составляла 410–495 г/л, доминируют экстремально галофильные бактерии рода *Halorhodospira* и рода *Desulfonatronospira*, а также археи рода *Halorubrum*. В разделе 3.3. представлены данные о содержании углерода, водорода, азота (CHN), а также рассчитано содержание валового белка, в исследуемых природных образцах. Показана высокая численность протеолитических бактерий и протеолитическая активность в образцах микробных матов. На основании полученных результатов высказывается предположение, что протеолитическая активность в образцах не зависит от минерализации места обитания, а обусловлена типом биотопа (микробный мат, вода, донные отложения, солевая корка). В разделах 3.4. и 3.5. представлены результаты исследования 10 бактериальных культур, выделенных из микробных и

песчаного матов, корковой соли. Изоляты были отнесены к умеренным, облигатным и экстремальным галоалкалофилам семейства *Bacillaceae* (класс *Bacilli*) и семейства *Halomonadaceae* (класс *Gammaproteobacteria*). Было установлено, что все чистые культуры, выращенные на комплексной минеральной среде с различными белковыми добавками, проявили наибольшую активность в отношении субстрата, специфичного для аминопептидаз (LpNa). Более подробно изучены секретируемые аминопептидазы штаммов рода *Halomonas*. Было установлено, что пептидазы наиболее активны в щелочном диапазоне pH (8-10), солености (50-100 г/л) и термостабильны (до 50 °С). Данные ингибиторного анализа и субстратной специфичности изученных внеклеточных протеаз штаммов рода *Halomonas* указывают на их принадлежность к классу металлопептидаз аминопептидазного типа.

В Заключении отражены наиболее важные аспекты диссертационной работы. Выводы, сделанные автором на основании полученных результатов, соответствуют поставленным задачам, подтверждены экспериментальными и теоретическими материалами.

Результаты, приведенные в диссертационной работе, получены с применением комплекса современных аналитических, микробиологических, молекулярно-генетических методов, характеризуются воспроизводимостью и достоверностью.

Представленные в диссертации материалы опубликованы в 10-ти печатных работах, в том числе: в 2-х статьях в изданиях, входящих в международные базы данных, систему цитирования Web of Science (журналы «Микробиология», «Вавиловский журнал генетики и селекции»), в 2-х статьях в рецензируемом журнале «Вестник БГУ» (система цитирования РИНЦ), 6 тезисах докладов и постерных сообщений.

При высокой оценке диссертационной работы, имеется ряд замечаний и вопросов:

1. В работе не приведен Список используемых сокращений, что вызывает определенные неудобства при знакомстве с диссертационной работой.

2. В разделе 3.1. приводятся данные о минерализации (солености), pH, ионном составе воды исследуемых озёр. В разделе 2.2.2. «Физико-химические и гидрохимические методы исследования» также говорится об исследовании воды. Однако только из озера Бадаин были отобраны образцы донных осадков (Vj-11, Vj-01), воды (Vj-02в), микробного мата (Vj-02) (Таблица 2, стр. 55) и в Таблице 3 (стр. 66) приведены результаты анализа этих образцов: Vj-11, Vj-01, Vj-02в, Vj-02?

Стр. 68: «...на основании статистической обработки (анализа воды или образцов донных осадков, микробных матов, корковой соли ?) изученные озёра пустыни Бадаин Жеран были выделены в 4 группы» (стр. 68). Правомерно ли говорить о том, что «... озёра выделены в 4 группы», наверно речь идет об образцах, т.к., например, образцы озера Бадаин: Vj-11, Vj-01 и Vj-02в, Vj-02, были отнесены к I, III и IV группам, соответственно (стр. 68)?

3. В таблице 10 «Морфологическая характеристика выделенных штаммов» у штамма A11 окраска по Граму обозначена как отрицательная, а в таблице 11 «Основные характеристики выделенных чистых культур» - как положительная? На основании анализа гена 16S рРНК штамм A11 является близкородственным грамположительной бактерии *Pelagirhabdus alkalitolerans* S5T (класс *Bacilli*).

4. В таблице 12 «Использование субстратов выделенными бактериями» (в Примечании) не расшифровывается, в чем выражается «слабый рост» и «активный рост» бактерий.

5. В таблице 9 (стр. 88) в первом столбце правильнее было бы указать вместо «Таксон» - «Типовой штамм ближайшего родственного вида».

6. Указывать, что штамм 3В принадлежит «виду *Halomonas mongoliensis*» (стр. 93) только на основании анализа гена 16S рРНК некорректно, необходимо проведение дополнительных генетических, морфо-физиологических, биохимических, хемотаксономических исследований. (В диссертационной работе (стр. 97) проводятся различия между штаммом 3В и типовым штаммом *Halomonas mongoliensis* Z-7009: штамм 3В имел «более широкий диапазон роста по NaCl, который варьировал от 30 до 200 г/л, тогда как у *Halomonas mongoliensis* Z-7009 – от 0 до 120 г/л.») На данном этапе исследований можно говорить о принадлежности штамма к роду *Halomonas* и название штамма указывать, как *Halomonas* sp. 3В, а не *Halomonas mongoliensis* 3В (стр. 102).

7. На стр. 102 (раздел 3.5.) приводится частичная очистка фермента (пептидазы) только одного штамма *Halomonas* sp. 3В. В то же время, в разделе 3.5. представлены результаты изучения физико-химических свойств ферментов, определения функциональных групп активного центра ферментов при использовании ферментных препаратов (см. раздел 2.2.7, стр. 61-63) трех штаммов рода *Halomonas* (штаммов 3В, 7В и 7Р)?

8. В выводе 4, вероятно, требуется уточнить, что были исследованы ферменты (аминопептидазы) галоалкалофильных бактерий рода *Halomonas*.

9. В Списке литературы встречаются опечатки, например: N2O (стр. 112); Jiang J. и др. (стр. 119); «... bioresource utilization/edited by / под ред. D. Thangadurai,...» (стр. 120); Rasuk M.C. и др. (стр. 126); на стр. 121, 128; 131, 132, 134 названия бактерий написаны прямым шрифтом (не курсивом), и другие.

Перечисленные замечания и вопросы не имеют принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы.

### Заключение

Диссертация Елены Базыровны Эрдынеевой «Микробные сообщества щелочных озер пустыни Бадаин Жаран (Китай) и функциональная активность протеолитических бактерий», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой. По своей научной новизне и практической значимости диссертационная работа соответствует специальности 03.02.08 – экология, удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор – Елена Базыровна Эрдынеева – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории молекулярной  
микробиологии и биотехнологии

Елена Генриховна Плотникова

