

В Совет Д002.247.02 по защите диссертаций  
при Федеральном государственном учреждении  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Игоря Юрьевича Ошкина «Микробные агенты окисления метана в холодных сипах осадков северных рек», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03 02 03 – Микробиология.

Исследования источников поступления метана в атмосферу важны для пополнения наших знаний о масштабах эмиссии этого парникового газа. Выяснение роли в регуляции данного процесса аэробных метанотрофов, использующих метан как ростовой субстрат, а также поиск новых форм этих уникальных бактерий – весьма актуальные задачи микробиологии. Поэтому диссертационная работа Игоря Юрьевича Ошкина, посвященная изучению активности метанотрофных сообществ в холодных метановых сипах, обнаруженных в поймах небольших рек Западно-Сибирской тайги, и идентификации ключевых микробных агентов, ответственных за окисление  $\text{CH}_4$  в этих сообществах, несомненно, актуальна.

Поставленные перед диссертантом задачи включали оценку скоростей эмиссии  $\text{CH}_4$  из метановых сипов Обско-Иртышской поймы, потенциальной активности окисления метана, численности и состава метанотрофных бактерий, а также характеристику репрезентативных метанотрофов. В результате проведенной работы впервые на примере метановых сипов из поймы реки Мухринская всесторонне охарактеризован ранее неисследованный источник поступления метана в атмосферу – холодные грязевые сипы, являющийся также местообитанием метанотрофных бактерий, адаптированных к условиям низких температур и высокой доступности метана. Считаю, что полученные И.Ю. Ошкиным данные имеют несомненную научную ценность, открывая новую страницу в изучении биологии этой высокоспециализированной группы бактерий.

Диссертационная работа изложена на 160 страницах, построена по традиционному принципу, состоит из введения, 8 глав, заключения и выводов, включает 9 таблиц, 19 рисунков и список литературы, в котором 259 наименований на английском языке и 13 на русском. Во «Введении» убедительно обоснована актуальность заявленной темы, четко сформулированы



цель и задачи исследования, а также отражены научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В «Обзоре литературы», изложенном на 74 страницах, приведена информация о геологических источниках метана как парникового газа атмосферы, об основных составляющих его глобального бюджета, распространении метановых сипов различной структуры и происхождения. Рассмотрены особенности биологии метанотрофных бактерий, их таксономическое разнообразие, обсуждается происходящая в настоящее время трансформация взглядов на деление метанотрофов на основные типы; вполне адекватно описан первичный метаболизм. Особое внимание уделено анализу известных подходов, используемых при детекции метанотрофов, приведены соответствующие молекулярные маркеры и дана оценка эффективности различных методов. Этот раздел вполне может служить в качестве исходного справочного материала для исследователей метанотрофных бактерий в природных экосистемах. В отдельной главе проанализированы сведения о метанотрофах холодных экосистем, таких как тундровые почвы, осадки арктических и антарктических озер, сибирской вечной мерзлоты. Список цитируемой литературы (272 источника) свидетельствует о глубоком знании диссертантом изучаемой проблемы.

В разделе «Объекты и методы исследований» приведено описание всех экспериментальных процедур. Они включали полевые измерения потоков метана из метановых сипов, анализ химического состава, определение pH, температуры, метанооксиляющей активности с использованием радиоизотопного метода, численности бактерий методами флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), разнообразия метанотрофов ПЦР-амплификацией фрагментов гена *pmoA*, получение накопительных и чистых культур, изучение морфологических, физиологических и генотипических свойств бактерий. Таксономическое описание штаммов проведено в соответствии с правилами Международного комитета по систематике бактерий. Используемые методические приемы свидетельствуют о том, что избранная для изучения экологическая система автором изучена комплексно, а все этапы проведенной работы логично связаны.

Полученные И.Ю. Ошкиным результаты изложены в четырех главах. В пойме реки Мухринская обнаружено более 25 000 метановых сипов, которые были нанесены на карту, для некоторых приведены данные полевых измерений эмиссии метана. Изотопный состав метана свидетельствует о его биогенном происхождении. Автор полагает, что метан, выделяющийся из сипов Западной Сибири, образован в результате микробного разложения органического вещества в осадочных бассейнах в местах отступления вечной мерзлоты.

В локусах выхода метана на поверхность зафиксированы достаточно высокие скорости его окисления. Применение флуоресцентной *in situ* гибридизации позволило обнаружить в иле



метановых сипов высокую численность метанотрофных бактерий. Методом высокопроизводительного пиросеквенирования с применением двух различных пар праймеров на ген *pmoA*, кодирующий мембранную метанмонооксигеназу, в микробных сообществах двух сипов обнаружены последовательности, характерные для основных известных таксонов, а также принадлежащие новым, пока еще неописанным таксонам метанотрофов. Для этого было получено и проанализировано 53 828 фрагментов гена *pmoA*. Подавляющее большинство этих последовательностей принадлежали гаммапротеобактериальным метанотрофам, среди которых наиболее многочисленными являются представители *Methylobacter*, *Methylovulum* и *Methylosoma*. Состав сообщества аэробных метанотрофов, снижающих потоки метана из сибирских сипов, оказался близок таковому, обнаруженному ранее в осадках разнообразных бореальных и арктических пресноводных озер. Кроме того, продемонстрировано, что холодные метановые сипы могут служить источником новых метанотрофных бактерий.

Несомненным научным достижением Игоря Юрьевича Ошкина является выделение в чистые культуры трех метанотрофов, отнесенных к родам *Methylobacter*, *Methylocystis* и *Methylovulum*. Методами полифазной таксономии один из штаммов описан как новый вид *Methylovulum psychrotolerans* Sph1 и депонирован в международных коллекциях микроорганизмов. Экофизиологические свойства метанотрофа – способность к активному росту при 4-15°C, соответствовали температурным условиям исследуемого биотопа. Таким образом, проведенная диссертантом экспериментальная работа существенно расширяет наши знания о метанотрофах, способных активно функционировать в холодных местообитаниях.

Рецензируемая работа выполнена на высоком методическом уровне, отличается превосходным научным языком и четким оформлением. Защищаемые положения и выводы диссертации полностью правомерны и основаны на достаточном экспериментальном материале. Полученные Ошкиным И.Ю. научные результаты представлены в трех статьях в отечественных и международных журналах, а также доложены на российских и международных конференциях. Содержание диссертации адекватно отражено в автореферате.

При прочтении диссертации возник следующий вопрос, на который желательно получить пояснение. Выделенный метанотроф, идентифицированный как *Methylovulum psychrotolerans* Sph1, отличается от ближайшего родственника – единственного описанного представителя рода *Methylovulum* - *Methylovulum miyakonense* HT12T, по многим свойствам: морфологией клеток, пигментацией, отсутствием растворимой ММО, более активным ростом при пониженных температурах, более широким диапазоном pH для роста, более высоким содержанием Г+Ц в ДНК и низким сходством последовательности гена 16S рРНК (Таблица 9). Это в совокупности указывает на возможность его отнесения к новому роду метанотрофных бактерий. Хотелось бы знать мнение Игоря Юрьевича, какие признаки служили решающим критерием при отнесении



изолята к известному роду *Methylovulum*, но не позволили описать его как представителя нового рода? Данный вопрос не ставит под сомнение научно-практическую ценность диссертационной работы.

По актуальности, новизне, методическому уровню и практической ценности полученных результатов диссертационная работа Ошкина И.Ю. «Микробные агенты окисления метана в холодных сипах осадков северных рек» является научно-квалификационной работой, в которой впервые охарактеризованы метанотрофные сообщества ранее неисследованного источника поступления метана в атмосферу – холодных грязевых сипов Западной Сибири, что имеет существенное значение для соответствующей отрасли знаний и соответствует 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, Ошкин Игорь Юрьевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Отзыв обсужден на заседании лаборатории радиоактивных изотопов ИБФМ РАН 31.05.2017, протокол № 6.

Доктор биологических наук  
ведущий научный сотрудник

Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук  Хмеленина Валентина Николаевна

05.06.2017 г.

142290, г. Пущино Московской обл.,

проспект Науки, 5, ИБФМ РАН

E-mail: [khmelenina@rambler.ru](mailto:khmelenina@rambler.ru)

Тел. 8 926 273 45 93

Факс: 7(495)956-3370

Личную подпись В.Н. Хмелениной заверяю

Ученый секретарь ИБФМ РАН



 Решетилова Татьяна Анатольевна