

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Ошкина Игоря Юрьевича на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Решение диссертационного совета от 21 июня 2017 г. №3 о присуждении Ошкину Игорю Юрьевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация **Ошкина Игоря Юрьевича «Микробные агенты окисления метана в холодных сипах осадков северных рек»** по специальности 03.02.03 – «Микробиология» принята к защите 14 апреля 2017 г. протокол № 2 диссертационным советом Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г.

Соискатель **Ошкин Игорь Юрьевич**, 1989 года рождения, гражданин РФ, в июне 2011 г. окончил Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (г. Москва), факультет почвоведения по специальности «эколог». В ноябре 2011 г. поступил в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук, где проходил обучение по октябрь 2015 г. Диссертационную работу соискатель Ошкин И.Ю. выполнял в лаборатории микробиологии болотных экосистем, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН). С ноября 2015 г. работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории микробиологии болотных экосистем ФИЦ Биотехнологии РАН.

Научный руководитель - доктор биологических наук, Дедыш Светлана Николаевна, заведующий лабораторией микробиологии болотных экосистем, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Хмеленина Валентина Николаевна, гражданка РФ, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории радиоактивных изотопов Федерального государственного

бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН);

Ривкина Елизавета Михайловна, гражданка РФ, кандидат геолого-минералогических наук, заведующая лаборатории криологии почв Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (ИФХиБПП РАН), дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа является современным законченным научным трудом, имеющим фундаментальное и практическое значение в области микробиологии и экологии микроорганизмов, которое соответствует требованиям, изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а её автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии. Так, доктор биологических наук Хмеленина Валентина Николаевна известна своими исследованиями в области физиологии и метаболических особенностей метанотрофных бактерий. Интересы другого оппонента, кандидата геолого-минералогических наук Ривкиной Елизаветы Михайловны, лежат в области исследований микробных сообществ в пермафросте. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в высоко цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области физиологии и экологии микробных сообществ донных отложений оз. Байкал, связанные с тематикой представленной диссертационной работы, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 3 статьях в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. Белова С. Э., **Ошкин И. Ю.**, Глаголев М. В., Лапшина Д. Е., Максютлов Ш. Ш., Дедыш С. Н. Метанотрофные бактерии грязевых микровулканов в поймах северных рек. Микробиология, 2013, т. 82, № 6, с. 732–740.

2. **Oshkin I.Y.**, Wegner C.E., Lüke C, Glagolev MV, Filippov IV, Pimenov NV, Liesack W, Dedysh SN. 2014. Gammaproteobacterial methanotrophs dominate cold. methane seeps in floodplains of West Siberian rivers. Applied and Environmental Microbiology, 2014, V. 80(19), p. 5944-5954.

3. **Oshkin I.Y.**, Belova S.E., Danilova O.V., Miroshnikov K.K., Rijpstra W.I.C., Sinnighe Damste J.S., Liesack W., Dedysh S.N. 2016. *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov., a neutrophilic methanotroph from low-temperature terrestrial environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, V. 66(6), p. 2417-2423.

Результаты работы были также представлены на 4 международных и российских конференциях: VIII молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2012); 10th International Congress on Extremophiles (Extremophiles 2014) (Saint Petersburg, Russia, 2014); 19-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2015); 5 Всероссийском симпозиуме с международным участием» (Москва, 2015).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Хмеленина В.Н. (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

К автору диссертации имеется вопрос, на который желательно получить пояснение. Выделенный метанотроф и 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 рН 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.

Отзыв официального оппонента кандидата геолого-минералогических наук Ривкиной Е.М. (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- Во введении, в разделе актуальность (стр.6), при пересчете литературных данных Кати Волтер Антони (Walter Anthony et al., 2012) о потоке метана из сипов (141600 л сип-1 день-1) в весовые единицы, обнаруживается арифметическая ошибка. У Игоря Ошкина появилась цифра 8 т сип-1 день-1, а в действительности эта величина на два порядка меньше, 0.08 т сип-1 день-1.

- В обзоре литературы часто используется термин «геологический метан». Не вполне ясно, что автор понимает под этим термином. Чем геологический метан отличается от термокаталитического или термогенного?
- на рис. 1, стр. 14, относительный вклад природных и антропогенных источников метана в общий баланс хорошо было бы дать в процентах.
- на стр. 19 «И подледные, и некоторые поверхностные сипы высвобождали метан с низким содержанием ^{14}C ». Имеется ввиду, что он древний и весь радиоактивный метан распался? В тексте нет никакого вывода из этих данных.
- Стр. 19. «Арктика» пишется с большой буквы, это название.
- Подпись под рис 2, стр. 20, если рисунок не авторский, должна быть ссылка на первоисточник.
- На стр. 91 в формуле, расчета нуклеотидных оснований Г+Ц, вместо Тпл (температура плавления) написано Епл.
- на рис. 12. стр 102. Подпись к рисунку частично дана на английском, хотя используемые термины и названия без труда переводятся на русский язык.
- В работе кое-где пропущены запятые и встречаются грамматические ошибки, многие из которых можно считать описками.

Отзыв Ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- Можно по дискутировать с диссертантом относительно используемой им терминологии, например: «термическое происхождение метана», почему не термогенное? (стр.15); «геологический» или «экосистемный» метан (стр. 18), «локусы выхода метана» (в названии Главы 7, стр. 100). Существует четкое определение этих понятий, которых лучше придерживаться в дальнейшем.
- Проводилось ли измерение химических параметров в поровой воде грязевых излияний или только в водной фазе?
- В Главе 5 приводятся данные эмиссии метана для 28 метановых сипов, а в подрисуночной подписи рис. 10 говорится о построении графика по данным измерений потока метана из 149 метановых сипов (стр. 96).
- Почему для получения накопительных культур метанотрофных бактерий была использована более богатая минеральная среда, а для определения ростовых характеристик выделенного штамма Sph1 использовалась бедная минеральная среда (стр. 84 - 85)?
- Для более точного ответа относительно отсутствия анаэробного окисления метана в нижерасположенных зонах геологических структур хотелось бы порекомендовать

автору в дальнейшем исследовать и более глубокие слои почв. Возможно, что в более глубоких горизонтах концентрации возможных окислителей (нитратов, нитритов и сульфатов) будут более значимыми.

- Не совсем верны рассуждения автора о том, что для геологических источников (Заключение, стр. 119), каковыми автор обозначил метановые сипы, не характерен облегченный состав углерода метана. В качестве примера можно привести озеро Байкал, где в районах метановых сипов отмечается облегченный изотопный состав углерода метана, свидетельствующий о его биогенном происхождении (Калмычков и др., 2006, 2017).

На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:

1. Главный научный сотрудник лаборатории анаэробных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, канд. биол. наук Трошина О.Ю. Замечание: «... абсолютную неразборчивость дендрограммы на рис. 5, а также ошибку в условиях ПЦР-амплификации фрагментов гена *ptaA* на стр. 6».
2. Научный сотрудник лаборатории радиоактивных изотопов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, канд. биол. наук Розова О.Н., замечаний нет.
3. Зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского Отделения РАН – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского Отделения Российской академии наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета, академик РАН Ившина И.Б. Замечание: «... надо отметить допущенные диссертантом опечатки в наименовании выделенных штаммов CM7 или CMS7, SB1 SB12 (см. стр.15, 22, 23, а также в подписи к рис. 8 на стр.17)».
4. Профессор факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова, доктор биологических наук Манучарова Н.А. Замечаний нет.
5. Профессор кафедры биологии почв, факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова, доктор биологических наук Умаров М.М. Замечаний нет.
6. Научный сотрудник лаборатории реликтовых микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, канд. биол. наук Берестовская Ю.Ю. Замечаний нет.
7. Зав. лабораторией антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ «Прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, канд. биол. наук Фурсова Н.К. Замечаний нет.
8. Доцент кафедры физиологии растений и биотехнологии Биологического института Томского государственного университета, канд. биол. наук Франк Ю.А. и зав. кафедрой

физиологии растений и биотехнологии Биологического института Томского государственного университета, докт. биол. наук, профессор Карначук О.В. Замечаний нет.

9. Ассистент-исследователь Отдела патологии растений, Государственного университета Штата Айова, США, PhD, канд. биол. наук Погорелко Г.В.
10. Научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов в развитии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук, к.б.н. Козлов Е.Н. Замечаний нет.

В дискуссии приняли участие к.г.-м.н. Ривкина Е.М., д.б.н. Саввичев А.С., д.б.н. Назина Т.Н., Пименов Н.В.

Диссертационный совет отмечает, что диссертация Ошкина И.Ю., посвященная изучению метанотрофных сообществ холодных метановых сипов, является завершенной научно-квалификационной работой. В работе доказано, что основную роль в окислении метана, выделяющегося из сипов осадков северных рек Западной Сибири, играют метанотрофные бактерии I типа. Диссертантом определены скорости окисления метана, подсчитано общее количество метанотрофных бактерий и доказано, что они находятся в метаболически активном состоянии. Выделен и охарактеризован первый психротолерантный представитель рода *Methylovulum*, описанный в качестве нового вида этого рода, *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov. Полученные результаты вносят вклад в накопление знаний о разнообразии и экологии метанотрофных бактерий, изучение метанотрофных сообществ холодных экосистем, получение количественных параметров по эмиссии метана из геологических источников северных регионов, что соответствует п. 7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней».

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что в поймах притоков Оби и Иртыша выявлен ранее неучтенный и неисследованный источник поступления метана в атмосферу – холодные грязевые сипы. Впервые установлено, что выделяющийся из этих сипов метан имеет биологическое происхождение. Полученные данные полевых измерений эмиссии CH_4 из таких грязевых сипов важны для корректировки знаний об источниках и масштабах эмиссии геологического метана в атмосферу.

Расширены представления о микробных агентах, ответственных за окисление выделяющегося из сипов CH_4 в условиях низких температур. Показано, что основным компонентом метанооксиляющих сообществ, формирующихся в локусах выхода газа на поверхность, являются метанотрофные бактерии I типа. Описан и узаконен новый вид рода *Methylovulum* - *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov., представители которого способны к окислению CH_4 при низких температурах. Типовой штамм нового вида депонирован в

международных коллекциях микроорганизмов DSMZ и ВКМ. Нуклеотидные последовательности генов рода *Methylovulum* были широко представлены в общем пуле последовательностей, полученных в результате пиросеквенирования, что в совокупности с психротолерантными свойствами нового вида свидетельствует о важной роли этого микроорганизма в окисления метана, выделяющегося из сипов. Применительно к проблематике диссертации результативно использован современный метод пиросеквенирования гена *pmoA*, кодирующего ключевой фермент метанотрофов - мембранную метанмонооксигеназу. Оценка метанооксиляющей активности метанотрофного сообщества выполнена с привлечением радиоизотопного анализа. Для оценки численности метанотрофов применен метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что было проведено картирование распространения метановых сипов с оценкой величин потоков CH_4 из них в долине реки Мухринская, Ханты-Мансийский А.О. Получен ряд чистых культур метанотрофных бактерий, которые могут быть использованы в качестве биологических агентов окисления CH_4 при низких температурах. Существенно расширена база данных последовательностей генов *pmoA* метанотрофных бактерий, населяющих холодные местообитания. Совокупность полученных в настоящей работе последовательностей генов *pmoA* депонирована в GenBank.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов. Данные, представленные в работе, сопоставимы с результатами исследований экосистем со схожими характеристиками. Диссертационная работа Ошкина И.Ю. выполнена с применением комплекса методов – культуральных, физическо-химических и молекулярных, включая технологию высокопроизводительного секвенирования.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в получении исходных данных, активном участии на всех этапах научных экспериментов, в обработке и интерпретации экспериментальных данных, а также в подготовке публикаций по выполненной работе.

Диссертация Ошкина И.Ю. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого арсенала современных методов и взаимосвязанностью выводов и результатов. Диссертация соответствует профилю Совета и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с «Положением о порядке присуждения ученых степеней».

