

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ЛИН СО РАН)**

Ул. Улан-Баторская, д. 3, а/я 278, г. Иркутск, 664033
Тел.: (3952) 42-65-04, факс: (3952) 42-54-05
www.lin.irk.ru; E-mail: info@lin.irk.ru

От 2.06.2017 № 15856-2115-423

на № 12307-622419-4 от 15.05.2017

[Отзыв ведущей организации
по кандидатской диссертации]

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Лимнологического института Сибирского
отделения Российской академии наук
д.г.-м. н. А. П. Федотов



2 июня 2017 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Ошкина Игоря Юрьевича «Микробные агенты окисления метана в холодных сипах осадков северных рек» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертации для науки и практики. Исследование циклов одного из «greenhouse» газов – метана, имеет общемировое значение и привлекает внимание ученых из разных стран. Эти исследования направлены на оценку потоков метана из различных водных резервуаров, включая метановые сипы, газогидратные поля, рыбоводные пруды и озера (Macelloni et al., 2013; Schubotz et al., 2011; Zhang et al., 2015; Malinverno, Goldberg., 2015, Holgerson, Meredith, 2015; Simek et al., 2014; Bannert et al., 2012). При обсуждении глобального цикла углерода рассматриваются не только крупные источники этого газа в морских экосистемах, а также рисовые чеки, торфяники, термитники, районы вечной мерзлоты и более мелкие экосистемы. Большое внимание уделяется изучению влияния изменений климата на баланс метана в разных экосистемах. Были высказаны опасения, что из-за глобального потепления при таянии мерзлоты и растворении гидратов метана в атмосферу могут поступать значительные объемы метана, что будет способствовать дальнейшему потеплению климата.

В последние десятилетия внимание исследователей из разных стран в большей степени было сосредоточено на исследовании источников метана в разных частях Мирового океана, где были идентифицированы многочисленные сипы, грязевые вулканы, доказано наличие в этих зонах аэробного и анаэробного окисления метана, описаны новые биологические сообщества, в том числе микроорганизмы, обеспечивающие протекание разных процессов. Аналогичные наземные структуры, являющиеся также источниками метана и других газов, остаются практически не исследованными, не смотря на их значимый вклад в общий баланс парниковых газов.

Исследования микроорганизмов, обеспечивающих окисление метана в таких экотопах, также весьма фрагментарны. Диссертационная работа Ошкина Игоря Юрьевича восполняет этот пробел, в ней представлены результаты исследования небольших, но весьма многочисленных, наземных метановых сипов, обнаруженных в поймах рек Обь и Иртыш. Получение новых знаний о наземных метановых сипах в районах вечной мерзлоты, идентификация ключевых микробных агентов, ответственных за окисление CH_4 , выделение новых для науки видов микроорганизмов весьма **актуально и имеет фундаментальную и практическую значимость**. Следует отметить четко сформулированную цель работы и поставленные задачи, для чего автором последовательно привлекались литературные данные по исследованию агентов окисления метана в разных холодноводных экосистемах.

Основные научные результаты и их значимость для науки и практики. Диссертация Ошкина И.Ю. построена традиционно в соответствии с официальными правилами, она разбита на три части, состоящие из 8 глав, включающих введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение и выводы. Диссертация изложена на 160 страницах, содержит 18 рисунков, 9 таблиц. Литературный обзор включает 272 источника, в том числе 13 публикаций на русском языке. Следует отметить, что в обзоре также представлены публикации российских ученых, опубликованные в международных изданиях. Литературный обзор (Глава 2) включает анализ источников по различным научным областям знаний, и включает обзор исследований генезиса метана, оценок его эмиссии в разных регионах мира и типах геологических структур, а также всесторонний анализ метанотрофных бактерий, участвующих в окислении метана. В Главе 2 рассмотрены морфология, метаболизм метанотрофных бактерий, их филогения и таксономическая принадлежность, а также молекулярные методы, используемые для их детекции, определены наиболее эффективные подходы для решения, поставленных диссертантом задач. Автор хорошо ориентируется в систематике и филогении метанотрофных бактерий, приводит используемые для их классификации морфологические и физиолого-биохимические характеристики. Филогенетический анализ последовательностей метанотрофных бактерий из разных экосистем свидетельствует о наличии в разных экосистемах некультивируемых кластеров и, таким образом, служит основанием для поиска новых таксонов метанотрофных бактерий и выделения чистых культур. В отдельном разделе проанализированы сведения о метаболизме метанотрофных бактерий и ключевых ферментов, обеспечивающих разные этапы окисления метана, их локализация и функции.

Ошкин И.Ю. показал широкое владение различными методами и подходами, следует отметить продуманное и последовательное их применение для решения поставленных задач. Обоснован набор праймеров для детекции метанотрофных бактерий в природных образцах, а также для филогенетического анализа и детекции функциональных генов в накопительных и чистых культурах.

Полученные И. Ю. Ошкиным результаты и их обсуждение представлены в трех главах. Большим достоинством работы является междисциплинарный подход в исследовании, включающий характеристику геологических структур, физико-химические параметры, анализ метанотрофных сообществ, осуществляющих разные этапы окисления метана. Полученные им данные логически увязываются с литературным обзором и используемыми в исследовании методами. В Главе 5 рассмотрены типы структур выходов газа, осуществлено их картирование на местности, определены физико-химические параметры водных и грязевых потоков. Практическую значимость имеют непосредственные измерения потоков метана, проведенные автором на нескольких сипах. Эти данные позволяют более точно рассчитать интенсивность потоков метана в атмосферу и таким образом корректировать количественные данные скоростей эмиссии метана в северных районах, где выявляются аналогичные геологические структуры. Исследование количественных показателей метанотрофных бактерий, проведенное с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ*, свидетельствует о их значительном вкладе в микробные сообщества поверхностных слоев метановых сипов, а дополнительные измерения потенциальной скорости процесса окисления CH_4 доказывают существование природного биофильтра, обеспечивающего уменьшение поступления метана в атмосферу. Можно отметить, что скорость окисления метана в обследованных структурах сопоставима с отмечаемой нами в зоне глубоководных метановых сипов в озере Байкал (Захаренко и др., 2015). Ошкин И. Ю. изучил разнообразие метанотрофных бактерий с использованием платформы массового параллельного секвенирования GS FLX Titanium. Применение двух пар праймеров на ген *pmoA* значительно расширило оценку разнообразия исследуемых ампликонов, выявило достоинства и недостатки используемых праймеров, а филогенетический анализ последовательностей наиболее многочисленных ОТЕ показал наличие в сообществе некультивированных представителей метанотрофных бактерий. Совершенно логичным было выделение, последующее исследование и описание новых для науки видов метанотрофных бактерий из исследуемых экотопов. При культивировании природного сообщества на разных питательных средах и при разных температурах Игорю Юрьевичу удалось выделить и исследовать три штамма, один из которых описан как новый для науки вид. Филогенетический анализ разных генов этого вида позволил не только установить отдаленное родство с видом *Methylovulum miyakonense*, но также оценить представленность в исследованном сообществе. Исследование морфологии, физиолого-биохимических свойств, состава жирных кислот, структуры последовательностей гена 16S рРНК свидетельствовали, что штамм Sph1 отличается от известных культивируемых видов, является облигатным метанотрофом, способным расти при pH 5.2 – 8.1 и в широком диапазоне температур. Таким образом, на основании анализа исследованных характеристик, данный штамм был описан как новый вид *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov., кроме того, проведено уточнение описания рода *Methylovulum*.

В Заключении диссертантом подведены итоги исследования, свидетельствующие о наличии в районе вечной мерзлоты большого количества геологических структур, через которые происходит разгрузка в атмосферу метана. Автором обнаружены и картированы многочисленные наземные сипы, через которые в атмосферу поступают значительные концентрации метана. В поверхностных слоях этих геологических структур формируется сообщество, большая часть которого ориентирована на осуществление различных шагов окисления метана в аэробных условиях, способных существовать в широком диапазоне температур. Поэтому данные биотопы служат своеобразным биофильтром, обеспечивающим окисление метана в низкотемпературных условиях, и в конечном итоге, обеспечивают уменьшение эмиссии в атмосферу одного из парниковых газов – метана.

Работа производит очень хорошее впечатление, легко читается, написана грамотно, опечатки встречены в единичных случаях. Это цельное исследование, отвечающее на поставленные задачи и имеющее перспективу для дальнейших исследований. Тем ни менее при чтении у нас возникло несколько замечаний и уточняющих вопросов.

1. Можно подискутировать 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.
2. Проводилось ли измерение химических параметров в поровой воде грязевых излияний или только в водной фазе?
3. 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).
4. 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)?
5. 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.
6. 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).

Представленная работа, несомненно, является современным законченным научным трудом, имеющим фундаментальное и практическое значение в области микробиологии и экологии микроорганизмов. Выводы диссертации соответствуют поставленным целям и задачам, для их достижения применялись современные методы и подходы. Полученные результаты могут быть использованы при уточнении баланса метана в глобальном цикле углерода, а выделенные штаммы для дальнейшего использования для биотехнологических задач. Кроме того, полученные данные могут использоваться при оценке экологических рисков в холодных регионах мира.

Диссертационная работа характеризует Ошкина И.Ю. как квалифицированного специалиста, способного грамотно формулировать цели исследований, успешно решать поставленные экспериментальные задачи и анализировать полученные результаты, применяя разнообразные методы.

Автореферат диссертации отражает основное содержание проведенных научных исследований, содержание автореферата совпадает с содержанием диссертации. Полученные результаты опубликованы в 3 рецензируемых научных журналах из перечня ВАК РФ (Микробиология, Applied and Environmental Microbiology, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) и представлены на 4 научных конференциях в России.

Диссертация **Ошкина Игоря Юрьевича «Микробные агенты окисления метана в холодных сипах осадков северных рек»** отвечает требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и критериям, установленным п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (в редакции постановления Правительства РФ № 842 от 24.09.2013). Автор диссертации **Ошкин И.Ю.** заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности **03.02.03 – микробиология.**

Отзыв обсужден и утвержден на научном семинаре лаборатории микробиологии углеводов ЛИН СО РАН, 2017 г., (протокол № 11 от 2.06. 2017 г.); основное направление научно-исследовательской работы лаборатории соответствует тематике диссертации.

Отзыв подготовлен:
зав. лаб. микробиологии углеводов
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Лимнологического института
Сибирского отделения Российской академии наук

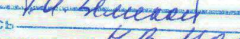
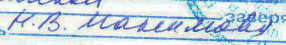
доктор биологических наук



Тамара Ивановна Земская

(адрес: 664033, Иркутск, Улан-Баторская, 3),
Тел. 8(3952) 42-19-89, E-mail: tzema@lin.irk.ru

2.06.2017 г.

Подпись	
ученый секретарь	
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН)	
« 02 » июня 2017 г.	

