

7 замеч.

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации В.В. Кадникова «Молекулярный анализ микробных сообществ мест залегания углеводородов на дне озера Байкал», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03. – Молекулярная биология

Диссертационная работа В.В. Кадникова посвящена изучению состава микробных сообществ, обитающих в местах залегания гидратов метана и битумных холмов, сформировавшихся в зоне естественных выходов нефти, на дне озера Байкал. Результаты изучения состава микробного сообщества в зоне залегания гидратов метана в пресноводном водоеме характеризуются абсолютной новизной. В работе использовали современный молекулярно-биологический метод анализа микробного сообщества, основанный на пиросеквенировании фрагментов ДНК и их последующем биоинформатическом анализе. На основе ДНК, выделенной из придонной воды, верхнего и глубинного слоя осадков, содержащего газосодержащие гидраты метана, были получены и проанализированы 3 библиотеки, включающие суммарно более 70 тысяч генов 16S рРНК бактерий и архей. В составе полученных последовательностей выявлены гены как известных прокариот, так и представителей новых филогенетических ветвей. Анализ клонированных последовательностей гена А-субъединицы метил-коэнзим М редуктазы и транслированных аминокислотных последовательностей позволил выявить их принадлежность метаногенным археям.

Состав микробных сообществ, обитающих в зоне двух естественных выходов нефти на дне озера Байкал, был определен на основе анализа более 13500 последовательностей генов 16S рРНК, *Mcra* и *alkB*. Выявленные отличия в составе сообществ обеих построек соискатель связывает с различием углеводородного состава битумных построек. В работе сделано сопоставление результатов молекулярно-биологических исследований и экологических условий этих местообитаний, позволившее сделать обоснованные предположения о механизме биodeградации углеводородов в постройках.

Полученные результаты опубликованы в 2-х статьях в журналах «FEMS Microbiology Ecology» и английской версии журнала «Микробиология» и представлены на 9-ти российских и международных конференциях.

Замечание по автореферату касается неудачных выражений: «кандидатный филум JS1» (с. 10) вместо филум-кандидат JS1; «структура микробного сообщества» вместо «состав сообщества»; «сбраживатели (бактерии и археи)» (рис. 6, с. 15) вместо



«бродильные прокариоты». В автореферате имеются опечатки, отсутствует обозначение осей на графике 3 (с. 5), без перевода дан термин «garefaction» в названии этого же рисунка. Сделанные замечания не снижают общего положительного впечатления о работе.

Материалы, приведенные в автореферате В.В. Кадникова, позволяют сделать вывод о том, что его диссертация «Молекулярный анализ микробных сообществ мест залегания углеводов на дне озера Байкал» является законченной научно-квалификационной работой, соответствует специальности 03.01.03 – молекулярная биология и удовлетворяет требованиям п. 9. «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор – Кадников Виталий Валерьевич – заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук.

Назина Тамара Николаевна  
Доктор биологических наук, зав. лабораторией  
нефтяной микробиологии Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки  
Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского  
Российской академии наук  
(117312, г. Москва, проспект 60-летия Октября,  
д. 7, корп. 2  
[www.inmi.ru](http://www.inmi.ru), тел. (499) 135-21-39  
Электронная почта: [nazina@inmi.host.ru](mailto:nazina@inmi.host.ru)

*Назина*





**ОТЗЫВ**  
**на автореферат диссертации В.В. Кадникова**  
**«Молекулярный анализ микробных сообществ мест залегания**  
**углеводородов на дне озера Байкал», представленной на соискание**  
**ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03**  
**«молекулярная биология».**

Микроорганизмы играют одну из ключевых ролей в круговороте углерода в природе. Диссертационная работа В.В. Кадникова посвящена изучению биоразнообразия микроорганизмов обитающих на дне озера Байкал в местах залегания газовых гидратов, а также выходов углеводородов. В работе В.В. Кадникова впервые проведена глубокая характеристика состава микробных сообществ ассоциированных с местами залегания газовых гидратов на дне пресноводного озера Байкал. В донных осадках выявлены новые филогенетические группы микроорганизмов, которые, как предполагает автор, являются эндемичными для Байкала. Полученные в работе данные подтверждают гипотезу о биогенном происхождении донных гидратов метана.

В целом диссертационная работа В.В. Кадникова, выполнена на высоком методологическом уровне, с применением современных методов молекулярной биологии и вычислительных методов биоинформатики. Сделанные в работе выводы обоснованы и логично вытекают из результатов исследования. Полученные результаты работы опубликованы в ведущих научных журналах и представлены на российских и международных конференциях.

В целом автореферат диссертационной работы В.В. Кадникова оставляет приятное впечатление. Работа отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительством Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Кадников В.В., заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заведующий лабораторией инженерии ферментов  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра  
«Биоинженерия» Российской академии наук

117312, г.Москва, просп. 60 –летия Октября, д.7, корп.1  
тел. (499) 1356556, факс (499) 1350571, эл почта varlamov@biengi.ac.ru

доктор химических наук, проф.  Варламов Валерий Петрович

Подпись Варламова В.П. заверяю:  
Ученый секретарь  
Центра "Биоинженерия" РАН  
кандидат биол. наук

27 октября 2014 г.



 Степанова Наталья Глебовна



ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации Кадникова Виталия Валерьевича  
«Молекулярный анализ микробных сообществ мест залегания  
углеводородов на дне озера Байкал», представленной на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук по специальности  
«молекулярная биология»- 03.01.03.

Диссертационная работа В.В. Кадникова посвящена определению таксономического состава микроорганизмов и реконструкции путей метаболизма микробных сообществ, ассоциированных с естественными выходами углеводородов на дне озера Байкал. Для достижения поставленной цели объектами исследования выбраны микробные сообщества (1) мест залегания газовых гидратов в районе «Санкт-Петербург», (2) битумных построек №3 и №8, образовавшихся в результате просачивания нефти на дне озера Байкал. В ходе исследования решены следующие задачи:

1. На основании нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК методом пиросеквенирования определены таксономические структуры сообществ микроорганизмов.

2. Идентифицированы и проанализированы гены, кодирующие ферменты ключевых процессов, протекающих в исследуемых экологических нишах.

3. На основании полученных данных предложена схема экологической взаимосвязи микроорганизмов, приводящая к образованию исследуемых экологических ниш. экологические ниши озера Байкал

Поставленные задачи решены в полном объеме. Представленные в автореферате диаграммы структур микробных сообществ и филогенетические деревья последовательностей свидетельствуют о большом объеме проведенных исследований.

Особо стоит отметить практическую значимость данной работы, обусловленную перспективами использования гидратов метана в промышленной энергетике. Проведенные исследования подтвердили биогенное происхождение гидратов метана на дне озера Байкал, что позволяет рассматривать их как возобновляемые источники энергии. Полученные данные о метаболическом потенциале микроорганизмов, обитающих в местах выходов нефти, могут стать основой для разработки технологий по биоремедиации нефтяных загрязнений в холодных водных экосистемах с помощью психрофильных микроорганизмов. Открытые эндемичные группы микроорганизмов, представляют большой интерес для промышленной биотехнологии в качестве источников новых ферментов.

Также стоит отметить, что для решения поставленных задач в работе использовались современные методы молекулярной биологии и это, несомненно, является достоинством работы в целом и

свидетельствует об умении диссертанта осваивать и применять новые методы для решения поставленных задач.

В целом, автореферат позволяет сделать вывод о том, что автором выполнено полномерное и тщательное исследование в области экологии микроорганизмов уникальной экосистемы озера Байкал. Полученные автором результаты достоверны, заключения и выводы обоснованы. Результаты работы опубликованы в ведущих журналах и представлены на международных и всероссийских конференциях.

В целом, диссертация отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановления Правительством Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Кадников В.В., заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

30.10.2014

Старший научный сотрудник  
лаборатории инженерной энзимологии  
Института биохимии им. А.Н. Баха РАН  
119071, г.Москва, Ленинский просп., д.33, корп.2  
тел. (495) 9545283, факс (495) 9542732, эл почта eubez@inbi.ras.ru

кандидат химических наук

Безуднова Екатерина Юрьевна

Подпись Безудновой Е.Ю. заверяю:

Ученый секретарь  
ИНБИ РАН  
к.б.н.



Орловский Александр Федорович





Center "Bioengineering" RAS  
Scientific Counsel D. Lomonosov  
Moscow State University. DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY AND PLANT BIOLOGY

*The University of Oklahoma*

The thesis presented by Vitaliy Valeryevich Kadnikov "Molecular analysis of microbial communities at hydrocarbon bottom deposits of Lake Baykal" is a valid contribution in molecular ecology of unique microbial communities.

First subject in the presented research is a study of microbial composition of gas hydrate community. Gas hydrates is a gigantic storage of reduced carbon and potentially can serve as a source of energy. Their uncontrolled "melting" can release huge amounts of green-house gas methane resulting in severe climate consequences. That is why, it has been a significant interest in microbial communities associated with gas hydrates, as microbial communities are playing critical role in maintaining its stability and composition. The Author performed a detailed molecular study showing the composition of bacterial and archaeal communities. He demonstrated that sediment community associated with gas hydrates was different from general water population. Moreover, he identified deeply branched groups affiliated specifically with Lake Basykal: Baykal 1 and Baykal 2. Using molecular technique, the Author convincingly demonstrated that genes from archaeal community encoding the key enzyme of methanogenesis pathway – methyl-CoM reductase (McrA) were clustered with McrA of methane producing archaea rather than methane oxidizing archaea (ANME-2 and ANME-3). These findings supported geochemical data obtained by other researchers that had indicated biological nature of gas hydrate origin. The Author has been discussing the biological process of gas hydrates development in details in his thesis.

Another interesting subject in the dissertation is devoted to microbial community of oil and bitumen deposits at the bottom of Baykal Lake. The community thriving there is based on hydrocarbon degradation. The Author analyzed the composition of bacterial and archaeal communities associated with hydrocarbon subsurface field. He detected beta-proteobacteria affiliated with *Burkholderia* and *Ralstonia* that are able to oxidize hydrocarbons using  $O_2$  as an electron acceptor. It makes perfect sense as water column in the lake contains oxygen. The most abundant *Pseudomonas* (17%) can also oxidize hydrocarbons aerobically. We can certainly expect anaerobic hydrocarbon degradation occurring on site. Indeed, The Author detected delta proteobacteria but could not see "known" sulfate reducers. However, I'm not sure that potential anaerobic hydrocarbon oxidizers have been revealed, because no interrogation of DNA for alkylsuccinate synthase genes (ass) and benzylsuccinate synthase (bss) genes hadn't been done. Had it been done, it might have revealed organisms that could degrade hydrocarbons anaerobically. Meanwhile, detection of *Syntrophus* and *Syntrophobacter* genera may indicate syntrophic hydrocarbon degradation, when electrons from a hydrocarbon is channeled to a methanogenic partner. This process can contribute to total methane production in the Lake Baykal.

In general it is a very interesting study that gives us an opportunity to understand unique and intriguing microbial community thriving at the bottom of Baykal Lake.

The Author performed a thorough study. He is familiar with modern molecular techniques and bioinformatics tools. What is especially important and valuable, he was able to incorporate his research in the body of geochemical studies, performed by other teams contributing to a "big picture". Vitaliy Kadnikov is definitely deserves a PhD degree he is seeking.

Irene A. Davidova, PhD  
Research Professor,  
Department of Microbiology and Plant Biology  
University of Oklahoma,  
Norman, Oklahoma, U.S.A.

  
October 24, 2014





## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Кадникова Виталия Валерьевича  
«МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ МЕСТ  
ЗАЛЕГАНИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ НА ДНЕ ОЗЕРА БАЙКАЛ»,  
представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Недостаточность современных данных о микробиологических процессах в природных экосистемах во многом связана с ограничениями подходов, основанных на культивировании. Применение современных молекулярно-биологических подходов и высокопроизводительного секвенирования позволяет получить информацию о ключевых метаболических процессах в микробных сообществах без культивирования. На основе метагеномных данных могут быть реконструированы трофические связи в микробном сообществе.

Диссертация В.В. Кадникова посвящена исследованию структуры сообществ микроорганизмов в местах залегания гидратов метана и естественных выходов нефти на дне оз. Байкал и реконструкции их метаболизма. В основе работы – идентификация и анализ гена 16S рРНК и функциональных генов методом пиросеквенирования. В частности, проведен поиск и анализ гена *mcrA*, кодирующего А-субъединицу метил-коэнзим М редуктазы у метаногенных и метанотрофных архей, и гена *alkB*, кодирующего алкан-гидроксилазы бактерий.

Автором выполнен значительный объем исследований. Проанализированы микробные сообщества, ассоциированные с газовыми гидратами в придонной воде и поверхностном слое осадка оз. Байкал, и микробные сообщества битумных холмов в зонах естественных выходов нефти на дне озера. Показано, что в районе залегания гидратов метана в придонной воде и поверхностном слое осадка преобладают гамма-протеобактерии. В более глубоком слое осадка доминирующими группами бактерий являются *Chloroflexi*, JS1 и *Caldiserica*. Интересно, что более 90% найденных архей не имеют ближайших культивируемых родственников, часть из них эндемична для оз. Байкал. В результате анализа генов *mcrA* и *alkB* установлено преобладание метаногенов над анаэробными метанотрофами, а также присутствие аэробных бактерий, окисляющих н-алканы в зоне битумных построек.

Диссертация отличается научной новизной. Впервые проведен анализ микробных сообществ, ассоциированных с гидратами метана в пресноводной

экосистеме, с применением пиросеквенирования. Идентифицированы новые филогенетические линии прокариот. Практическая значимость работы обусловлена перспективами использования гидратов метана в качестве источника энергии и применения психротолерантных прокариот для биоремедиации.

Полученные результаты опубликованы в ведущих научных изданиях и соответствуют самому высокому уровню исследований в области молекулярной экологии микроорганизмов. Поставленные задачи выполнены полностью, выводы отражают содержание работы. Судя по автореферату, диссертация В.В. Кадникова удовлетворяет всем требованиям ВАК, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Доцент кафедры  
физиологии растений и биотехнологии  
Томского государственного университета,  
к.б.н.

Ю.А. Франк

Заведующий кафедрой  
физиологии растений и биотехнологии  
Томского государственного университета,  
д.б.н., профессор

О.В. Карначук

21.10.2014 г.





## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Кадникова Виталия Валерьевича

«Молекулярный анализ микробных сообществ мест залегания углеводородов на дне озера Байкал», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация В.В. Кадникова посвящена изучению структуры микробных сообществ в районах залегания гидратов метана и природных выходов нефти на дне Байкала с использованием молекулярных методов идентификации микроорганизмов на основе нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S РНК, а также генов, кодирующих ключевые процессы цикла метана.

Актуальность работы В.В. Кадникова определяется неослабевающим интересом специалистов многих научных направлений к изучению функционирования экосистемы озера Байкал – единственного в мире пресного водоема, где в осадочной толще обнаружены масштабные залежи газогидратов метана. Измерения  $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$  указывают на то, что во многих газонасыщенных и газогидратсодержащих осадках преобладает изотопно легкий метан микробного происхождения. В этой связи представляют несомненный интерес исследования микробного сообщества, ассоциированного с газогидратами и газонасыщенными осадками грязевых вулканов и нефтепроявлений на дне Байкала.

Научная новизна работы состоит в том, что впервые в пресном водоеме методом высокопроизводительного пиросеквенирования удалось детально исследовать структуру микробного сообщества, ассоциированного с газогидратами, идентифицировать новые физиологические линии микроорганизмов, установить, что состав микробного сообщества Байкала существенно отличается от состава сообществ морских газогидратсодержащих осадочных отложений. Отсутствие сульфатов и данные молекулярного анализа позволили предположить, что в подповерхностных анаэробных осадках Байкала доминируют процессы генерации метана при участии метаногенных архей, а поверхностные окисленные осадки и придонная вода являются местом обитания метанотрофных бактерий, осуществляющих аэробный процесс окисления метана.

Детально исследованы битумные постройки, выявленные в районах нефтепроявлений. Определены бактериальный и архейный компоненты микробных сообществ таких построек, а также идентифицированы гены алкан-гидролаз. Предложены



механизмы деградации углеводородов битумных построек как аэробным, так и анаэробным синтрофным микробным сообществом, включающим дельта-протеобактерии и метаногенные археи.

В качестве замечания хотел бы обратить внимание на вывод 7: «Данные о структуре исследованных микробных сообществ подтверждают гипотезу о биогенном происхождении гидратов метана в озере Байкал». Такой вывод вполне справедлив для конкретного исследованного полигона Центрального Байкала, но не может быть распространен на все озеро, поскольку, например, в осадках нефтегазопроявления Горевой Утес, а также в пределах полигона «Посольская банка» присутствует метан термогенного генезиса ( $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4 = -44.5 \div -37.9\%$  и  $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4 = -48.5 \div -40.6\%$  соответственно).

Отличительной особенностью рецензируемой работы является большой объем молекулярно-биологических исследований, выполненных на самом современном оборудовании, полностью соответствующем мировому уровню. Эмпирические авторские данные, представленные в работе, не вызывают сомнения в их достоверности, а полученные результаты обладают необходимой научной новизной, теоретической и практической значимостью. Результаты работы В.В. Кадникова опубликованы в ведущих профильных журналах, а неоднократные выступления автора с оригинальными экспериментальными данными на международных конференциях подтверждают актуальность проводимых исследований. Автореферат диссертации полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и Виталий Валерьевич Кадников заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Зам. директора Института микробиологии  
им. С.Н. Виноградского РАН, зав. лабораторией  
редиктовых микробных сообществ,  
доктор биол. наук



Н.В. Пименов

СОБСТВЕННОРУЧНАЯ ПОДПИСЬ  
ГОВ. Н. В. Пименова  
УДОСТВЕРЯЕТСЯ.  
Подпись Пименов 17.10.2014