

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Потапова Сергея Анатольевича «Вирусные сообщества в оз. Байкал» 03.02.08 – Экология (биологические науки), представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

«03.02.08 – Экология (биологические науки)»

Актуальность исследуемой темы диссертации. Сегодня в эпоху коронавирусной глобальной пандемии COVID-19 особую значимость приобрели фундаментальные исследования эколого-генетической природы вирусов. Как известно, вирусы – это облигатные внутриклеточные паразиты, генетическая матрица которых представлена молекулами ДНК или РНК. Они заключены в белковый капсид, а некоторые из них имеют липидную мембранную оболочку. Вирусы поражают все типы организмов, от растений, животных, бактерий, архей, грибы и даже способны реплицироваться только в присутствии других вирусов (вирусы-сателлиты). Они также обнаружены почти в каждой экосистеме на Земле и являются самой многочисленной биологической формой. На сегодня классифицированы более 6 тысяч видов вирусов, хотя предполагают, что их существует более ста миллионов. Одним из самых древних представителей класса вирусов являются вирусы бактерий и архей, называемых бактериофагами. Они размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис. Также активно участвуют в круговороте химических веществ и энергии, оказывают заметное влияние на эволюцию микробов и бактерий. В природных условиях фаги встречаются в тех местах, где есть чувствительные к ним бактерии. Чем богаче тот или иной субстрат (почва, выделения человека и животных, вода и т. д.) микроорганизмами, тем в большем количестве в нём встречаются соответствующие фаги. Особенно большое количество бактериофагов содержится в водной среде и донных отложениях. Высокий уровень специализации, долгосрочное существование, способность быстро репродуцироваться в соответствующем хозяине способствует их сохранению в динамичном балансе среди широкого разнообразия видов бактерий в любой природной экосистеме.

Поэтому значимость темы диссертационной работы Потапова С.А., целью которой является установление генетического разнообразия и структуры вирусных сообществ планктона, нейстона и перифитона оз. Байкал, а также количественных показателей и динамики развития планктонных вирусов в пелагиали с учетом абиотических и биотических факторов среды очень высока. Как указывает автор,

первые данные о высокой концентрации бактериофагов в воде оз. Байкал получены в 2000 году благодаря методу эпифлуоресцентной микроскопии, а далее посредством электронной микроскопии была описана их морфология, определены их численность, сезонная и межгодовая динамика. В работе в основном исследуются бактериофаги рода Т4-подобных вирусов («Т4-like viruses») из семейства Myoviridae. Т4-бактериофаги обладают высокой литической активностью и вызывают гибель клеток хозяина, обуславливая высокую экологическую значимость для водных биоценозов. Как указывает автор работы разнообразие Т4-подобных бактериофагов в северной и южной котловинах оз. Байкал впервые описано только в 2008 г. Вследствие отсутствия универсального генетического маркера для поиска и идентификации данных фагов было чрезвычайно сложно проводить изучение их сообществ в озере Байкал. Но, в последние годы методы высокопроизводительного секвенирования позволили расширить возможности изучения биоразнообразия, структуры и функционального потенциала фаговых сообществ. По утверждению Потапова С.А. до настоящего исследования не было сведений не только о виромах пелагиали озера Байкал, но и о виромах других древнейших озер мира, как и о влиянии на состав и структуру вирусных сообществ абиотических и биотических факторов среды. Поэтому, результаты представляемой работы несомненно актуальны и значимы не только в оценке разнообразия Т4-подобных фагов в одном из древнейших озер (более 20 миллионов лет), но и в исследованиях их сообществ в других водных экосистемах мира.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Все вышеизложенное позволяет считать, что изучение закономерностей формирования разнообразия Т4-подобных фагов в озере Байкал в конкретных экологических и климатогеографических условиях их циркуляции, посредством использования новых методов секвенирования и их программного анализа является актуальным и своевременным. Исходя из этих положений Потапов С.А. обосновано выстроил цель и задачи в своей работе, позволяющих изучить влияние факторов среды обитания на формирование разнообразия Т4-подобных фагов в озере Байкал с последующим выявлением причинно-следственной зависимости от абиотических (температура, содержание биогенов) и биотических (численность вирусных частиц) факторов среды обитания. Считаю, что представленные основные положения, выносимые на защиту соответствуют целям и задачам темы диссертации. Как видно из научных данных, полученных в ходе реализации основных положений диссертации,

Потаповым С.А. четко обозначены научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Так, автором была впервые проведена количественная оценка вирусных частиц и бактерий в озера Байкал методом проточной цитометрии, определены экологические факторы, влияющие на численность микробных сообществ. Наибольшее влияние на численность вирусных частиц в оз. Байкал оказывает количество бактерий и температура воды. Выполнен анализ гена g23 T4-подобных бактериофагов методом высокопроизводительного секвенирования. Дана сравнительная характеристика генетического разнообразия g23-сообществ поверхностного микрослоя воды, водной толщи и биоплёнок, сформированных на камнях и губках. Получены данные о высоком разнообразии сем. Myoviridae. Выявлена группа байкальских T4-цианофагов, поражающих пикоцианобактерии. Впервые выполнено метагеномное секвенирование вирусных сообществ в пелагиали оз. Байкал, установлены состав и структура виромов, проведена функциональная аннотация генов. Методами главных компонент и многомерного неметрического шкалирования проанализированы вирусные сообщества ряда водных экосистем. Показано, что морфометрические показатели и трофический статус водоёмов влияют на состав виромов. Установлена клада «великих озёр мира». Сравнительный анализ виромов выявил их существенные различия в зависимости от физико-химических условий среды и состава бактериопланктона. Эти данные дают новую информацию о характерных особенностях формирования сообщества T4-подобных бактериофагов на биоплёнках, сформированных на камнях и губках в литоральной зоне озера Байкал, образуя с планктонными фагами пелагиали общий «байкальский» кластер. Также отмечается, что фаги поверхностного микрослоя воды озера заметно отличаются от фагов «байкальского» кластера, при этом вирусные сообщества всех экотопов озера формируют общую кладу с полярными фагами.

В диссертации обосновано анализируются и оцениваются значимость полученных теоретических результатов и перспективы практического использования полученных выводов в качестве основы для проведения дальнейших исследований по углублению фундаментально-прикладных аспектов этой важной темы. Так, результаты диссертационной работы существенно дополняют и расширяют имеющиеся в литературе сведения о таксономическом составе вирусных сообществ в водных экосистемах и, в частности, о биоразнообразии T4-подобных вирусов сем. Myoviridae. Полученные в работе последовательности и массивы данных NGS зарегистрированы в базах MG-RAST, NCBI и могут быть использованы при сравнительном анализе других водоёмов. Метод проточной цитометрии,

примененный для учета вирусных частиц и бактерий, а также качественного анализа проб, дал возможность с меньшими затратами времени произвести достоверную оценку микробных сообществ озера Байкал, что позволяет рекомендовать его для мониторинга ультрамикропланктона водных экосистем. Используемые в работе методы и подходы могут быть востребованы государственными органами РФ для контроля качества воды, выявления патогенных вирусов человека и животных. Присутствие Т4-подобных фагов является косвенным подтверждением наличия условно-патогенных и патогенных бактерий, их идентификация и оценка биоразнообразия имеют значимость для санитарных служб. Такая практическая перспектива во многом позволит повысить качество питьевой воды озера Байкал, ценность которой с каждым годом возрастает в связи с глобальной экологической проблемой загрязнения водной среды продуктами антропогенных и техногенных факторов деятельности человеческой цивилизации.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. Личное участие соискателя в выполнении данной диссертационной темы является преобладающим. Диссертационная работа является результатом исследований автора, выполненных согласно планам научно-исследовательских работ в лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН в рамках базовых проектов и грантов РФФИ. Фактические данные получены соискателем при его непосредственном участии в экспедиционных и лабораторных работах, включая анализ и обобщение полученных результатов в течение 2008-2019 гг.

Полнота изложенных материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. Считаю, что по материалам диссертационной работы опубликовано более чем достаточного количества работ, необходимых для представления диссертации к защите по требованию ВАК. Так, по результатам исследования опубликовано 27 научных работ: одна монография, 12 статей, входящих в список ВАК, 6 статей в изданиях, включённых в систему цитирования Web of Science. Результаты исследований также были доложены в работе 14 конференций. Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 156 страницах, содержит 11 таблиц и 25 рисунков. Список литературы включает 298 источников, из которых 24 на русском языке и 270 на иностранных языках и 4 источника интернет ресурсов. Таким образом, структура, содержание и объем библиографической литературы, представленные в работе достаточны для освещения как проблематики диссертационной темы, так и результатов, полученных в ходе исследования.

Оценка соответствия структуры и содержания диссертации специальности, по которой она представлена к защите. Во введении соискателем достаточно полно и убедительно представлены проблемность и актуальность исследования. Четко были сформулированы цель и задачи исследования, определены научная новизна и практическая значимость, представлены основные положения, выносимые на защиту.

Результаты собственных исследований. В разделе объекты исследования анализ проводился с вирусами, в частности, с Т4-подобными бактериофагами семейства *Myoviridae* озера Байкал. Отбор и фиксация проб. Отбор проб осуществлён в период с 2011 г. по 2018 г. Карта станций отбора проб приведена на рисунке 1. Для количественной оценки вирусных частиц и бактерий методом ЭФМ пробы фиксировали формалином (конечная концентрация 2%), для ПЦ замораживали в жидком азоте сразу после отбора.

В главе методы исследования представлены широкий спектр как лабораторных, так и программных аналитических подходов. Количественные и качественные определения химических компонентов в водных пробах проводились с помощью современного оборудования. Для учёта вирусных частиц и бактерий применяли ЭФМ с красителями DAPI, SYBR Green I. Для проверки наличия и определения размерного спектра вирусных частиц использовали трансмиссионный электронный микроскоп LEO-906E (Zeiss, Германия). Секвенирование гена *g23* Т4-подобных бактериофагов в биоплёнках методом Сенгера. Выделение ДНК проводили фенол-хлороформным методом. Для амплификации использовали праймеры MZIA1bis и MZIA6. Нуклеотидные последовательности фрагментов гена *g23* обрабатывали с помощью программ BioEdit v. 7.0.9, Mega 7, Gblocks, MrBayes v. 3.2.6, Tracer 1.6. Поиск ближайших соседей выполняли, используя BLAST-анализ (e-value – $1e^{-6}$). На основе аминокислотных последовательностей получали матрицу дистанций метрикой UniFrac с последующим использованием иерархического кластерного анализа (hclust) (Murtagh, 1992), применяя пакеты phyloseq v. 1.21.0, phangorn v. 2.2.0, реализованные в программе R v. 3.2.4. Для филогенетического анализа из базы данных GenBank выбирали репрезентативные аминокислотные последовательности белка *gp23* вирусов из других экосистем. Для сравнения бета-разнообразия сообществ бактериофагов в образцах применяли невзвешенный (качественный) UniFrac-анализ, далее использовали метод главных компонент (PCA), применяли пакеты phyloseq v. 1.21.0, phangorn v. 2.2.0, vegan v. 2.4-3, реализованные в программе R v. 3.2.4. Для анализа альфа-разнообразия применяли программу DnaSP

v.6 (Rozas et al., 2017). Сравнительный анализ виромов был проведен посредством использования программ Centrifuge v. 1.0.4, R v. 3.6.1, пакет vegan 10 v. 2.5-6 и скрипт python3 (Ivanov, 2019). Дендрограмма получена на основе сравнения байкальских виромов с 22 виромами из различных источников. Статистическая обработка результатов проведена при помощи программы R 3.6.3 (<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.6.3/>).

Полученные результаты в представляемой диссертационной работе соискатель Потапов С.А. представил в формате 7 выводов, в которых концентрированно отразил все полученные результаты.

Основные замечания, предъявленные к диссертационной работе Потапова С.А.

В ходе знакомства с диссертационной темой и полученными результатами были выявлены ряд замечаний, как стилистического, так и содержательной обоснованности оценки полученных результатов. Эти замечания были предъявлены автору диссертационной работы перед подготовкой завершающего оформления диссертации. Я убедился, что Потапов С.А. серьезно отнесся к этим замечаниям и они уже не были отражены в диссертации. В принципе основные положения, выносимые на защиту (их всего две) можно было бы расширить до 4-5, как они были представлены в перечне задач. Несмотря на эти замечания, считаю, что результаты, изложенные в диссертации, отражают основное содержание выстроенной темы.

В заключение хочу засвидетельствовать, что представленная работа выполнена с помощью современных методов и имеет существенную научную новизну. Полученные результаты имеют важное фундаментальное и практическое значение для понимания взаимоотношений между бактериофагами и их бактериальными хозяевами в водной среде озера Байкал и значения влияния на них антропогенных факторов и их роль в формировании фаговых сообществ озера Байкал. Надеюсь, что в перспективе результаты данной работы послужат развитию подобных научных исследований и в других регионах России.

Исходя из этих положений, считаю, что представленная диссертационная работа Потапова Сергея Анатольевича является самостоятельным, квалификационным, завершенным научным трудом и по своей актуальности, новизне и практической значимости соответствует требованиям ВАК РФ п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ Постановление правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (редакция от 28.08. 2017 г.), предъявляемых к кандидатским диссертациям, а его автор заслуживает присуждению искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).

ного Восстания. 1.

anlr07@mail.ru



Ю.П. Джигоев