

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН
академик РАН



А.Г. Габибов

« 21 » апреля 2021 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Потапова Сергея Анатольевича «Вирусные сообщества оз. Байкал», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08. – экология.

Микробиоценозы водных систем находятся в фокусе современной экологической микробиологии в течение многих десятилетий. Популяции микроорганизмов, населяющих моря и пресные водоемы, биопленки на твердых поверхностях, отличаются колоссальным разнообразием и играют определяющую роль в биосферных процессах. Помимо факторов внешнего воздействия, важнейшую роль в регулировании численности и состава микробных сообществ играют вирусы, в частности бактериофаги, которые инфицируют бактерии и археи. Несмотря на то, что вирусы – наиболее многочисленные компоненты биоты водных экосистем, изучению разнообразия и структуры вирусных сообществ водных экотопов в научной литературе посвящено довольно ограниченное количество работ. Основной причиной такого недостатка внимания, вероятно, следует считать отсутствие консенсусных методов изучения вирусных частиц в воде и других объектах (и как следствие, невозможность прямого сравнения данных), а также быстрое изменение таксономических воззрений на природу бактериофагов (и вирусов в целом).

Одним из достоинств рецензируемой диссертации можно считать объективный анализ эволюции методологии изучения вирусных сообществ в водных экосистемах, с указанием достоинств и недостатков различных физико-химических и генетических подходов. В процессе работы над диссертацией автором были опробованы методы эпифлуоресцентной и электронной микроскопии, анализа селективных генетических маркеров и метагеномного секвенирования. Таким образом, появляется возможность критического сравнения и дополнения полученных результатов.

В этой связи, тема диссертационной работы С.А. Потапова, посвященной анализу популяций вирусов озера Байкал, безусловно, актуальна. Понимание временного и пространственного распределения вирусов имеет большое значение для прогнозирования их влияния на популяции клеток-хозяев, на структуру микробного сообщества и, следовательно, на крупномасштабные биосферные процессы.

Диссертационная работа С.А. Потапова построена по «классическому» образцу и включает введение, обзор литературы (28 страниц), описание методов исследования (12 страниц), изложение результатов и их обсуждение (56 страниц), заключение (5 страниц), выводы и список цитируемой литературы (298 ссылок). Работа проиллюстрирована 25 рисунками и 11 таблицами.

Во «Введении» автор кратко рассматривает историю изучения пресноводных вирусных сообществ, в частности озера Байкал, определяет цели и задачи проведенного исследования, положения, выносимые на защиту.

«Обзор литературы» поделен автором на 8 разделов. В первых двух разделах описывается история методологии исследования вирусов, краткие сведения о развитии таксономии вирусов, в частности бактериофагов. Приведены общие данные о строении частиц хвостатых бактериофагов, различиях в инфекционных циклах, некоторых особенностях взаимодействия бактериофагов и клеток хозяев. Более детальная информация приведена о цианофагах – вирусах, инфицирующих цианобактерии, наиболее распространенные компоненты водных микробиомов. Также автор рассматривает эволюцию воззрений на роль

бактериофагов в регулировании сообществ микроорганизмов в водных экосистемах.

В разделах 1.4 – 1.6 «Обзора литературы» детально приведена история изучения виромов в экосистеме древнейшего пресноводного озера Байкал. Резюмированы работы по электронно-микроскопическому исследованию вирусных сообществ в воде, биопленках и микробиомах, ассоциированных с пресноводными губками. Далее описывается эволюция молекулярно-генетических исследований – от простейшей классификации вирусов по типу нуклеиновой кислоты геномов к выбору маркерных генов (например, гена главного белка капсида p23 для T4-подобных бактериофагов) и особенностям анализа виромов с их помощью и далее к метагеномным исследованиям, проводимым с помощью секвенирования второго поколения (NGS). Остальные два раздела обзора посвящены описанию методов кластерного филогенетического анализа как наиболее современного и репрезентативного при анализе совокупных генетических данных и эпифлуоресцентной проточной цитометрии как наиболее консенсусной в новейших исследованиях по экологической вирусологии. Необходимость присутствия этих разделов в обзоре обусловлена тем, что в своих исследованиях С.А. Потапов преимущественно опирался на данные, полученные с помощью этих методов.

В целом можно сказать, что «Обзор литературы» написан ясно и четко и содержит всю информацию, необходимую для понимания целей и задач исследования и анализа полученных результатов.

Не останавливаясь подробно на разделе «Материалы и методы исследования», можно лишь отметить, что С.А. Потапов использовал в своих исследованиях широкий круг как классических, так и самых и современных биохимических и биоинформатических методических подходов, что позволило ему получить интересные и оригинальные результаты. Подробное, иногда даже излишне, описание методов эксперимента и обработки результатов позволяет в случае необходимости легко их воспроизвести. Нужно также отметить, что выбор методов полностью адекватен поставленным автором задачам исследования.

Раздел «Результаты и их обсуждение» включает 4 главы. Изложение полученных результатов автор начинает с оценки численности бактерий и вирусов в воде оз. Байкал, определенной для нескольких станций отбора проб на разных глубинах. Для численной оценки использовались два метода – более традиционная эпифлуоресцентная микроскопия и проточная цитометрия. Результаты показывают высокую корреляцию между двумя методами и в целом соответствуют значениям, полученным для ряда олиготрофных озер мира. Анализ динамики численности вирусов и бактерий (включая отдельную оценку количества пикоцианобактерий) был проведен по вертикальному распределению в разные периоды термальной стратификации. Численное соотношение вирусов и бактерий (VBR) измеряли в течение 2011-2016 годов в разные сезоны и по годам. Корреляционный анализ обнаружил зависимость численности исследуемых компонентов планктона от температуры воды. За период исследований установлена положительная корреляция между численностью вирусов и гетеротрофных бактерий, вирусов и пикоцианобактерий. Количество вирусов больше зависело от численности гетеротрофных бактерий, чем от пикоцианобактерий. За весь период наблюдений установлено преобладание численности вирусных частиц над бактериями.

Главы 4 и 5 посвящены изучению вирусных сообществ биопленок камней и пресноводных губок с помощью секвенирования и биоинформатического анализа последовательностей гена g23, кодирующего основной капсидный белок T4-подобных бактериофагов. Последовательности 85 обнаруженных генов депонированы в базу данных NCBI GenBank. Показано, что большая часть последовательностей (более 90%) относится к группе бактериофагов «Суано-T4», причем кластерный анализ группирует обнаруженные последовательности отдельно от ранее обнаруженных в других группах водоемов, с лишь небольшим сходством с бактериофагами из вирусных сообществ других пресноводных озер. Автор выдвигает гипотезу, что формирование экосистемы озера Байкал происходило обособленно и в неразрывной связи с внешними условиями, о чем свидетельствует уникальность обнаруженных генотипов. Метагеномный анализ последовательностей гомологов g23 планктонных вирусных сообществ оз. Байкал подтверждает формирование отдельного «Байкальского» кластера T4-подобных

бактериофагов. Следует отметить, однако, что выбор гена T4 g23 в качестве маркерного для иерархического анализа вирусных сообществ, выдвинутый А. Кришем, был оправдан для ограниченных возможностей геномного секвенирования в начале 2000-х годов. Однако в дальнейшем достаточно серьезному пересмотру подвергались как гипотеза о репрезентативности T4-подобных фагов для анализа виропланктона в целом, так и таксономия бактериофагов этой группы. В связи с этим использованные автором определения «Near T4», «Суано T4» и др. оказываются достаточно произвольными для строгого анализа. В случае продолжения подобных исследований следует иметь в виду последние изменения в таксономии вирусов.

Современный метод метагеномного анализа был применен автором для анализа виропланктона пелагиали оз. Байкал, результаты изложены в главе 6. Отсеквенировано и депонировано в базы данных GenBank, SRA (NCBI) и MG-RAST большое количество данных, включая проанализированные нуклеотидные последовательности и "сырые" данные высокопроизводительного секвенирования байкальских виромов. Эти данные могут использоваться другими исследователями для дальнейшей работы как по анализу вирусных сообществ, так и по поиску новых неописанных пока вирусов. Автором корректно использованы методы биоинформатического анализа, включая современные методы сравнительного анализа метагеномных данных. Отдельного внимания заслуживают метагеномный анализ - современный метод, позволяющий получить данные о таксономическом разнообразии, которые невозможно получить другими способами. Полученные генетические данные рассматривались в связи с геофизическими условиями среды выделения проб виропланктона и с потенциальным набором хозяев соответствующих вирусов. Всего в образцах из оз. Байкал обнаружено 21 семейство вирусов, поражающих широкий круг хозяев. Основная часть обнаруженных последовательностей (свыше 97%) принадлежала хвостатым бактериофагам, отнесенным к отряду Caudovirales (по современной таксономии филуму Uroviricota). Подобная структура вирусного сообщества достаточно характерна для водоемов, причем в ряде опубликованных исследований пропорция различных морфотипов бактериофагов была сходной. Это свидетельствует о

ведущей роли бактериальных сообществ в формировании биотопов и, в свою очередь, бактериофагов как основных регуляторов бактериальных популяций. Автор справедливо замечает, что различия в обнаруженных количествах различных типов вирусов, приведенных в опубликованных работах, могут быть обусловлены различиями в протоколах выделения нуклеиновых кислот из проб, что может давать перекос в адрес той или иной группы вирусов. Также следует отметить, что последние тенденции в таксономии вирусов опираются не на морфологию вирусных частиц, а на генетические особенности. В связи с этим утверждение автора о доминировании морфотипа *Myoviridae* становится затруднительным для анализа, т.к. эту морфологию имеют несколько современных семейств бактериофагов.

В кратком заключении автор суммирует полученные результаты. Далее следуют краткие и конкретные выводы, которые полностью соответствуют полученным результатам.

Завершая анализ диссертационной работы С.А. Потапова, следует отметить, что рецензируемое исследование посвящено актуальной проблеме, выполнено на высоком теоретическом и экспериментальном уровне и вносит значительный вклад в оценку генетического разнообразия вирусов пресноводных водоемах, динамики их численности в зависимости от времени года, биотических и абиотических факторов, корреляционной связи между популяциями бактерий и вирусов. Выполненные исследования о составе виroma в разных местоположениях и при разных условиях представляются важными для понимания принципов формирования микробных сообществ пресноводных озёр. Проведена серьёзная работа по статистической обработке полученных данных и их интерпретации. Надежность и научная новизна экспериментальных данных не вызывают сомнений, а выводы являются обоснованными и отражают полученные результаты. Основные положения диссертационной работы С.А. Потапова отражены в 27 публикациях, из которых 6 статей опубликованы в изданиях, индексируемых системой цитирования Web of Science (Clarivate), и 12 работ – в изданиях, рекомендованных ВАК. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.


Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, могут быть использованы в исследованиях, проводимых в институтах биохимического, микробиологического и экологического профиля – Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского (ФИЦ Биотехнологии РАН), Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, а также в курсах лекций по экологии и геномике микроорганизмов на биологических факультетах высших учебных заведений.

В целом, диссертационная работа С.А. Потапова «Вирусные сообщества в оз. Байкал» представляет собой оригинальное законченное исследование. Работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям, а ее автор, Потапов Сергей Анатольевич заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 - «Экология».

Отзыв обсужден на заседании отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений ИБХ РАН 19 апреля 2021 года.


Заведующий отделом молекулярной биологии и биотехнологии растений
Института биоорганической химии им.

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
доктор биологических наук, член-корреспондент РАН



С.К. Завриев

Заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии
Института биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
доктор химических наук, г.н.с.



К.А. Мирошников