

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.3.

Тел./факс: (4967)73-26-36,

e-mail: info@pncbi.ru, <https://www.pbcra.ru>

ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983,

ИНН/КПП 5039002841/503901001

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН
Грабарник П.Я.



2024 г.

29.05.2024 № 191-01-2115/392
На № _____ от _____

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ПУШКИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

Диссертация «Молекулярно-генетическая и физиологическая характеристика новых умеренных и вирулентных вирусов бактерий, инфицирующих представителей группы *Bacillus cereus sensu lato*» представляемая Казанцевой Олесей Андреевной на соискание ученой степени кандидата биологических наук, выполнена в лаборатории биологии вирусов бактерий Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

В 2012 г. соискатель Казанцева О.А. получила степень бакалавра по специальности «Биолог» в ФГБОУ ВПО «Самарском Государственном Университете». В 2013 г. закончила ФГБОУ ВПО «Самарский Государственный Университет», кафедра «Биохимии» по специальности «Биология» с присвоением квалификации «Биолог». В 2014 г. она завершила обучение в ФГБОУ ВПО «Пушкинский государственный естественно-научный институт» по направлению «Биология» и получила степень магистра биологии. В период обучения в магистратуре соискатель работала в лаборатории механизмов рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биофизики клетки РАН.

С 2014 по 2018 гг. обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН по направлению 06.06.01 Биологические науки по специальности 03.01.03 Молекулярная биология. С 2014 по 2018 гг. Казанцева О.А. работала в лаборатории молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

В период подготовки диссертации (2019 – 2023 гг.) соискатель работала в лаборатории биологии вирусов бактерий Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Справка о сдаче Казанцевой О.А. кандидатских экзаменов выдана в 2023 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Научный руководитель диссертационной работы – Шадрин Андрей Михайлович, к.б.н., в.н.с. лаборатории биологии вирусов бактерий Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

По итогам обсуждения диссертации Казанцевой О.А. по теме «Молекулярно-генетическая и физиологическая характеристика новых умеренных и вирулентных вирусов бактерий, инфицирующих представителей группы *Bacillus cereus sensu lato*» принято следующее заключение: диссертационная работа является научно-квалификационной работой, в которой содержится исчерпывающая молекулярно-генетическая и физиологическая характеристика новых умеренных и вирулентных бактериофагов, являющихся представителями и основателями новых таксонов высокого ранга. В работе впервые был предложен модифицированный метод RAGE (метод быстрой амплификации концов генома) для определения точных границ геномов бактериофагов. Следует отметить, что подробный анализ геномов в работе Казанцевой О.А. позволил выявить гены, которые могут препятствовать использованию данных фагов в фаготерапии. Эти гены могут способствовать горизонтальному переносу ДНК между бактериями и распространению генов устойчивости к антимикробным препаратам патогенных бактерий, что подчеркивает практическую важность проведенного фундаментального исследования. По совокупности представленных результатов диссертационная работа может быть классифицирована как существенное научное достижение в области молекулярной биологии.

Актуальность. Проведенное исследование, посвящённое изучению новых умеренных и вирулентных бактериофагов, заражающих *Bacillus cereus sensu lato*, обретает особую актуальность в свете патогенности некоторых представителей этой группы бактерий для человека, которые вызывают пищевые отравления и серьёзные инфекции, включая сибирскую язву. Фаги, специфически инфицирующие бактерии рода *Bacillus*, остаются недостаточно изученными, несмотря на их потенциальное значение в биологических и медицинских исследованиях. Вплоть до 2019 г. в базе данных NCBI было

депонировано всего 4 генома фагов, выделенных на территории Российской Федерации, что подчеркивает необходимость дальнейшего исследования и расширения базы данных о фагах в данном регионе. В рамках выполнения данной работы был выполнен поиск и детальная характеристика четырех новых фагов, обнаруженных на территории России, что привело к удвоению числа известных фагов в этом регионе по сравнению с 2019 г.

Научная новизна. Диссертация обладает научной новизной, поскольку на основании результатов исследования современная таксономия вирусов бактерий была расширена на 3 новых рода бактериофагов: *Samaravirus*, *Kirovirus* и *Bunatrivirus*. В базу данных National Center for Biotechnology Information GenBank были депонированы последовательности геномов 4-х новых бактериофагов: vB_BcM_Sam46-C, vB_BcM_Sam46-T, Kirov и B13. Впервые было описано применение метода RAGE, модифицированного с учетом типов упаковки ДНК, для определения концов геномов фагов. Впервые обнаружена и описана малая субъединица терминазы с необычной двухдоменной структурной организацией, включающей типичный домен «Terminase_2» и дополнительный домен «FtsK_gamma». На основании анализа результатов исследования была предложена роль фаговых белков, содержащих домен «FtsK_gamma».

Практическая и теоретическая значимость. На основании полученных результатов данной работы были предоставлены заявки на формирование новых таксонов бактериофагов (видов и родов) в Международное сообщество по таксономии вирусов: *Samaravirus samarensis* vB_BcM_Sam46, род *Samaravirus*; *Kirovirus kirovense* Kirov, род *Kirovirus*; *Bunatrivirus bunatris* B13, род *Bunatrivirus*. В исследовании была рассмотрена предполагаемая роль фаговых «FtsK_gamma»-доменов-содержащих белков в процессе горизонтального переноса генов. Эта информация имеет важное практическое значение в качестве дополнительного критерия при отборе фагов-кандидатов для препаратов против бактериальных инфекций.

Личное участие соискателя в получении результатов заключается в анализе данных литературы, дизайне и планировании экспериментов, проведении исследований, внедрении новых экспериментальных методов в лабораторную практику, обработке полученных результатов, написании научных публикаций и представлении результатов экспериментов на конференциях и конгрессах. Основной объем экспериментальной работы выполнен лично соискателем.

Степень достоверности результатов проведенных исследований. Полученные результаты, заключение и выводы, сформулированные в диссертации, отвечают поставленным цели и задачам работы. Достоверность результатов исследования подтверждена применением современных методов микробиологии, молекулярной биологии и методов статистического анализа, а также применением современных компьютерных программ для обработки полученных экспериментальных данных и использованием сертифицированного лабораторного оборудования.

Апробация работы. По материалам исследования Казанцевой О.А. было опубликовано 20 работ, из них 4 статьи в международных изданиях, входящих в список рекомендованных ВАК и индексируемых в базах данных РИНЦ, Scopus и Web of science, и

16 тезисов конференций и конгрессов, 4 из которых входят в систему цитирования РИНЦ. Основные результаты диссертации были также представлены в форме устных и стендовых докладов на 14-ти конференциях и конгрессах.

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК для защиты кандидатских диссертаций

1. A genomic analysis of the *Bacillus* bacteriophage *Kirovirus kirovense* Kirov and its ability to preserve milk / **O. A. Kazantseva**[†], A. V. Skorynina[†], E. G. Piligrimova [и др.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – № 16. – С. 12584.
2. **Kazantseva, O. A.** vB_BcM_Sam46 and vB_BcM_Sam112, members of a new bacteriophage genus with unusual small terminase structure / **O. A. Kazantseva**, E. G. Piligrimova, A. M. Shadrin // Scientific Reports. – 2021. – Т. 11. – № 1. – С. 12173.
3. **Kazantseva, O. A.** Novel *Bacillus*-infecting bacteriophage B13 – the founding member of the proposed new genus *Bunatrivirus* / **O. A. Kazantseva**, E. G. Piligrimova, A. M. Shadrin // Viruses. – 2022. – Т. 14. – № 10. – С. 2300.
4. Complete genome sequence of *Bacillus cereus sensu stricto* VKM B-370, isolated from the *Silkworm bombyx mori* / E. G. Piligrimova, R. M. Buzikov, **O. A. Kazantseva**, A. M. Shadrin // Microbiology Resource Announcements. – 2021. – Т. 10. – № 20. – С. e00386-21.

Материалы публикаций представлены в следующих разделах диссертации: Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Заключение.

Публикации в сборниках тезисов научных конференций и конгрессов

1. **Казанцева, О. А.** Умеренные бактериофаги B13 и B473, инфицирующие представителей группы *Bacillus cereus sensu lato* / **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // 4-й Российский микробиологический конгресс (г. Томск, 24 – 29 сентября 2023 г.): материалы конгресса. – Томск, РФ : microbiology-congress.ru, 2023. – С. 189 – 190.
2. **Казанцева, О. А.** Sam46, Kirov и B13 – представители и основатели трех новых родов бактериофагов, инфицирующих бактерии из группы *Bacillus cereus sensu lato* / **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // Всероссийская конференция «От микробиологии к генетическим технологиям» (г. Новосибирск, 22–25 сентября 2023 г.): сборник тезисов. – Новосибирск, РФ, 2023. – С. 46-47.
3. **Казанцева, О. А.** Умеренные бактериофаги: недооценённый потенциал профагов в экологии и эволюции бактерий / **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // XIII Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Минск, 6 – 9 июня 2023 г.): материалы конференции. – Минск, Беларусь : Беларуская навука, 2023. – С. 53-54.
4. Использование бактериофага Kirov в качестве агента биоконтроля *B. cereus* в пищевых продуктах / А. В. Скорынина, Э. Г. Пилигримова, **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // VIII Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (г. Пущино, 6–8 декабря 2022 г.): сборник тезисов. / ред. Т. А. Решетилова. – Пущино, РФ : ГЕОС, 2022. – С. 268–270.
5. **Казанцева, О. А.** Isolation, sequencing and characterization of the *Bacillus*-infecting temperate bacteriophage B13 / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин //

- 10-ая Всероссийская научно-практическая конференция «Геномное секвенирование и редактирование» (NGS 2022), под эгидой Центров геномных (г. Москва, 19 мая 2022 г.): сборник тезисов исследований мирового уровня. – Москва, РФ : РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2022. – С. 9.
6. **Казанцева, О. А.** Определение механизма упаковки ДНК и концов хромосомы бактериофагов с использованием методов NGS и RAGE / **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // III Всероссийская конференция «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (г. Новосибирск, 19 – 24 июня 2022 г.): сборник тезисов. – Новосибирск, РФ : Академиздат, 2022. – С. 50.
 7. **Казанцева, О. А.** Фаготерапия как альтернатива антибиотикам. создание перспективной библиотеки бактериофагов. критерии фага-кандидата / **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // Конференция «Проблема антибиотикоустойчивости микроорганизмов и пути ее решения» (г. Санкт-Петербург, 16 – 17 июля 2022 г.): сборник тезисов. – Санкт-Петербург, РФ : СПбПУ, 2022.
 8. Бактериофаги и их ферменты как антибактериальные агенты / А. М. Шадрин, О. Н. Копосова, А. В. Скорынина, Р. М. Бузинов, **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, В. А. Кулябин, Н. А. Рябова, К. В. Хлопова, В. С. Тимофеев // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса / ред. Е. А. Бонч-Осмоловская [и др.]. – Псков, РФ : ООО «Конкорд», 2021. – С. 122.
 9. **Казанцева, О. А.** Sam46 и Sam112, бактериофаги нового рода «*Samaravirus*» с необычной доменной структурой малой субъединицы терминазы / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин // 3-ий Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса / ред. Е. А. Бонч-Осмоловская [и др.]. – Псков, РФ : ООО «Конкорд», 2021. – С. 191–192.
 10. **Казанцева, О. А.** Бактериофаги vB_VcM_Sam46 и vB_VcM_Sam112, представители нового рода «*Samaravirus*» с необычной доменной структурой малой терминазы / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин // III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов / VII съезд биохимиков России (г. Сочи, Дагомыс, 3 – 8 октября 2021 г.): материалы. – Москва, РФ : Перо, 2021. – Т. 2. – С. 111–112.
 11. **Казанцева, О. А.** Выделение и характеристика умеренного бактериофага B13 , инфицирующего бактерии группы *Bacillus cereus sensu lato* / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин // VII Пушкинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (г. Пущино, 6 – 9 декабря 2021 г.): сборник тезисов / ред. Т. А. Решетилова. – Пущино, РФ : ГЕОС, 2021. – С. 48–50.
 12. Выделение, секвенирование и характеристика двух штаммов Sam46 и Sam112 нового вида бактериофага, инфицирующего представителей группы *Bacillus cereus sensu lato* / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, В. А. Загородный, А. М. Шадрин // 8-ая Всероссийская научно-практическая конференция «Геномное секвенирование и редактирование» (NGS 2020) (г. Москва, 20–21 мая 2020 г.): сборник тезисов. – Москва, РФ : 978-5-88458-503-4, 2019. – С. 6.
 13. Перспективы использования генетического материала вирусов бактерий / А. М. Шадрин, Э. Г. Пилигримова, С. Д. Байчер, В. А. Кулябин, **О. А. Казанцева** // 2-ой Российский микробиологический конгресс (г. Саранск, 23 – 27 сентября 2019 г.): сборник тезисов. – Саранск, РФ : microbiology-congress.ru, 2019. – С. 80.

14. Новые бактериофаги Sam46 и Sam112, инфицирующие *Bacillus cereus sensu lato* / Э. Г. Пилигримова, О. А. Казанцева, В. А. Загородный, А. М. Шадрин // VI Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (г. Пущино, 2 – 6 декабря 2019 г.): сборник тезисов. – Пущино, РФ, 2019. – С. 8.
15. Бактериофаги фВ83, фKIR1 И фIZH57, инфицирующие бактерии группы *Bacillus cereus* / О. А. Казанцева, Э. Г. Пилигримова, В. А. Загородный [и др.] // Биология – наука XXI века: 22-ая Международная пущинская школа-конференция молодых ученых (г. Пущино, 23 – 27 апреля 2018 г.): сборник тезисов. – Пущино, РФ, 2018. – С. 293.
16. Физиологические особенности бактериофагов, заражающих *Bacillus cereus sensu lato* / О. А. Казанцева, Э. Г. Пилигримова, В. А. Загородный [и др.] // 4-ая научно-практическая конференция с международным участием: к 70-летию профессора В.А. Алёшкина: «Бактериофаги. Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (24–26 сентября 2018 г.): сборник тезисов. – Нижний Новгород, РФ, 2018. – С. 46.

Диссертационная работа Казанцевой О. А. по теме «Молекулярно-генетическая и физиологическая характеристика новых умеренных и вирулентных вирусов бактерий, инфицирующих представителей группы *Bacillus cereus sensu lato*» соответствует паспорту научной специальности 1.5.3 Молекулярная биология по следующим направлениям исследований:

3. Структура геномов, геномика, эпигеномика и транскриптомика. Биоинформатические методы анализа баз данных последовательностей ДНК, РНК и белков, в том числе при патологии у человека.

6. Организация генетического материала в клеточном ядре, хроматин, структурно-функциональная компартментализация клеточного ядра. Организация генетического материала в клетках прокариот и в вирусах.

12. Молекулярная вирусология и противовирусные вещества.

Диссертационная работа Казанцевой О. А. «Молекулярно-генетическая и физиологическая характеристика новых умеренных и вирулентных вирусов бактерий, инфицирующих представителей группы *Bacillus cereus sensu lato*» соответствует требованиям, установленным пунктом 14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. от 25.01.2024 г.) и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 Молекулярная биология.

Диссертация и заключение рассмотрены на совместном заседании лаборатории биологии вирусов бактерий и лаборатории молекулярной микробиологии Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук». Присутствовало на заседании 16 чел. Результаты голосования: «ЗА» – 16 чел., «ПРОТИВ» – 0 чел., «ВОЗДЕРЖАЛОСЬ» – 0 чел., протокол № 1 от “09” апреля 2024 г.

Заключение принято на заседании Ученого совета Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного

Захаровой М. В.
Подпись _____
УДОСТОВЕРЯЮ
Начальник отдела кадров ИБФМ РАН