

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА  
24.1.232.01 (Д 002.285.01), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ПУЩИНСКИЙ  
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ  
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета

от 19 сентября 2024 г. № 90

О присуждении Казанцевой Олеся Андреевне, гражданке Российской Федерации, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Молекулярно-генетическая и физиологическая характеристика новых умеренных и вирулентных вирусов бактерий, инфицирующих представителей группы *Bacillus cereus sensu lato*» по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология» принята к защите 2 июля 2024 г. (протокол заседания № 88), диссертационным советом 24.1.232.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН), 142290 Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, д.3, приказ Минобрнауки России от 07 ноября 2019 года РФ № 1069/нк, с изменениями, внесенными приказами Минобрнауки России № 118 от 24 февраля 2021 г., №561/нк от 3 июня 2021 г., № 24/нк от 28 января 2021 г., № 1162/нк от 12 октября 2022 г. и № 475/нк от 21 мая 2024 г..

Соискатель Казанцева Олеся Андреевна, 23 января 1991 года рождения, в 2012 году с отличием окончила бакалавриат Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный



университет» (ФГБОУ ВПО СамГУ) по направлению «Биология», в 2013 г. с отличием окончила обучение на кафедре «Биохимия» ФГБОУ ВПО СамГУ с присуждением квалификации «Биолог» по специальности «Биология», в 2014 г. с отличием окончила магистратуру ФГБОУ ВПО «Пущинский государственный естественно-научный институт» по направлению подготовки 020400 Биология с присуждением квалификации магистр, в 2018 г. окончила очную аспирантуру на базе ФГБУН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН по направлению 06.06.01 Биологические науки по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология. В настоящее время соискатель работает в лаборатории биологии вирусов бактерий ФИЦ ПНЦБИ РАН в должности научного сотрудника.

Диссертация выполнена в лаборатории биологии вирусов бактерий ФИЦ ПНЦБИ РАН. Научный руководитель — кандидат биологических наук Шадрин Андрей Михайлович, ведущий научный сотрудник 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 «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

#### **Официальные оппоненты:**

1. Тикунова Нина Викторовна — доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск);
2. Корниенко Мария Андреевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ «Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства» (г. Москва)



дали **положительные** отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** — Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора) в своём **положительном** отзыве, подписанном доктором биологических наук, профессором РАН, член-корреспондентом РАН Алешкиным Андреем Владимировичем, зам. директора по медицинской биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, указала, что диссертационная работа Казанцевой О.А. является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой исследованы молекулярно-генетические и физиологические характеристики новых умеренных и вирулентных вирусов бактерий, инфицирующих представителей группы *Bacillus cereus sensu lato*, а также описаны, предложены и узаконены три новых вида и рода бактериофагов. Диссертация соответствует требованиям и критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. №723, от 21.04.2016 г. №35, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. №024, от 01.10.2018 г. №1168, от 26.05.2020 г. №751, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. №1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. №415, от 26.10.2023 г. №1786, от 25.01.2024 г. №62), предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а диссертант Казанцева Олеся Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. — Молекулярная биология.

Соискатель имеет 72 опубликованные научные работы, из них по теме диссертации — 20 научных работ, общим объемом 6,59 печатных листа, из



которых 4 статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций, из них 3 статьи (Q1 и Q2) опубликованы в журналах индексируемых в международных базах данных (Web of Science, Scopus), 16 тезисов докладов на научных конференциях и конгрессах, из которых 4 опубликованы в сборниках материалов конференций, входящих в систему цитирования РИНЦ.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Kazantseva, O. A.**, Skorynina A. V., Pilgrimova E. G., Ryabova N. A. и Shadrin A. M., A genomic analysis of the *Bacillus* bacteriophage *Kirovirus kirovense* Kirov and its ability to preserve milk // Int. J. Mol. Sci., 2023. – Т. 24. – № 16. – С. 12584. DOI: 10.3390/ijms241612584.

Соискатель участвовал в подготовке (разработке концептуальной основы исследования); проведении экспериментов (дизайн исследования, сбор данных, пробоподготовка образцов (фагов и ДНК фагов), характеристика физиологических параметров фага), обработке и анализе данных с применением статистических и математических методов; подготовке публикации к печати.

2. **Kazantseva, O. A.**, Pilgrimova E. G., Shadrin A. M., vB\_BcM\_Sam46 and vB\_BcM\_Sam112, members of a new bacteriophage genus with unusual small terminase structure // Sci. Rep. – 2021. – Т. 11 (1). – С. 12173. DOI: 10.1038/s41598-021-91289-x. Соискатель участвовал в разработке концептуальной основы исследования, проведении эксперимента (дизайн, пробоподготовка фагов, сбор данных ДНК фагов с применением молекулярно-генетических методов, характеристика физиологических параметров фага), статистической и математической обработке и анализе данных; подготовке статьи к публикации.

3. **Kazantseva, O. A.**, Pilgrimova E. G., Shadrin A. M., Novel *Bacillus*-infecting bacteriophage B13 – the founding member of the proposed new genus



*Bunatrivirus* // Viruses. – 2022. – Т. 14. – № 10. – С. 2300. DOI: 10.3390/v14102300.

Соискатель участвовал в разработке концептуальной основы исследования, проведении эксперимента (дизайн, сбор и анализ данных, пробоподготовка фагов, анализ генома и характеристика физиологических параметров фага), обработке данных с применением статистических и математических методов; подготовке статьи к публикации.

4. E. G. Pilgrimova, R. M. Buzikov, **O. A. Kazantseva**, A. M. Shadrin, Complete genome sequence of *Bacillus cereus sensu stricto* VKM B-370, isolated from the *Silkworm bombyx mori* // Microbiology Resource Announcements. – 2021. – Т. 10. – № 20. – С. e00386-21. DOI: [doi.org/10.1128/mra.00386-21](https://doi.org/10.1128/mra.00386-21)

Соискатель участвовал в сборе, систематизации и аннотировании данных.

В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах и текст не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

**Официального оппонента д.б.н. Тикуновой Н.В.** – отзыв **положительный**. Критических замечаний нет.

**Официального оппонента к.б.н. Корниенко М.А.** – отзыв **положительный**. Критических замечаний нет. Замечания: 1) наличие опечаток и неточностей в тексте диссертации; 2) редакционного характера с предложением обсудить в литобзоре эпидемиологические данные, касающиеся представителей *Bacillus cereus sensu lato*. Вопросы: 3) проводили ли экспериментально сравнительную оценку эффективности посева бактериофагов на штаммах разных бактериальных видов? 3) Возможна ли разработка системы фаготипирования представителей группы бактерий *Bacillus cereus sensu lato*? 4) Планируется ли проводить экспериментальное подтверждение способности фага Kirov находиться в форме кольцевой плазмиды в цитоплазме хозяина? 5) Планируется ли



полногеномное секвенирование штамма-хозяина бактериофага B13?

**Ведущей организации – отзыв положительный.** Критических замечаний нет. Замечания: 1) опечатки в тексте; 2) в главе «материалы и методы» требуется некоторое уточнение в формулировке метода спот-теста, используемого автором для быстрого подсчёта титра фага.

**Положительные, не содержащие критических замечаний отзывы на автореферат** предоставили:

1. к.б.н. Валентович Леонид Николаевич, доцент, заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» ГНУ Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси;
2. к.б.н. Сидоренко Анастасия Вячеславовна, доцент, заведующий лабораторией «Коллекция микроорганизмов», ГНУ «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси;
3. к.б.н. Попова Анастасия Владимировна, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов, ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии;
4. к.б.н. Феоктистова Наталья Александровна, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза», ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ им. П.А. Столыпина;
5. к.б.н. Кабилов Марсель Расимович, руководитель центра коллективного пользования «Геномика» ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Замечания: 1) относительно формулировки вывода №3, где требуется некоторая детализация проведенной модификации метода RAGE; 2) касательно таксономического положения штамма ВКМ В-370. По GTDB он относится не к *Bacillus cereus*, а к *Bacillus\_A thuringiensis\_S*.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что д.б.н. Тикунова Н. В. является экспертом в области молекулярной биологии и вирусологии, включая биологию бактериофагов, к.б.н. Корниенко М.А.



является компетентным специалистом в области биологии и генетики бактериофагов. Они имеют публикации в соответствующих областях в ведущих научных рецензируемых журналах.

Выбор ведущей организации обоснован тем, что ФБУН МНИИЭМ им Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора широко признан своими достижениями в разработке научных основ и методологических подходов для решения теоретических и прикладных вопросов эпидемиологии, микробиологии, клиники, иммунологии инфекционных заболеваний человека. В частности, он известен исследованиями в области фаговой терапии и биологии бактериофагов, что позволяет объективно оценить научную и практическую значимость диссертационной работы Казанцевой О.А.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Выделено и охарактеризовано 3 новых вида бактериофагов: вирулентные бактериофаги *Samaravirus samarensis* vB\_BcM\_Sam46-T и *Samaravirus samarensis* vB\_BcM\_Sam46-C (два штамма одного вида) и умеренные бактериофаги *Kirovirus kirovense* Kirov и *Bunatrivirus bunatris* B13, что позволяет расширить современную таксономию вирусов на три новых рода: *Samaravirus*, *Kirovirus* и *Bunatrivirus*.

Определены ключевые физиологические характеристики исследованных фагов, в том числе морфология вирионов, параметры литического цикла, стабильность исследованных бактерий при различных температурах и pH среды, а также структурная и функциональная организация их геномов.

Впервые для определения концов геномов бактериофагов и механизма упаковки ДНК в капсид использован метод быстрой амплификации концевых участков фагового генома (RAGE).

Впервые было выявлено влияние мутаций в гене *gp25* вирусов *Caudoviricetes*, кодирующего XkdW-подобный белок, на формирование



морфотипов бляшек и характер литической активности штаммов фага *Samaravirus samarense* vB\_BcM\_Sam46.

Впервые у бактериофагов (*Samaravirus samarense* vB\_BcM\_Sam46) описана малая субъединица терминазы с необычной двухдоменной структурой, содержащей типичный С-концевой домен «Terminase\_2» и дополнительный N-концевой «FtsK\_gamma» домен.

Высказано предположение, сделанное на основании высокого уровня сходства аминокислотной последовательности данного домена с доменами «FtsK\_gamma» *B. cereus* и *B. subtilis*, о том, что малая субъединица терминазы (QIQ61202, фаг *Samaravirus samarense* vB\_BcM\_Sam46), содержащая «FtsK\_gamma» домен) может связываться с SRS-сайтами ДНК бактерии-хозяина, приводя к упаковке в капсид не фаговой, а бактериальной ДНК, и, таким образом, позволяя фагу участвовать в горизонтальном переносе генов путем трансдукции.

Теоретическая значимость исследования обусловлена тем, что в представленной работе получены результаты, важные как для понимания таксономического разнообразия и распространенности, так и свойств представителей бактериофагов *Bacillus cereus sensu lato* в природных биотопах, играющих важную роль в контроле численности бактериальных популяций и эволюции бактерий в естественных условиях

Применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, т.е. с получением обладающих новизной результатов) использован комплекс базовых и специальных методов, включая методы молекулярной биологии, микробиологии и биоинформатики.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что Международный таксономический комитет включил предложенные авторами три новых рода: *Samaravirus*, *Kirovirus* и *Bunatrivirus* в современную таксономию бактериофагов. Предложенная модификация метода быстрой амплификации геномных концов (RAGE) является ценным дополнением к существующим



экспериментальным подходам для определения границ генома, в частности, для фагов с механизмами упаковки ДНК «headful», «short DTR» и «3'-COS», позволяющая использовать небольшое количество ДНК.

Полученные данные о последовательностях генов бактериофагов открывают возможность использования отдельных продуктов их генов для нужд биотехнологии, а данные о литической активности фагов в отношении чувствительных штаммов представителей *Bacillus cereus sensu lato*, их устойчивости к температурным и pH изменениям, могут быть востребованы при выборе наиболее эффективных и стабильных фагов-кандидатов при разработке фагопрепаратов. На основе полученных молекулярно-генетическим анализом данных возможно создание перспективных и безопасных методов отбора облигатно-вирулентных фагов для нужд молекулярной биологии, биотехнологии и фаговой терапии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

репрезентативность выборок данных и воспроизводимость результатов; результаты получены на сертифицированном научном оборудовании с использованием качественных расходных материалов, обоснованным использованием контролей и современных методов обработки данных. Использованные в работе методы соответствуют поставленным целям и задачам;

идея базируется на анализе собственных экспериментальных данных и сравнении с результатами других научных групп, имеющимися в современной научной литературе, в тех случаях, когда такое сравнение является обоснованным;

установлено качественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках;

использованы современные методы анализа и статистической обработки экспериментальных данных.

Полученные данные прошли экспертизу в рецензируемых научных журналах и в докладах на российских и международных научных



конференциях. Большинство авторских результатов получено впервые.

Личный вклад соискателя определяется его непосредственным участием на всех этапах выполнения работы, включая планирование, выполнение научных экспериментов, обработку и интерпретацию полученных данных, подготовку научных публикаций и представление результатов на научных конференциях и конгрессах.

Основные результаты получены соискателем самостоятельно. Часть работы выполнена с привлечением коммерческих организаций ООО «Биоспарк» (полногеномное секвенирование фаговых геномов) и ЗАО «Евроген» (секвенирование фрагментов ДНК с помощью метода Сэнгера). Микрофотографии фагов получены с помощью трансмиссионной электронной микроскопии совместно с к.б.н. Н.А. Рябовой на базе ФГБУН Института белка РАН.

В ходе защиты диссертации Казанцевой О.А. не были высказаны критические замечания. Соискатель в полной мере ответил на замечания не- и официальных оппонентов, а также на задаваемые ему в ходе заседания вопросы по проведенной модификации метода RAGE и возможности более широкого его применения, о способности исследованных фагов индуцировать процессы производства активных форм кислорода, о роли малых регуляторных РНК в бактериофагах, о программе «Фаготерм», о титрах и сравнительной оценке вирулетности фагов Sam46-C и Sam46-T, о функции рецепторов на поверхности бактериофагов, об аннотировании генов и филогенетической систематики новых штаммов.

На заседании 19 сентября 2024 г., протокол № 90 диссертационный совет **принял решение:** за изучение молекулярно-генетических и физиологических особенностей новых вирулентных и умеренных фагов бактерий группы *Bacillus cereus sensu lato*, имеющих важное значение для понимания разнообразия, распространенности и свойств инфицирующих бактерии вирусов, а также для разработки потенциальных средств контроля патогенных штаммов присудить Казанцевой Олеся Андреевне ученую



степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 5 докторов наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология», участвующих в заседании, из **24**, входящих в состав ученого совета, проголосовали: за присуждение ученой степени – « 19 », против присуждения ученой степени – « 0 », недействительных бюллетеней – « **0** ».

Председатель

диссертационного совета 24.1.232.01

д.б.н., проф. Озолинь О.Н.

Ученый секретарь

диссертационного совета 24.1.232.01

д.б.н. Дегтярева О.В.

19 сентября 2024 г.

