

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Казанцевой Олеси Андреевны «Молекулярно-генетическая и физиологическая характеристика новых умеренных и вирулентных вирусов бактерий, инфицирующих представителей группы *Bacillus cereus sensu lato*», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология

Актуальность исследования

Сегодня все более актуальным становятся исследования бактериофагов – вирусов, способных инфицировать бактерии и вызывать их гибель. Это связано во многом с необходимостью контроля бактериальных сообществ, устойчивых к действию антибиотиков, что имеет первостепенное значение в рамках решения вопросов здравоохранения, в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, аквакультуре, а также в других сферах деятельности человека. Благодаря развитию технологий, в частности, полногеномного секвенирования, стало возможным изучение бактериофагов на совершенно новом уровне, что позволяет выявить фундаментальные основы физиологии этих объектов и на основе молекулярных механизмов взаимодействия бактериофагов с их хозяевами разработать рациональные и эффективные схемы практического применения. Таким образом, бактериофаги, способные инфицировать различные патогенные микроорганизмы, становятся крайне интересными объектами исследования.

Исследование Олеси Андреевны Казанцевой посвящено изучению физиологических и генетических особенностей новых вирулентных и умеренных бактериофагов группы *Bacillus cereus sensu lato* (*B. cereus* s. l.). Представители группы *B. cereus* s. l. являются патогенами различных групп животных, а некоторые виды способны вызывать серьезные инфекционные заболевания человека, начиная от пищевых отравлений и заканчивая таким высоко летальным заболеванием, как сибирская язва. В связи с вышесказанным, необходимо разрабатывать альтернативных антибиотикам методов контроля и элиминации бактерий данной группы. Помимо этого, крайне важным является исследование умеренных бактериофагов *B. cereus* s. l. на предмет содержания в их геноме генов факторов патогенности и детерминант устойчивости к антибиотикам, что может быть важным в свете их распространения посредством горизонтального переноса. Таким образом, тематика работы Казанцевой О.А. представляется бесспорно актуальной и интересной. И в дальнейшем данная работа может являться базисом для решения практических задач как современной медицины, так и ветеринарии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Казанцевой О.А. обладает высокой степенью научной обоснованности и достоверности результатов, что обеспечивается использованием комплекса методов: классических микробиологических методов, методов молекулярной биологии, генетических методов, в том числе методов секвенирования нового поколения, биоинформатических методов и статистических методов анализа. Экспериментальные данные получены с использованием сертифицированного лабораторного оборудования. Выводы и научные положения, сформулированные в диссертации обоснованы и логически вытекают из результатов исследований. Научная значимость исследования подтверждаются весомым количеством опубликованных работ (общее количество 20 публикаций), в том числе 4 статьями в международных изданиях, входящих в список рекомендованных ВАК и индексируемых в базах данных РИНЦ, Scopus и Web of Science. Научные положения диссертации были апробированы на 14 научных конференциях. Кроме того, финансирование исследования такими фондами, как РФФИ и РНФ также указывает на высокий научный уровень работы.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов

Проведенное исследование представляет собой комплексную работу, всесторонне характеризующую бактериофаги группы *B. cereus* s. l. Полученные данные значительно расширяют доступную информацию о бактериофагах группы *B. cereus* s. l., а именно: описаны бактериофаги, являющиеся представителями и основателями новых таксонов высокого ранга (родов *Samaravirus*, *Kirovirus*, *Bunatrivirus*). Данные вирусы детально охарактеризованы как микробиологически, так и на геномном уровне. Впервые предложен подход по определению концов геномов бактериофагов с применением метода RAGE (метод быстрой амплификации концов генома), модифицированного с учетом типов упаковки ДНК. Помимо этого, впервые описана фаговая терминаза, малая субъединица которой имеет атипичную двухдоменную структуру (типичный домен Terminase_2 и дополнительный FtsK_gamma), а также предложена роль фаговых белков, содержащих домен «FtsK_gamma».

Структура диссертации, ее содержание и завершенность

В целом, диссертационная работа Казанцевой О.А. является основательным, завершенным научным трудом, описывающий весь процесс поиска и характеристики новых бактериофагов, активных в отношении бактерий группы *B. cereus* s. l. Тест диссертации изложен на 171 странице машинного текста и имеет стандартное строение, включающее введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и

обсуждения, а также заключение, выводы, список литературы и приложения. Работа проиллюстрирована 34 рисунками, содержит 1 таблицу, а также расширена за счет 6 приложений. Список литературы содержит 362 цитируемых источника.

Глава «Введение» раскрывает актуальность данного исследования, описывает поставленные цели и задачи, обосновывает научную новизну и научно-практическое значение работы, а также приводятся положения, выносимые на защиту. Кратко излагаются методы исследования, аргументируется соответствия диссертации паспорту специальности, а также представляется информация об апробации работы и публикациях, на основании данных полученных в рамках диссертационной работы.

Глава «Обзор литературы» содержит подробную информацию о современном взгляде на физиологию бактериофагов и их роль в эволюции бактерий. Отдельное внимание уделяется разнообразию бактериофагов, вопросом таксономии и номенклатуры вновь выделенных бактериофагов. Описываются основные объекты исследования, а именно бактерии группы *B. cereus* s. l. и бактериофаги, инфицирующие бактерии этой группы. Обзор хорошо структурирован и охватывает основные моменты необходимые для понимания проблематики диссертации.

В главе «Материалы и методы исследования» представлена информация об объектах исследования, а также используемых реактивах, ферментах, коммерческих наборах и оборудовании. Далее детально описаны протоколы методов, применяемых для реализации работы. Необходимо отметить широкий спектр использованных методов, начиная от стандартных микробиологических методов, таких как спот-тестирование и заканчивая анализом данных полногеномного секвенирования. Подробно описан статистический анализ получаемых данных, что говорит о достоверности получаемых данных. В целом, надо отметить, доскональность в описании всех манипуляций и экспериментов, что показывает высокий методический уровень работы и позволяет верно интерпретировать полученные результаты.

Глава «Результаты», содержит основные экспериментальные данные, полученные в рамках диссертационной работы. В ходе работы были выделены и детально охарактеризованы вирулентные бактериофаги Sam46-T и Sam46-C, а также умеренные бактериофаг Kirov и B13. Бактериофаги Sam46-T и Sam46-C и Kirov выделены из образцов почв, в то время как B-13 был индуцирован из штамма-хозяина *B. cereus* ВКМ B-13 с помощью митомицина С. Бактериофаги обладали различной морфологией и спектром литической активности (инфицируя от 32 до 55% штаммов коллекции). Для всех выделенных бактериофагов проведено определение полногеномных последовательностей. Геномы бактериофагов Sam46-T и Sam46-C обладали идентичностью нуклеотидной последовательности более 95%, на основании

чего бактериофаг Sam46-T был выбран в качестве эталонного и далее анализ генома проводился на его примере. Для исследуемых бактериофагов была детально описана организация геномов, определена стратегия упаковки ДНК, а также проведен сравнительный геномный анализ для оценки филогенетического родства с известными на сегодняшний день бактериофагами. Важно отметить, что согласно филогенетическому анализу, все исследуемые фаги значительно отличаются от ближайших родственных фагов, и соответствуют критериям выделения их в новые виды.

Для исследуемых бактериофагов была проведена оценка стабильности при различных температурах и значениях pH. Все бактериофаги демонстрировали стабильность в диапазоне температур от 20 до 40°C, а также при значениях pH от 6,0 до 10,0. Наибольшая устойчивость к изменению значения pH была продемонстрирована для бактериофага Kirov. На основании анализа литической активности фагов на чувствительных штаммах для фагов Sam46-T, Sam46-C и Kirov наблюдается полный лизис бактериальной культуры, в то время как в случае действия бактериофага B-13 полного лизиса культуры не детектировали: после временного ингибирования рост бактерий возобновляется и через 9 ч культивирования выходил на уровень контроля.

Полученные Казанцевой О.А. результаты подробно рассматриваются в главе «Обсуждение полученных результатов», глава содержит анализ и обобщение экспериментальных данных и оценку результатов в свете ранее полученных научных знаний.

В заключении Олеся Андреевна обобщает все полученные данные и формулирует соответствующие выводы. Выводы соответствуют сформулированной цели и поставленным задачам. Автореферат в краткой форме отражает содержание диссертационной работы.

Замечания

Диссертационная работа Казанцевой О.А. выполнена на высоком уровне, полученные результаты обладают теоретической и практической ценностью. В процессе ознакомления с работой возникли некоторые вопросы дискуссионного характера, а также комментарии:

1. Группа бактерий *Bacillus cereus sensu lato* включает экологически очень разнообразные виды, представители которых крайне сильно отличаются своей патогенностью. Для оценки клинической значимости представителей этой группы и значения их для ветеринарии следует обсудить имеющиеся эпидемиологические данные и прежде всего для России.
2. Есть ли данные о поверхностных структурах клетки бактерий *Bacillus cereus sensu lato*, которые могут быть рецепторами фагов? Проводились ли эксперименты по сравнительной оценке эффективности посева

бактериофагов на штаммах разных бактериальных видов? Как Вы считаете возможно ли разработка системы фаготипирования представителей группы бактерий *Bacillus cereus sensu lato*?

3. По тексту бактериофаг Sam46-T упоминается под тремя разными названиями (Sam46-T, Sam46, vB_BcM_Sam46-T), что не столько затрудняет понимание текста диссертации, но значительно затруднит дальнейшее сопоставление геномных данных, публикации, текста диссертации и др. информации. Следует остановиться на каком-то унифицированном названии. Использование «Sam46» в случае как обозначения вида не всегда корректно использовано в тексте диссертации, например «Для фага Sam46 дополнительно было построено филогенетическое дерево» (стр. 59 и далее то тексту при упоминании генома Sam46-T). Все-таки бактериофаги Sam46-T и Sam46-C – это два разных штамма.
4. Бактериофаг Sam112 фигурирует по тексту (стр. 62), видимо, это отпечатка, возможно имелся ввиду Sam46-C, также Sam112 активно упоминается в публикациях?
5. В главе «Обсуждение полученных результатов» высказывается предположение о присутствии бактериофага Kirov в форме кольцевой плазмиды в цитоплазме хозяина, планируется ли экспериментальное подтверждение этой гипотезы?
6. Выполнено или планируется полногеномное секвенирование штаммов-хозяев выделенных умеренных бактериофагов, особенно бактериофага B13? Это важно в свете определения сайтов интеграции данных фагов в геномы, а также интересен вопрос о количестве профагов в штамме хозяине фага B13 и соответствия нуклеотидной последовательности профага и выделенного умеренного бактериофага.

Вопросы, возникшие в ходе ознакомления с диссертацией, носят дискуссионный характер и не снижают значимости выполненной работы.

Заключение

Диссертационная работа Казанцевой Олеси Андреевны на тему «Молекулярно-генетическая и физиологическая характеристика новых умеренных и вирулентных вирусов бактерий, инфицирующих представителей группы *Bacillus cereus sensu lato*», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология, является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, которая вносит вклад в изучение бактериофагов, что в дальнейшем может найти практическое применение в медицине и биотехнологии. Диссертационная работа Казанцевой Олеси Андреевны полностью

соответствует всем требованиям и пунктов 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 к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор, Казанцева Олеся Андреевна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник
лаборатории молекулярной генетики
микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ ФХМ
им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
(119435, г. Москва, ул. Малая
Пироговская, дом 1А, тел.
+79037782451, e-mail:
kornienkomariya@gmail.com)

к.б.н.

28.08.24



Корниенко Мария Андреевна

Подпись с.н.с. лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов, к.б.н. Корниенко М.А. заверяю

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ
ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА
России, к.б.н.



Кострюкова Елена Сергеевна

119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, дом 1а.

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Тел.: +7 (499) 246-7721

E-mail: info@rcpcm.org