

ОТЗЫВ

официального оппонента о научно-практической ценности диссертационной работы Червяковой Надежды Сергеевны «Оптимизация подходов к установлению аутентичности и консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - Микробиология

Актуальность темы диссертации

Установление аутентичности штаммов коллекционного фонда является одной из важных задач микробиологических коллекций для определения их таксономического положения с учетом требований современной систематики бактерий. Также к не менее важным направлениям работы коллекционных центров относится деятельность по сохранению штаммов в неизменном состоянии в течение длительного времени.

Диссертация Червяковой Н.С. представляет комплексное исследование, направленное на создание алгоритма установления аутентичности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, с применением современных методов фенотипического, генетического и протеомного анализа, а также оптимизации методов их долгосрочного хранения в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Сложности правильной идентификации штаммов микроорганизмов, выделенных до становления современной систематики прокариот, а также ее постоянное совершенствование, требуют наличие адекватных подходов к установлению их аутентичности, как на этапах формирования коллекционного фонда, так и при проведении номенклатурных ревизий, в этой связи актуальность темы диссертационной работы не вызывает сомнений. Не менее актуальными являются и те разделы работы, которые посвящены оптимизации методов долгосрочной консервации коллекционных штаммов, путем внедрения нового

оборудования и подбором оптимальных лио- и криопротекторов. Особую важность данной работе придает то, что объектом исследования послужили штаммы патогенных микроорганизмов, использующиеся в качестве контрольных, в различных областях научно-исследовательской и диагностической деятельности.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования

Червякова Н.С. впервые в своем диссертационном исследовании провела расширенную идентификацию 130 штаммов микроорганизмов I-IV групп патогенности из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», использующихся в качестве контрольных в диагностической и производственной деятельности, охарактеризовав их по биохимической активности, по молекулярно-генетическому профилю и спектрам рибосомальных белков. Полученные ей «молекулярные портреты» контрольных штаммов, позволяют проводить их видовую и внутривидовую дифференциацию на основе комплекса маркеров аутентичности, характеризующегося набором: из 5 – 13 биохимических субстратов, ферментируемых клетками микроорганизма; 1 - 9 фрагментов гпн-оперона с молекулярными массами в интервале 0,99 – 14,38 т.п.н и 1 - 15 рибосомальных белков с массой 3,06 – 9,78 кДа. Полученные результаты позволили разработать алгоритм определения аутентичности и систематической принадлежности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов. Также ей были предложены оптимизированные схемы долгосрочной консервации коллекционных штаммов с применением методов лиофилизации на обновленных сублимационных установках и низкотемпературного замораживания.

Червякова Н.С. проанализировала достаточное количество отечественных и зарубежных литературных источников последних 5-7 лет, посвящённых тематике диссертационного исследования. Обзор литературы

представляет научный интерес как для микробиологов, обеспечивающих коллекционную деятельность в области использования штаммов патогенных микроорганизмов, так и для специалистов, занимающихся диагностическими исследованиями и использующими в своей работе контрольные штаммы.

Результаты исследований, формирующие представления о современных подходах к установлению аутентичности штаммов патогенных микроорганизмов и их долгосрочной консервации, отражены в семи методических рекомендациях, двое из которых федерального уровня внедрения и могут применяться на этапах формирования коллекционного фонда патогенных микроорганизмов и его поддержания в коллекционных центрах.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

При выполнении экспериментальной работы Червякова Н.С. использовала микробиологические, биохимические, серологические, молекулярно-генетические методы исследования и методы долгосрочной консервации коллекционных штаммов (лиофилизацию и низкотемпературное замораживание микроорганизмов при температуре минус 70 °С), выбор которых полностью соответствовал цели и задачам. Положения, выносимые на защиту, и выводы диссертационной работы логично вытекают из полученных в ходе экспериментальной работы данных. Результаты диссертационного исследования статистически обработаны с использованием достаточного количества показателей.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению

Работа Червяковой Н.С. представляет собой законченное научное исследование, которое отвечает всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, главы материалы и методы, трех глав экспериментальных исследований, заключения, практических рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки и выводов. Список использованной литературы включает 251 источник (88 отечественных и 163 иностранных).

Во введении сформулированы цель и задачи исследования, определены положения, выносимые на защиту. Показаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В главе «Обзор литературы» приведен детальный анализ развития принципов классификации, идентификации и установления аутентичности бактерий, отражено современное состояние проблемы консервации бактерий в коллекционных центрах и показана область применения коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов в научно-исследовательской деятельности и практике здравоохранения.

В главе «Материалы и методы» представлены коллекционные штаммы микроорганизмов I-IV групп патогенности, используемые химические реагенты, подробно описаны методы исследования и статистической обработки результатов исследований.

Результаты собственных исследований представлены тремя главами. В первой главе Червякова Н.С. провела расширенный анализ 130 коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, использующихся в качестве контрольных в научно-исследовательской и диагностической деятельности, с применением культурально-морфологических, фенотипических, молекулярно-генетических и протеомных методов, установив при этом маркеры аутентичности этих штаммов.

Вторая экспериментальная глава посвящена разработке алгоритма установления аутентичности референтных штаммов патогенных микроорганизмов и созданию базы данных для его выполнения.

В третьей главе собственных исследований представлена разработка схемы процесса консервации коллекционных тест-штаммов патогенных

бактерий, методами лиофилизации и низкотемпературного замораживания, включающей оптимизацию этапов консервации, подбор крио- и лиопротекторов, определение качества получаемых препаратов штаммов на основе оценки жизнеспособности их клеток и прогнозируемых сроков хранения. Статистическая обработка экспериментальных данных не вызывает сомнений в достоверности полученных диссертантом результатов.

Приведенное в диссертационной работе «Заключение» показывает способность автора анализировать полученные в ходе проведения экспериментальной работы данные, адекватно резюмирует основные результаты и обосновывает перспективы их практического применения.

Выводы полностью соответствуют цели и задачам диссертационного исследования, подтверждены достаточным объемом экспериментального материала и являются логическим завершением представленной работы.

При общей высокой положительной оценке работы имеется ряд вопросов:

1. Для установления маркеров аутентичности в диссертации был использован обширный набор методов, в то же время одним из наиболее популярных подходов в определении видовой принадлежности микроорганизмов является сквенирование гена 16S рДНК, не применявшийся в данной работе. Каковы причины этого и планируется ли в перспективе использовать этот подход в разработанном алгоритме аутентичности коллекционных штаммов?
2. Наибольшее количество неаутентичных образцов было выявлено при номенклатурной ревизии представителей рода *Bacillus*. С чем это связано?
3. Из результатов работы следует, что оба используемых метода долгосрочной консервации: лиофилизация и низкотемпературное замораживание, хорошо зарекомендовали себя при хранении коллекционных штаммов. Какому методу и в каких случаях следует отдавать предпочтение?

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Червяковой Надежды Сергеевны «Оптимизация подходов к установлению аутентичности и консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов» в полной мере отражает цель, задачи и основные положения диссертации. Все результаты экспериментальной работы отражены в автореферате.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 4 в изданиях рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных исследований. Материалы диссертации широко апробированы на всероссийских и международных конференциях.

Заключение

Диссертация Червяковой Надежды Сергеевны «Оптимизация подходов к установлению аутентичности и консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов» представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком профессиональном уровне.

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости, уровню экспериментальных исследований диссертационная работа «Оптимизация подходов к установлению аутентичности и консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов» в полной мере соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.13 г., с изменениями в редакции постановлений РФ № 335 от 21.04.16 г., № 748 от 02.08.16 г., № 650 от 29.05.17 г., № 1024 от 28.08.17 г., предъявляемым ВАК Минобрнауки России к

кандидатским диссертациям, а ее автор Червякова Надежда Сергеевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Доктор биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология, профессор, профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»
410012, г. Саратов, Театральная пл., 1.
(8452)69-24-41

scherbakov.2014@yandex.ru



Щербаков Анатолий Анисимович

Подпись д.б.н., проф. Щербакова А.А. заверяю:
Ученый секретарь ученого совета ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»



А.И. Муравлев