



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Коми научный центр Уральского отделения
Российской академии наук»
(ФИЦ Коми НЦ УрО РАН)

РОССИЯСА НАУКА ДА ВЫЛЫС ВЕЛӚДЧАН
МИНИСТЕРСТВО

«Россияса наукаяс академиялӓн
Урал юкӓнса Коми наука шӓрин»
туялан удж нуӓдысь федеральной шӓрин
Федеральной канму
сьӓмкуд наука учреждение
(ТФШ РНА УрЮ Коми НШ)

Коммунистическая ул., д. 24, Сыктывкар, ГСП-2, Республика Коми, 167982
Тел.: (8212) 24-10-26, факс: (8212) 24-22-64 E-mail: info@frc.komisc.ru <http://www.komisc.ru>
ОКПО 02700032, ОГРН 1021100511332, ИНН/КПП 1101481574/110101001

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Федерального
исследовательского центра «Коми
научный центр Уральского отделения
Российской академии наук»,
д.б.н., чл.-корр. РАН
С.В.Дѐгтева
20 » мая 2024 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
«Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» о
научно-практической значимости диссертационной работы
Макашовой Марины Александровны
на тему: «Анализ взаимодействия *Yersinia pestis* с почвенной микрофауной
Горно-Алтайского высокогорного очага чумы»,
представленной на соискание учёной степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.11. – микробиология

Актуальность темы исследования.

Чума остается инфекцией, эпидемическое распространение которой представляет угрозу и в настоящее время. Это обусловлено наличием природных очагов чумы во многих странах мира, высокой вирулентностью возбудителя заболевания, бактерий *Yersinia pestis*, сохраняющейся вероятностью его

использования в биотеррористических целях. В этой связи необходимым является продолжение исследований, направленных на совершенствование системы противоэпидемических мероприятий в отношении этой инфекции. Одно из них состоит в дальнейшем изучении механизмов персистенции в природе *Y. pestis*. Особую значимость этим исследованиям для отечественной эпидемиологии придает наличие на территории Российской Федерации многочисленных природных очагов чумы, характеризующихся значительным разнообразием биоценотических связей, которые включают циркуляцию чумного микроба. Сложность и малоизученность структуры таких биоценозов в различных географических зонах определяют актуальность исследований диссертанта, направленных, главным образом, на изучение механизмов взаимодействия *Y. pestis* с микрофауной одного из очагов чумы - Горно-Алтайского высокогорного очага.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. В диссертации Макашовой М.А. представлены результаты, отвечающие критерию научной новизны. В частности, автором выявлена зависимость роста штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном и Тувинском горном очагах, от аминокислот метионина, фенилаланина, треонина, цистеина, лейцина, пролина с установлением генетических причин ауксотрофности возбудителя чумы по некоторым из них. Получен запатентованный набор рекомбинантных флуоресцентных штаммов *Y. pestis*, позволяющий проводить индикацию возбудителя в экспериментальных биопробах (патент № RU 2769790 C1).

Анализ нуклеотидных последовательностей генов рибосомальной РНК позволил установить существование простейших *A. castellanii* и *D. sphaerocephalum* в почвах нор грызунов на различных участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Показана способность бактерий *Y. pestis* линии 4.ANT к выживанию в течение 22 месяцев в условиях коинкубации с культурой амёб *A. castellanii*.

В составе паразитарной системы «нематода – блоха» из Горно-Алтайского и Тувинского горного очагов чумы идентифицированы представители α -протеобактерий, γ -протеобактерий и актиномицетов.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Обнаруженные автором генетические и фенотипические особенности штаммов нескольких филогенетических линий античного биовара *Y. pestis* могут использоваться для внутривидовой дифференциации этого возбудителя. Представленные экспериментальные данные о выявлении представителей простейших и нематод в образцах почв нор грызунов из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, а также результаты изучения взаимодействия бактерий *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT с культурами амёб *A. castellanii* и почвенными нематодами расширяют представления о возможных механизмах циркуляции возбудителя в природных очагах чумы. Результаты исследования состава микробиоты паразитарной системы «нематода – блоха» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы дополняют знания о персистенции *Y. pestis* в окружающей среде.

Флуоресцентные штаммы *Y. pestis*, полученные с использованием плазмид pTurboGFP-B и Katushka-2S, позволяют визуализировать картину взаимодействия возбудителя чумы с объектами биотической и абиотической природы. Указанные штаммы депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий Российского противочумного института «Микроб». Методика их получения изложена в методических рекомендациях, одобренных Ученым советом института «Микроб» и утвержденных его директором (протокол №5 от 05.12.2019 г.).

Результаты исследований реализованы также депонированием в международной базе данных NCBI GenBank 29 нуклеотидных последовательностей участков генов рибосомальной РНК почвенных амёб, нематоды из Горно-Алтайского высокогорного очага, энтомопаразитических нематод *Rubzovinema sp.* и бактерий *Wolbachia sp.*

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформированных в диссертации. Значительный объём выполненных исследований, использование современных методических подходов, прецизионного оборудования, адекватных статистических методов анализа, грамотная интерпретация полученных данных определяют достоверность полученных результатов работы, корректность выводов и положений, выносимых на защиту. Методический уровень проведённого диссертационного исследования, а также степень доказательности весьма высок и не вызывает сомнений. Цель и задачи, поставленные в диссертации, выполнены в полном объёме.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертационная работа Макашовой М.А. соответствует следующим областям паспорта специальности 1.5.11. – микробиология, биологические науки:

1. Систематика и филогения микроорганизмов.
9. Биосферная микробиология, в том числе почвенная микробиология, микробиология водных экосистем, подземной биосферы, горных пород, атмосферы.
11. Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ.
12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности.
13. Симбиотические микробные сообщества, в том числе микробиота человека и животных.
15. Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Макашовой М. А. изложена на 189 страницах текста, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», трех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 288 публикаций, в том числе 84 отечественных и 204 иностранных. Работа написана в традиционном стиле, включает в себя 28 рисунков и 18 таблиц.

В разделе «Введение» приводится основная характеристика диссертационной работы: актуальность и степень разработанности темы исследования, цель и задачи, описание научной новизны исследования, его теоретическая и практическая значимость, личный вклад автора в исследования, положения, выносимые на защиту, внедрение результатов исследования, степень достоверности и апробация работы, личный вклад автора.

В первой главе диссертации представлен обзор литературы, содержащий сведения о генетическом разнообразии, географическом распространении, внутривидовой классификации и краткой характеристике подвидов *Y. pestis*. Обсуждаются проблемы, связанные с персистенцией возбудителя в природных очагах чумы. Особое внимание уделено рассмотрению вопросов взаимодействия *Y. pestis* с членами почвенных биоценозов, главным образом, простейшими и нематодами

Во второй главе диссертации приводится описание объектов исследования, методов экспериментальных исследований и статистического анализа.

Третья, четвертая и пятая главы содержат результаты собственных исследований диссертанта, а также их обсуждение, соотнесение с аналогичными данными, имеющимися в соответствующей литературе. Материал изложен логично, последовательно, грамотно, выдержан в едином стиле, имеет завершённый характер.

Автором проведена сравнительная оценка свойств штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном и ряде других природных очагах чумы. Представлены результаты конструирования, оценки свойств и возможности применения в экспериментальной работе рекомбинантных флуоресцентных штаммов с использованием реципиентного штамма *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT и плазмид pTurboGFP-B и pKatushka-2S.

С помощью молекулярно-генетических методов осуществлен анализ таксономической принадлежности простейших из почв нор грызунов Горно-

Алтайского высокогорного очага чумы. Дана количественная оценка динамики колониеобразующей способности бактерий *Y. pestis* KM2083 при совместном инкубировании с клетками амёб *A. castellanii* 13А в течение 22 месяцев. Показано отсутствие влияния указанного коинкубирования на морфологические, биохимические свойства и вирулентность возбудителя чумы.

Определена таксономическая принадлежность почвенных нематод из нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы; изучено влияние на нематод бактерий *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, в том числе путем биопленкообразования. Определена таксономическая принадлежность нематод блох из Тувинского горного очага чумы; изучен состав микробиоты энтомопаразитических нематод из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного природных очагов чумы.

В заключении приводится краткое обобщение результатов проделанной работы, подводятся ее основные итоги.

По итогам выполненных исследований и критического анализа результатов автор формулирует **выводы**, которые полностью вытекают из представленных экспериментальных данных. В своей совокупности результаты, выводы и положения, выносимые на защиту, позволяют считать, что цель и задачи, поставленные автором, были достигнуты в полном объёме.

Апробация и полнота опубликования материалов исследования. Материалы диссертационной работы представлены на 13 конференциях и съездах различного уровня. Основные результаты диссертационной работы отражены в 14 печатных работах, включая 1 патент на изобретение, 4 статьи в периодических изданиях, включенных в перечень ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России, из них 3 статьи опубликованы в журналах, индексируемых в МБД Scopus.

Личный вклад диссертанта заключается в самостоятельном обзоре научной литературы по теме исследования, получении и анализе всего объёма экспериментальных данных за исключением нескольких, оговоренных

диссертантом, совместных исследований с сотрудниками института «Микроб». С участием научного руководителя сформулированы цели, задачи и положения, выносимые на защиту.

Соответствие автореферата диссертации. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и в полной мере отражает полученные результаты исследования.

Рекомендации по использованию материалов диссертации. В целом, результаты диссертационной работы могут быть востребованы при проведении дальнейших исследований природных резервуаров чумы в почвенных биоценозах иных природных очагов, изучении механизмов персистенции *Y. pestis* в окружающей среде.

Диссертация написана грамотным литературным языком, содержит небольшое количество не выправленных опечаток (стр. 28, 33, 43, 82, 112, 122, 127, 137, 142). К числу достоинств работы следует отнести логично построенный и лаконичный обзор литературы по рассматриваемым в диссертации вопросам, значительный объем проведенных исследований, широту арсенала использованных методов. Так, оказалось эффективным для изучения взаимодействия сокультивируемых клеток амёб и *Y. pestis* применение нескольких оригинальных методических подходов: выделение бактерий и простейших с территорий одного биоценоза, использование солевого буфера, поддерживающего жизнедеятельность амёб, но не содержащих веществ, в том числе аминокислот, необходимых для роста штаммов *Y. pestis*.

Замечания и вопросы по работе.

1. Следовало бы указать, кем и в какое время года проводился сбор проб из почв нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы (подглавы 4.1 и 5.1).

2. Если представленные в таблицах 3.2, 3.4, 3.5 данные получены не только в данной работе, были бы желательны соответствующие ссылки.

3. Название диссертации не в полной мере охватывает все представленные в работе материалы, так как исследования проводились и с пробами, полученными не только из Горно-алтайского горного очага чумы.

4. Имеются ли иные, кроме описанных в диссертации, перспективы применения в экспериментальных исследованиях полученных флуоресцентных штаммов *Y. pestis*?

Заключение. Диссертационная работа Макашовой Марины Александровны «Анализ взаимодействия *Yersinia pestis* с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. - микробиология, биологические науки, является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи комплексной характеристики свойств и взаимодействия штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, имеющая значение для развития микробиологии и эпидемиологии возбудителя чумы.

По своей актуальности, научной новизне, объёму проведённого исследования, степени достоверности полученных результатов и выводов, теоретической и практической значимости для науки и практики, рекомендациям по использованию результатов диссертационная работа Макашовой Марины Александровны полностью соответствует критериям, указанным в разделе II, п.9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 25.01.2024), а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – микробиология.

Отзыв обсужден и утвержден на объединённом заседании лабораторий физиологии микроорганизмов и криофизиологии крови Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения

Российской академии наук» (ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН), протокол №3 от 15.05.2024 г. Присутствовало 10 человека, «за» - 10, «против» - нет, «воздержались» - нет.

Отзыв составили:

Заведующий лабораторией физиологии
микроорганизмов ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН
доктор медицинских наук
(профессор по специальности 03.00.07 – микробиология)

20.05.2024

Бывалов Андрей Анатольевич

Директор ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН
Доктор медицинских наук
(14.00.17 – нормальная физиология)

20.05.2024

Бойко Евгений Рафаилович

Контактная информация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук». 167987, Республика Коми, Сыктывкар, ГСП-2, Коммунистическая, 24. Сайт: <http://physiol.komisc.ru>; e-mail: info@frc.komisc.ru; тел. (8212) 24-10-26, факс: (8212) 24-22-64

Подписи Бывалова А.А. и Бойко Е.Р. заверяю:
Заместитель директора по научной работе
ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН
Доктор биологических наук

20.05.2024



Харин Сергей Николаевич