ОТЗЫВ

доктора биологических наук Шелудько Андрея Вячеславовича на диссертационную работу **Макашовой Марины Александровны** на тему: «Анализ взаимодействия *Yersinia pestis* с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Диссертационная работа М.А. Макашовой, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, посвящена изучению взаимодействия *Yersinia pestis* с представителями почвенной микрофауны, выделенными на эпизоотически активных территориях Горного Алтая. Изучение циркуляции *Y. pestis* в биоценозах является актуальным направлением исследований, необходимых для выяснения механизмов сохранения возбудителя чумы в природных очагах во время межэпизоотических периодов. Цель диссертационной работы Макашовой М.А. заключалась в комплексной характеристике свойств и взаимодействия штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Для достижения поставленной цели сформировано 5 задач, решение которых позволило автору получить данные, свидетельствующие о перспективности исследований, рассматривающих в качестве одной из экологических ниш существования чумного микроба почвенный биоценоз и его микрофауну.

Работа соответствует биологической отрасли науки, а именно: специальности 1.5.11 – микробиология, касающейся области исследования теоретических основ жизнедеятельности микроорганизмов, их взаимодействия с факторами внешней среды и живыми организмами.

НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ, ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ, СФОРМУЛИРОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

Выявлена зависимость роста штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы от аминокислот метионина, фенилаланина, треонина, лейцина, пролина и цистеина. У ряда исследованных штаммов выявлены мутации, приводящие к ауксотрофности по некоторым из перечисленных аминокислот.

Получены производные штаммов *Y. pestis* античного биовара основного подвида и алтайского биовара центральноазиатского подвида, несущие плазмиды с генами флуоресцентных белков (патент № RU 2769790 C1 «Набор рекомбинантных флуоресцентных штаммов бактерий вида *Y. pestis* античного биовара основного подвида и алтайского биовара центральноазиатского подвида для индикации возбудителя чумы в экспериментальных образцах»).

Показано широкое распространение на различных участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в почвах нор грызунов простейших *Acanthamoeba castellanii* и *Dictyostelium sphaerocephalum*. Обнаружена способность *Y. pestis* линии 4.ANT к длительному выживанию при совместном культивировании с *A. castellanii* в отсутствие источника питательных веществ.

Исследована микробиота паразитарной системы «нематода-блоха» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы, в составе которой выявлены представители α-протеобактерий, γ-протеобактерий и актиномицетов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Полученные в ходе выполнения работы результаты расширяют существующие представления о биохимических и генетических особенностях штаммов *Y. pestis* различных филогенетических линий античного биовара и могут быть использованы для внутривидовой дифференциации возбудителя. Расширены знания о членах почвенного биоценоза Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Полученные знания о способности штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT вступать в ассоциации с почвенными амебами и нематодами дополняют представления о природных резервуарах чумы и персистенции возбудителя. Проведенная в работе валидация сконструированных штаммов *Y. pestis*, содержащих плазмиды с генами флуоресцентных белков, позволяет их использовать для изучения возбудителя чумы *in situ*. В базе данных NCBI GenBank депонированы 29 нуклеотидных последовательностей, включающих участки рибосомальных генов почвенных амеб и нематоды из Горно-Алтайского высокогорного очага, энтомопаразитических нематод *Rubzovinema sp*. и бактерии *Wolbachia sp*.

СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ НАУЧНЫХ ПОЛОЖЕНИЙ, ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

Работа М.А. Макашовой выполнена на хорошем научно-методическом уровне. Автор проанализировал большой объем литературных данных и убедительно обосновал выбор направления собственных исследований. Экспериментальные исследования проведены с использованием современных методов молекулярной биологии и микробиологии. Достоверность экспериментальных данных проверена методами статистического анализа. Пять основных выводов, приведенных в диссертации, обоснованы анализом достаточно большого объема достоверных экспериментальных данных. Положения, выносимые автором на защиту, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы сравнением экспериментальных данных с результатами анализа литературы.

Результаты диссертационного исследования М.А. Макашовой прошли апробацию на научно-практических конференциях различного уровня. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 1 патент на изобретение, 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований (специальность микробиология).

СООТВЕТСТВИЕ ПАСПОРТУ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ

Диссертационная работа «Анализ взаимодействия *Yersinia pestis* с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы» соответствует специальности 1.5.11 – микробиология (биологические науки) по направлениям исследований:

1. Систематика и филогения микроорганизмов

5. Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов

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

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты диссертационной работы М.А. Макашовой могут быть использованы в научных учреждениях биологического профиля; при подготовке курсов лекций по молекулярной биологии и микробиологии в высших учебных заведениях. Полученные экспериментальные данные и разработанные методические подходы будут полезны при оптимизации тактики эпизоотологических обследований природных очагов чумы.

Заключение. Структура диссертационной работы вполне типична. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, трех глав с результатами собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы включает 288 наименований. В обзоре литературы суммирована современная информация о генетическом разнообразии и географическом распространении штаммов *Y. pestis*. Обобщены современные представления об экологии и персистенции *Y. pestis* в природных очагах чумы. Описано взаимодействие возбудителя чумы с членами почвенных биоценозов. Диссертация изложена на 189 страницах, содержит 18 таблиц и иллюстрирована 28 рисунками. Спектр методов, использованных соискателем при выполнении работы, благоприятно отразился на глубине проработки намеченных задач. Венчает работу заключение и 6 выводов.

Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора, выполненных в соавторстве, что отражено в публикациях по теме диссертационной работы. Собственный вклад соискателя состоит также в его непосредственном участии в апробации результатов исследований на научных мероприятиях. Следует отметить, что в статьях, рекомендованных перечнем ВАК РФ, М.А. Макашовой является первым автором. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

Все это свидетельствует о высоком профессиональном уровне, научной зрелости и перспективности диссертанта. В этом дополнительно убеждает анализ экспериментальной части диссертационной работы. Полученные диссертантом результаты убедительно свидетельствуют о масштабности проведенной работы и определяющем творческом вкладе соискателя.

При прочтении работы возникает ряд вопросов и замечаний:

На рисунках (4.6 и 4.8), иллюстрирующих взаимодействие флуоресцирующих штаммов *Y. pestis* с клетками *A. castellanii* 13A, представленные микрофотографии не позволяют получить четких представлений о локализации бактерий внутри амебы или на их поверхности.

В работе были сконструированным производные штаммов *Y. pestis*, содержащие плазмиды pTurboGFP-B и pKatushka2S-B. Чем обусловлен выбор для исследований, только меченных GFP бактерий?

Анализ ДНК, выделенной из паразитарной системы «нематода-блоха», показал наличие в ее составе участков генов 16S рРНК и *recA*, характерных для родов

Cutibacterium, Pseudomonas, Brevundimonas и *Wolbachia*. Что известно об антагонизме/конкуренции представителей этих родов и *Y. pestis*?

Исчерпывающие ответы соискателя на вопросы послужат (наряду с материалами диссертации) дополнительным основанием для положительного заключения по диссертационной работе.

Таким образом, диссертация **Марины Александровны Макашовой** «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, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи и вносящей вклад в исследования теоретических основ жизнедеятельности микроорганизмов, их взаимодействия с факторами внешней среды и живыми организмами.

По актуальности, новизне и достоверности полученных результатов, обоснованности сделанных выводов, научной и научно-практической значимости работа «Анализ взаимодействия *Yersinia pestis* с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы» отвечает требованиям п. 9-14 “Положения о присуждении ученых степеней” (утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. от 25.10.2024 г. №62)), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор этой работы **Марина Александровна Макашова** заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности **1.5.11** – микробиология (биологические науки).

Отзыв составил
Заведующий лабораторией генетики микроорганизмов
Института биохимии и физиологии растений и
микроорганизмов – обособленного структурного
подразделения Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского
центра «Саратовский научный центр
Российской академии наук»
доктор биологических наук Андрей Вячеславович Шелудько
25 апреля 2025 г.

410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13, ИБФРМ РАН
http://ibppm.ru/; раб. тел. (8452)97-04-44; e-mail: shel71@yandex.ru

Подпись Андрея Вячеславовича Шелудько *заверяю*
Ученый секретарь
ФИЦ СНЦ РАН Ольга Геннадьевна Селиванова
25 апреля 2025 г.