

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Клементьевой Татьяны Николаевны «Микробиота кишечника как фактор, влияющий на физиологию и восприимчивость к *Bacillus thuringiensis* личинок *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae)», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.14 Энтомология (биологические науки)

Актуальность исследования. Диссертационная работа Клементьевой Татьяны Николаевны, несомненно, является актуальной как в фундаментальном, так и в прикладном отношении. В настоящее время исследования бинарной системы «микробиом-хозяин» основана на концепции холобионта и рассматривается как функциональное единство организма хозяина и ассоциированных с ним микроорганизмов. В этой связи кишечная микробиота рассматривается не как второстепенный компонент, а как важнейший регулятор пищеварения, устойчивости к стрессорам и патогенам. Исследования микробиома насекомых активно развиваются во всем мире, о чем свидетельствует рост числа публикаций в ведущих научных журналах за последние годы. Особенно интенсивно изучаются модели *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* и других видов, для которых установлена фундаментальная роль микробиома в регуляции физиологических процессов, иммунного ответа и адаптации к изменяющимся условиям среды. Эти данные важны для понимания механизмов устойчивости насекомых-вредителей к условиям среды и инсектицидам, а также для совершенствования биотехнологических подходов к защите растений.

Научная новизна работы заключается в комплексном подходе, который охватывает широкий набор методов в одном исследовании: от стандартных энтомологических до методов молекулярной биологии. Впервые проведен комплексный анализ последствий длительного действия низких доз антибиотика на кишечную микробиоту, физиологию и восприимчивость личинок *Galleria mellonella* к энтомопатогену *Bacillus thuringiensis* (Bt) в ряду поколений. В отличие от большинства ранее опубликованных исследований, где антибиотики применялись в высоких дозах и на протяжении ограниченного числа поколений преимущественно для элиминации микробиоты или выявления роли отдельных симбионтов, в данной работе реализована модель длительной селекции низкими дозами амикацина. Такой подход позволил рассматривать антибиотик как экологический фактор хронического давления, приводящий к перестройке микробного сообщества и адаптационным изменениям хозяина.

Обоснованность и достоверность представленных в диссертации материалов в целом не вызывает сомнений. Она обеспечена логично выстроенным экспериментальным дизайном, наличием контрольной и экспериментальной линий, анализом нескольких поколений (F1, F10, F18 и F30), сочетанием культуральных, биохимических, метагеномных, и статистических методов исследований и обработки материала.

Структура и содержание диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах, состоит из введения, трех глав, выводов, заключения, а также списка литературы и приложений. Текст иллюстрирован 19 рисунками и содержит 4 таблицы. Список использованной литературы включает 291 источник.

Во **«Введении»** обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цель и задачи исследования, отмечена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены основные положения, выносимые на защиту, представлен личный вклад автора, сведения о публикациях по теме диссертации и об апробации результатов исследований.

Глава 1. «ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ» (стр. 14-54). Хорошо структурирована, содержит обзор исследований по проводимой тематике. Основные достижения в области микробиологии насекомых, их устойчивости к патогенам, формирование микробных сообществ в свете концепции холобионта и адаптаций насекомых к стрессовым факторам.

В заключении к главе 1 подводятся некоторые итоги имеющихся исследований и представлен логический переход к собственному исследованию структуры и роли микробиоты в формировании устойчивости к энтомопатогену.

Глава 2. «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ» (стр. 55-72) состоит из семи подразделов и знакомит с методическими подходами к работе и обработке полученных данных. Эти методы достаточно подробно описаны на 17 страницах текста.

Замечания и вопросы к главе 2.

– По какому принципу для функциональных тестов были выбраны именно эти штаммы, указанные в подразделе 2.2.2. Симбиотические бактерии? В какой степени они представляют доминантную и минорную фракции микробиоты обеих линий?

– Раздел 2.4.2. Метагеномный анализ (с. 66-67) методически важен, но в нем хотелось бы видеть более ясное указание числа образцов на группу, глубины секвенирования и т.д.

– Чем был обоснован выбор OTU-подхода, а не ASV-подхода, который в настоящее время считается более точным для анализа ампликонных данных? Может ли использование OTU-кластеризации снижать разрешающую способность при анализе близкородственных таксонов рода *Enterococcus*?

– Проводились ли отрицательные контроли на стадиях выделения ДНК и амплификации, чтобы исключить лабораторную контаминацию, особенно при интерпретации редких и минорных компонентов микробиоты? Если да, то почему эта информация не отражена в разделе 2.4.2. «Метагеномный анализ»?

Глава 3. «РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ» (стр. 73-103), изложена на 30 страницах текста, содержит три подраздела.

Подраздел 3.1. (стр. 73-93) содержит результаты исследований динамики численности и структуры микробиоты, изменения физиологических параметров и жизненные показатели личинок *G. mellonella* в поколениях F1, F10 и F18.

Раздел 3.1.1. посвящен одному из ключевых результатов диссертации - сравнению количественных и таксономических параметров кишечной микробиоты у личинок *G. mellonella* контрольной и экспериментальной линий в поколениях F1, F10 и F18. Получены интересные результаты, указывающие на перестройку кишечной микробиоты *G. mellonella* при длительном культивировании на диете с амикацином. Доказано изменение численности селективно культивируемой фракции бактерий в ранних поколениях и увеличение разнообразия и смена доминирующих энтерококков в поколении F18.

Замечания и вопросы. Фактически структурный анализ микробиоты методом секвенирования 16S рРНК выполнен только для поколения F18. Для поколений F1 и F10 представлены только культуральные данные по КОЕ. Хотелось уточнить у диссертантки почему для F1 и F10 поколений не проводился молекулярно-генетическое исследование микробиоты?

В разделе 3.2. (стр. 94-98) представлены результаты исследований взаимодействия Vt и энтерококков, оценка чувствительности личинок *G. mellonella* поколения F18 к Vt и анализ вклада кишечных симбионтов в развитие Vt-инфекции. Клементьевой Т.Н. показано, что при прямом тестировании *in vitro* между Vt и выделенными энтерококками N-линии и R-линии зоны угнетения роста отсутствовали, что может указывать на отсутствие прямого антагонизма в стандартных лабораторных условиях.

В подразделе 3.2.1. установлено, что личинки R-линии поколения F18 после перорального скормливания Vt сохраняли 100% выживаемость, тогда как у личинок N-линии выживаемость к седьмым суткам снижалась до 50%. На этой основе диссертантка делает вывод об утрате чувствительности R-линии к энтомопатогену.

В подразделе 3.2.2. показано, что сами энтерококки гибели личинок не вызывали, однако при совместном скормливании с Vt повышали выживаемость личинок N-линии. При этом для R-линии сохранялась 100% выживаемость как при раздельном, так и при совместном введении энтерококков и Vt.

В подразделе 3.2.3. Клементьевой Т.Н. сделан вывод о том, что кишечные симбионты, прежде всего *Enterococcus*, вносят вклад в снижение восприимчивости хозяина к Vt, что может быть связано с их пробиотическими свойствами.

Раздел 3.3. (стр. 99-103) посвящен анализу протеолитического статуса кишечника личинок *G. mellonella* в поколении F30. Сильная сторона подраздела - сочетание зимографии, спектрофотометрического анализа и ингибиторного тестирования, позволившее показать, что у устойчивой R-линии изменен протеолитический статус кишечника, а после Vt-инфекции особенно отчетливо меняется активность ферментов, связанных с сериновыми протеазами.

Замечания и вопросы. Диссертанткой анализируется только поколение F30, что позволяет изучить уже сформировавшийся фенотип, но не дает прямого ответа, когда именно и как складывались различия в протеолитическом статусе. В итоге описано состояние системы на позднем этапе, но это не реконструирует поэтапное становление механизма устойчивости. Данное замечание не снижает общей научной ценности диссертации, а лишь указывает на перспективы дальнейших исследований.

Приложение к диссертационной работе состоит из 4 рисунков и 1 таблицы, содержит дополнительные уточняющие материалы по диссертационной работе. Замечаний к данному разделу диссертационной работы нет.

По тексту рукописи встречаются малочисленные опечатки и редакционные неточности, в частности:

Стр. 12 – в основном тексте диссертации Глава 3 названа «РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ», а в Содержании «ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ».

Стр. 19 – «специализированная клетка»; правильно: «специализированная клетка».

Стр. 19 – «ооцит захватывает симбионта»; правильно: «захватывает».

Стр. 19 – «экзоцитотоз»; вероятно, правильно: «экзоцитоз».

Стр. 22 – «у ряда насекомых»; правильно: «насекомых».

Стр.22 – «*Zophobas morio*» (= *Zophobas atratus*) назван «мучным хрущачком», при этом большим мучным хрущачком принято считать *Tenebrio molitor*.

Стр. 87 – в подписи к рисунку 9: «для кисых протеаз»; правильно: «кислых».

Стр. 96 – «симбионтов вощиной огнёвки»; правильно: «вощинной огнёвки».

Стр. 96 – «совместно не приводит к гибели»; правильно: «не приводила».

Отмеченные замечания и вопросы имеют преимущественно уточняющий, дискуссионный и редакционный характер и не умаляют научной значимости проведенного исследования.

Результаты работы подведены в **Заключении** и шести **Выводах**. Выводы и положения логично вытекают из полученных данных и полностью обоснованы результатами исследования.

Автореферат полностью соответствует тексту диссертации. Результаты исследования апробированы на 8 всероссийских и международных конференциях и отражены в 3 публикациях, рекомендованных ВАК.

Заключение. Диссертационная работа Клементьевой Татьяны Николаевны «Микробиота кишечника как фактор, влияющий на физиологию и восприимчивость к *Bacillus thuringiensis* личинок *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae)» является самостоятельной, завершённой, научно-квалификационной работой. По содержанию, актуальности, новизне, научному и методологическому уровню, практической ценности полученных результатов полностью соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (с последующими изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Клементьева Татьяна Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.14. Энтомология (биологические науки).

Официальный оппонент:

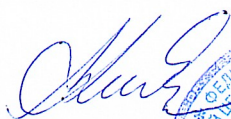
Кандидат биологических наук по специальности 03.02.05 - Энтомология,

И.о. заместителя директора по научной работе,

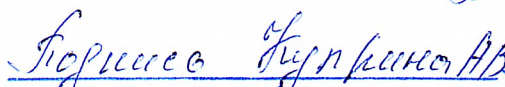
E-mail: kuprins@mail.ru

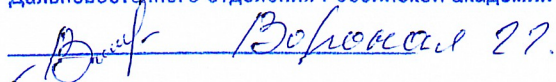
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690022, г. Владивосток, пр-т. 100-летия Владивостока, д. 159, тел.: 8(423) 231-04-10, E-mail: info@biosoil.ru, <https://www.biosoil.ru/>.

22.04.2026 г.



Александр Витальевич Куприн


Начальник отдела кадров Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии" Дальневосточного отделения Российской академии наук


Воронцов 27.

