

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной и инновационной
деятельности Национального исследовательского
Томского государственного университета,
доктор технических наук, профессор



[Signature] Замятин Александр Владимирович

« 22 » апреля 2026 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» о научно-практической ценности диссертационной работы Клементьевой Татьяны Николаевны «Микробиота кишечника как фактор, влияющий на физиологию и восприимчивость к *Bacillus thuringiensis* личинок *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae)», представленной к защите в диссертационный совет 24.1.119.01 (Д 003.033.01), созданный на базе Института систематики и экологии животных СО РАН на соискание учёной степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.14. Энтомология

Актуальность темы выполненной работы и её связь с соответствующими отраслями науки и практической деятельностью

Диссертационная работа Т.Н. Клементьевой посвящена одной из современных актуальных проблем биологии – адаптации организмов к изменяющимся, часто стрессовым, условиям окружающей среды, а именно роли микробиоты в жизнедеятельности и адаптированности животных на примере вошинной огневки *Galleria mellonella*. Учитывая, что кишечная микробиота участвует в пищеварении, детоксикации природных токсинов, инсектицидов и поллютантов, т. е. влияет на физиологические процессы, иммунитет и поведение хозяина, а в целом на эволюцию вида, актуальность данного исследования не вызывает сомнения.

Состояние микробиоты может быть нарушено в результате негативных воздействий на организм природных или антропогенных факторов, что

приводит к изменению физиологического состояния и восприимчивости хозяина к патогенам, возникновению и развитию инфекций. Таким негативным фактором является бесконтрольное использование антибиотиков и их активное накопление в живых системах. Поступление даже следовых количеств антибиотиков в организм может привести к формированию у насекомых устойчивости к энтомопатогенным бактериям, например *Bacillus thuringiensis*, которые являются основой большинства биологических инсектицидов. Биологический метод борьбы с вредителями является одним из самых перспективных для успешной защиты растений, а формирование резистентности к биоинсектицидам станет серьезной проблемой при решении задач в этой области.

Несмотря на обширные исследования, которые преимущественно сфокусированы на фармакологических и токсикологических свойствах различных соединений и их воздействие на насекомых, проблема влияния кишечной микробиоты на физиологию, морфологию и устойчивость насекомых к патогенам остается малоизученной. Накопленные данные свидетельствуют о сложности механизмов формирования устойчивости насекомых, причем микробиота кишечника играет одну из ключевых ролей в этом процессе.

В связи с этим, диссертационное исследование Т. Н. Клементьевой, посвященное оценке влияния кишечной микробиоты на морфофизиологические параметры и восприимчивость личинок воцинной огневки *Galleria mellonella* к энтомопатогенным микроорганизмам *Bacillus thuringiensis*, несомненно, является актуальным и имеет теоретическое и практическое значение.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации

Клементьевой Т. Н. впервые проведено исследование влияния длительной селекции насекомых на устойчивость к низким дозам антибиотика с параллельным комплексным анализом изменений в структуре кишечной

микробиоты, ключевых физиологических и морфологических показателей системы «насекомое–микробита». Впервые применено длительное культивирование личинок воцинной огневки *Galleria mellonella*, обработанных низкими дозами антибиотиков, и проведена оценка изменений в кишечной микробиоте и физиологии насекомого в ряду поколений. Показано, что хроническое присутствие низких доз антибиотика в кишечнике воцинной огневки, имитирующее как природное загрязнение, так и условия, характерные для персистирующей инфекции, приводит к смене доминантных видов бактерий и увеличению разнообразия кишечной микробиоты. В ответ на преобразования в структуре кишечной микробиоты меняется активность пищеварительных ферментов на фоне временного окислительного стресса в среднем отделе кишечника личинок *G. mellonella*, что отражается на весе куколок. Автором выявлена следующая закономерность: устойчивость насекомых к патогенам, в частности к бактерии *Bacillus thuringiensis*, опосредована комбинированным действием двух факторов, а именно перестройкой симбиотической микробиоты и изменением активности протеолитических ферментов кишечника.

Обоснованность и достоверность полученных результатов

Достоверность представленных результатов не вызывает сомнений, поскольку она обеспечена современным научным и методологическим уровнем работы, применением многочисленных и разнообразных современных методов и подходов, которые соответствуют целям и задачам исследования, достаточной репрезентативностью исследуемых выборок, убедительностью полученных фактических данных и их корректным статистическим анализом. Положения, выносимые на защиту, в достаточной мере обоснованы и подкреплены конкретными результатами. Выводы соответствуют поставленным в диссертации задачам, вытекают из полученных при исследовании данных и согласуются с положениями, выносимыми на защиту.

Личный вклад автора присутствует на всех этапах выполнения работы. Основные результаты исследования опубликованы в 11 печатных работах, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 3 статьях в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук (из них 1 статья в российском научном журнале, входящем в Scopus; 1 статья в зарубежном научном журнале, входящем Web of Science и Scopus).

Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на научно-практических конференциях, съезде и конгрессе разного уровня (отечественных, с международным участием и международных).

Научно-практическая ценность полученных автором результатов

Полученные в ходе исследования результаты вносят значимый вклад в развитие теоретических основ физиологии и адаптации живых организмов, расширяя понимание механизмов функционирования живой системы в условиях стресса, в частности формирования устойчивости насекомых-вредителей к инсектицидам. Разработанная в исследовании модель культивирования, основанная на использовании низких доз антибиотика на протяжении большого числа поколений и имитирующая природное загрязнение и условия персистирующей инфекции, позволила установить морфологические и физиологические характеристики микробиоты, определяющей формирование устойчивости насекомых к антибиотикам, инсектицидам и другим стрессогенным факторам. Результаты работы могут быть эффективно использованы при комплексной оценке адаптационного потенциала насекомых в условиях инфекций, включая персистирующие, а также для установления функциональной роли конкретных микроорганизмов.

В рамках диссертационной работы была создана новая система селекции микроорганизмов через их культивирование в насекомых, устойчивых к

антибиотикам. Данное направление является перспективным для поиска бактерий, обладающих высокой инсектицидной активностью, и метаболитов, которые могут выступать в качестве синергистов для кристаллообразующих бактерий *B. thuringiensis* и энтомопатогенных грибов. Дальнейшие исследования симбиотических микроорганизмов, резистентных к антибиотикам, важны также для выявления скрытых резервуаров инфекций в популяциях животных, которые могут активироваться в стрессовых условиях.

Оценка содержания диссертации, её завершенности и оформления

Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы и приложения. Основные главы включают обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и обсуждение собственных исследований. Материал работы изложен на 143 страницах, содержит 4 таблицы и 19 рисунков. Приложение включает 4 рисунка и 1 таблицу. Список литературы содержит 291 источник, из которых 289 на иностранном языке.

Раздел «Введение» содержит информацию об актуальности исследования, о цели и задачах, необходимых для ее достижения. Отражены новизна исследования, теоретическая и практическая значимость работы. Выдвинутые цель и задачи научного исследования, как и положения, выносимые на защиту, отражают смысл проделанной работы. Приведен список апробаций и публикаций по теме диссертационной работы.

Глава «Обзор литературы» освещает все основные направления представленного исследования и включает анализ большого объема современной информации по изучению микробиоты насекомых и механизмам взаимодействия между хозяином и микроорганизмами. Подробно рассматривается объект исследования – вошинная огневка *Galleria mellonella* как модель для исследования различных инфекционных процессов в лабораторных условиях, в том числе формирования иммунитета насекомых в ответ на воздействие бактериальных и грибных патогенов. Содержание обзора

полностью соответствует теме исследования, содержит необходимые сведения для обоснования исследовательской части диссертации.

В главе «Материалы и методы» автор представил объект и алгоритм исследования (описал лабораторную линию насекомых и условия ее содержания, схему эксперимента и создание экспериментальных линий). Подробно рассматриваются многочисленные методы исследования (методики работы с микроорганизмами, биохимические и гистологические исследования, метагеномный и биоинформационный анализы, методы статистики и др.). Подробно описана методика, использованная для оценки устойчивости к патогену и жизненных показателей воцинной огневки *G. mellonella*, включающая анализ чувствительности личинок насекомого к бактерии *Bacillus thuringiensis*, оценку влияния совместной инокуляции *Enterococcus* на чувствительность *G. mellonella* к *B. thuringiensis* и характеристику жизненных показателей личинок *G. mellonella*. Следует отметить использование в работе комплексного подхода, потребовавшего от исследователя уверенного владения всеми указанными методами и определившего качественно новый уровень полученных результатов.

В главе, посвященной полученным результатам, представлены данные, выявленные в ходе исследования. Глава структурирована в соответствии с поставленными в работе задачами и содержит 3 подраздела, отличается последовательным и логичным изложением данных, полученных на отдельных этапах исследования с использованием разных методических подходов, включая статистический анализ. Все данные иллюстрированы информативными таблицами и рисунками. Обсуждение результатов исследования представлено в этой же главе. Автор адекватно оценивает полученные в исследовании результаты, сопоставляя свои данные с результатами ранее выполненных работ, но недостаточно полно привлекает литературные источники для обсуждения (не более 50 из 291 ссылки в списке литературы). Тем не менее, содержание главы свидетельствует, что все поставленные в работе задачи решены.

В разделе «Заключение» Т. Н. Клементьева подводит основные итоги работы, оценивает научную и практическую значимость полученных результатов. Диссертация завершается шестью выводами, списком использованных сокращений и списком литературы. Выводы полностью основаны на результатах собственных исследований, сформулированы грамотно, корректно и соответствуют поставленной цели и задачам работы. Диссертация изложена в доступной форме, грамотным научным языком, читается легко и с интересом.

Содержание автореферата соответствует диссертации и полностью отражает основные результаты, необходимые для представления об обоснованности основных положений и выводов.

Личный вклад автора. Данные, представленные в работе, получены лично автором (постановка экспериментов, подготовка образцов, биохимические анализы, анализы взаимодействия микроорганизмов, обработка и анализ данных) или при непосредственном его участии (метагеномный анализ сообществ бактерий кишечника вошчинной огнёвки) на всех этапах диссертационного исследования и являются оригинальными.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Разработанная в результате диссертационного исследования Т. Н. Клементьевой новая система селекции микроорганизмов путем их культивирования в устойчивых к антибиотикам насекомых открывает перспективы для исследований преимуществ антибиотико-резистентных симбиотических микроорганизмов в динамичной среде кишечника насекомых, а также условий для изменения их стратегии и проявления вирулентных свойств, что особенно важно при возникновении инфекций в популяциях животных в стрессовых условиях.

Замечания и вопросы

1. Диссертационное исследование построено на сравнении разных показателей (микробиоты, биохимических, физиологических, цитологических и др.) двух линий вошчинной огнёвки *G. mellonella*, отличающихся по

воздействию малых доз антибиотика амикацина (контрольная N-линии и экспериментальная R-линия). Получены очень интересные результаты, которые, к сожалению, обсуждаются недостаточно подробно. На наш взгляд, представляют интерес также характеристики N-линии, которые изменяются в процессе длительного культивирования (например, значение КОЕ бактерий, которая к поколению F18 увеличивается в более, чем 22 раза; показатели каталазы и др.), однако в работе это не рассматривается. Возможно, это позволило бы более глубоко обсудить полученные результаты и детальнее рассмотреть возможные механизмы выявленных различий.

2. Особого внимания заслуживают интересные результаты, полученные по оценке чувствительности личинок *G. mellonella* поколения F18 к *B. thuringiensis*. Именно в личинках N-линии, но не R-линии, отмечено развитие бактериальной инфекции. Автор объясняет полученные результаты пробиотическими свойствами кишечных энтерококков (преимущественно *Enterococcus mundtii*), повышающих выживаемость личинок R-линии (стр. 98). Рассматриваются ли автором факторы, связанные с изменениями в организме насекомого, например включение в условиях стресса эпигенетического механизма, затрагивающего генетическую систему хозяина и вызывающего репрограммирование генома, что приводит к нарушению механизмов иммунной защиты, снижению жизнеспособности?

3. Автором по тексту диссертации, включая выводы 4–6, активно используется термин «устойчивость». Какой механизм устойчивости бактерий к антибиотику согласно полученным данным рассматривается основным?

4. Насколько, на взгляд автора, будет наблюдаться повторяемость (воспроизведение) результатов и выявленных закономерностей, полученных в данном исследовании, при использовании другого (других) антибиотика?

5. Выявлены ли какие-либо изменения, прежде всего временные, в жизненном цикле воцинной огневки в линии R?

6. Вы отмечаете, что среди всех изученных жизненных показателей *G. mellonella* R-линии по сравнению с N-линией в F18 только снижение массы

куколок было статистически значимым показателем. Это можно объяснить, если рассматривать негативное влияние антибиотика на процессы в кишечнике личинки, приводящие к нарушению и снижению синтеза питательных веществ, и, как результат, понижению массы куколки. Однако, автор указывает, что этот процесс связан не с прямым действием антибиотика, а с опосредованной им перестройкой кишечной микробиоты (автореферат, стр. 13). О чем идет речь?

7. Указывая практическую значимость диссертационного исследования, автор рассматривает его перспективным для поиска бактерий с определенными свойствами (диссертация, стр. 8). Хотелось бы уточнения.

К замечаниям диссертационной работы следует отнести следующие: во Введении отсутствует раздел «Обоснованность и достоверность полученных результатов»; раздел «Научная новизна» в большей части представляет актуальность исследования; технические неточности (отсутствуют в тексте ссылки на публикации, представленные в списке литературы (ссылки 19, 43, 80, 100, 121, 142 и др.); отсутствует рисунок 21 (стр. 99); недочеты в оформлении списка литературы, опечатки и стилистические погрешности).

Заключение

Диссертация Клементьевой Татьяны Николаевны «Микробиота кишечника как фактор, влияющий на физиологию и восприимчивость к *Bacillus thuringiensis* личинок *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae)», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.14. Энтомология, является завершённой научно-квалификационной работой, содержащей решение научной задачи по оценке особенностей формирования механизмов адаптации насекомых в стрессовых условиях, имеющей значение для развития энтомологии.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям пунктов 9–11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской

Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертационным работам на соискание учёной степени кандидата наук, а соискатель достоин присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.14. Энтомология.

Отзыв подготовлен профессором кафедры зоологии беспозвоночных Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета, доктором биологических наук, профессором Надеждой Васильевной Островерховой.

Отзыв о диссертационной работе Т. Н. Клементьевой заслушан, обсуждён и одобрен на заседании кафедры зоологии беспозвоночных Института биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства (Биологического института) Национального исследовательского Томского государственного университета, протокол № 13 от 14 апреля 2026 г.

Профессор кафедры зоологии беспозвоночных
Национального исследовательского
Томского государственного университета,
доктор биологических наук
(03.02.04 – Зоология),
профессор



Островерхова Надежда Васильевна

20 апреля 2026 года