

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, Ильиной Ларисы Александровны, профессора кафедры крупного животноводства Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет» на диссертационную работу Шейда Елены Владимировны «Обмен веществ, микробиом желудочно-кишечного тракта и продуктивность крупного рогатого скота в условиях различной нутриентной обеспеченности», представленную в диссертационный совет 24.1.252.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 4.2.4. - Частная зоотехния, кормление, технологии приготовления кормов и производства продукции животноводства.

Актуальность темы. Актуальность диссертационного исследования определяется тем, что кормление крупного рогатого скота без сомнения имеет непосредственное отношение к здоровью, обменным процессам, продуктивности и сроку хозяйственного использования животных. Несомненно, симбиотические микроорганизмы, такие как бактерии, археи, грибы, простейшие и бактериофаги выполняют важную функциональную роль в пищеварительных процессах жвачных. В условиях данного симбиотического взаимодействия основная функциональная роль микроорганизмов – обеспечение организм хозяина питательными соединениями. Так, расщепление клетчатки в организме жвачных животных происходит только благодаря ферментативным системам микроорганизмов. Поэтому на сегодняшний день изучение формирования микробных сообществ рубца КРС на фоне различных рационов кормления приобретает все большую актуальность.

Важно, что микробное сообщество в рубце жвачных в значительной степени представлено некультивируемыми микроорганизмами с неустановленным таксономическим положением. Использование молекулярно-биологических подходов позволило диссертанту получить доступ к изучению состава и свойств некультивируемых микроорганизмов, выявлению их роли в процессах ферментации в рубце. Перспективы применения молекулярно-биологического инструментария в сельскохозяйственной микробиологии очевидны.

В тоже время важным является исследование возможности направленной коррекции микробиома рубца с целью улучшения метаболизма

и продуктивных показателей сельскохозяйственных животных. Концепция управления микробным сообществом рубца не является новой, однако в данном направлении все большее внимание исследователей привлекает возможность использования кормовых добавок, способствующих более полноценному усвоению питательных соединений кормов. В частности, перспективным является исследование влияния использования микроэлементов на фоне использования белковых и жировых компонентов рационов на физиолого-биохимические процессы в организме молодняка крупного рогатого скота.

В связи с этим диссертационное исследование Шейда Е.В., целью которого стало изучение особенностей рубцового пищеварения и таксономического состава микробиоты в условиях изменений качественных особенностей протеина и жира кормов, разработке методов коррекции рубцового пищеварения для регуляции адаптации пищеварительной системы, повышения эффективности использования кормов и увеличения продуктивности крупного рогатого скота, обладает высокой актуальностью и значимостью.

Подтверждением актуальности диссертационного исследования является то, что она реализована в соответствии с «Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2009-2020 годы» ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН (до 2018 года Всероссийский НИИ мясного скотоводства) (госрегистрация: № 0761-2014-0012, № 0761-2014-0010; № 115040610064; № АААА-А17-117021650038-6; АААА-А18-118042090039-1); «Программой выполнения фундаментальных научных исследований, определяемых президиумом Российской академии наук (соглашение № 075-02-2019-1847)»; тематическим планом НИР на 2021-2023 гг. ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН (№ 0761-2019-0005); тематическим планом выполнения научных исследований при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-16-00088; 21-76-10014; 23-16-00061).

Научная новизна исследований заключается в том, что впервые, в том числе на основе анализа данных высокопроизводительного секвенирования, подробно описано изменение таксономической структуры микробиома рубца и кишечника жвачных на фоне коррекции состава рациона по полноценности протеинового и жирового питания. Эти исследования послужили основой установления связи состава микробиома и метаболическими параметрами желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота, что отражено в свидетельствах о регистрации базы данных № 2022620699.

Получены данные об изменении таксономического разнообразия микробиоты рубца молодняка КРС в зависимости от состава рациона (свидетельства о регистрации базы данных № 202262068; № 2022620671; № 2022620672; № 2022620708; № 2022620782; № 2022620784; № 20226208324).

В серии экспериментов получены новые данные об интенсивности течения метаболических процессов в организме животных на фоне введения в рационы животных различных масел, протеиновых добавок, минеральных препаратов, что представляет широкий практический интерес.

Полученные данные послужили основой разработки математических моделей, которые направлены на прогнозирование функциональности секреторной функции поджелудочной железы в зависимости от жирно- и аминокислотного состава кормов, и, что может являться основой для разработки приемов коррекции метаболических процессов на фоне изменения рационов кормления полигастричных животных.

Новизна исследований подтверждена серией патентов РФ на изобретения №2711259, №2744196, №2751961, №2751962, № 766683.

Практическая и теоретическая значимость полученных результатов также не вызывает сомнений. Получены новые фундаментальные знания о формировании микробных сообществ рубца и кишечника животных при различных составах рациона животных. Результаты, полученные в ходе исследований, позволили углубить имеющиеся сведения о связи таксономического профиля микробиома рубца и физиолого-биохимическими показателями пищеварения, а также продуктивными показателями, что позволило предложить новые приемы коррекции микробиомов для повышения эффективности использования корма и увеличение продуктивности.

В частности, полученные научные результаты изучения функциональной активности поджелудочной железы расширяют знания о процессах адаптации пищеварительной системы к изменениям в составе рациона. Кроме того, в диссертационной работе теоретически обосновано и подтверждено использование отдельных микроэлементов для коррекции микробиома рубца и повышения их доступности.

Теоретические положения диссертационной работы раскрыты полно и глубоко. По теме исследования собран обширнейший теоретический и экспериментальный материал, что является несомненным достоинством работы и имеет несомненную практическую значимость.

Степень достоверности и обоснованности научных положений диссертационной работы. Достоверность и обоснованность научных положений диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством и репрезентативностью наблюдений, проб и выборок, применением современного нового и сертифицированного оборудования, методик, соответствующих поставленным в работе целям и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках. Подготовка, статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа (в т.ч., программных пакетов Statistica 10.0). Сформулированные положения, выводы и рекомендации достоверны, строго обоснованы, не противоречат друг другу и логично вытекают из проведенных исследований.

В цикле исследований, составляющих диссертационную работу, Елене Владимировне Шейда принадлежит основная роль в разработке плана и тематики экспериментов, выборе спектра методик исследований, осмыслении и обобщении полученных данных и в опубликовании печатных трудов.

Обоснованность и достоверность полученных результатов исследований, научных положений и рекомендаций подтверждены их апробацией на международных научно-практических конференциях, а также многочисленных публикациях. Автором по результатам исследований была опубликована 61 научная работа, в том числе 3 монографии, 15 статей в изданиях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus; 24 – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки Российской Федерации. Новизна исследований подтверждена 6 патентами РФ на изобретения, 13 свидетельствами на базы данных.

Оценка содержания, завершенности диссертации и качества ее оформления. Диссертация написана по традиционной схеме и включает следующие разделы: введение, оглавление, текст диссертации, включающий введение, основную часть, заключения, предложений производству, перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературы и 10 приложений. Материалы диссертации изложены на 469 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 183 таблицами и 85 рисунками, указатель литературы содержит 364 источников, в том числе 53 отечественных и 311 зарубежных.

В разделе 1. представлен обзор литературных данных, посвященный анализу исследований структуры микробиоты пищеварительного тракте в связи с особенностями их пищеварения жвачных животных и переваримость питательных веществ у крупного рогатого скота. Проанализированы основные факторы влияния на деятельность пищеварительной системы животных. Представлен обзор белковых и жировых добавок, а также оценена их эффективность в кормлении крупного рогатого скота. В целом представленный обзор позволяет достаточно полно оценить степень развития исследуемых областей науки и сделать вывод о новизне и значимости полученных результатов.

В главе 2 приведены объекты исследования, материалы и методики измерений. Дано подробное описание зоотехнических, лабораторных и молекулярно-биологических методов анализа.

В разделе 3 приведены результаты собственных исследований. Раздел 3.1. «Изучение влияния различного уровня включения в рационы белковых концентратов на пищеварение и обмен веществ в организме молодняка крупного рогатого скота» посвящен всестороннему анализу введения в рацион различных источников белка на метаболические процессы в организме молодняка. В частности, охарактеризовано влияние качества протеина на процессы пищеварения в различных участках желудочно-кишечного тракта у подопытных животных. Важно, что полученные в исследованиях Шейда Е.В. результаты позволили охарактеризовать новые интересные закономерности, в частности о связи переваримости и усвояемости питательных веществ в кишечнике с активностью пищеварительных ферментов. В ходе научно-хозяйственного опыта было оценено влияние введения белковых концентратов в рационы при выращивании молодняка крупного рогатого скота.

В разделе 3.2. «Изучение влияния дополнительного введения в рационы жировых компонентов на пищеварение и обмен веществ в организме молодняка крупного рогатого скота» приведены результаты масштабных исследований. Интересным разделом является проведение сравнительной оценки влияния различных растительных масел на метаболические процессы и адаптацию пищеварительной системы жвачных. Экспериментальные исследования выявили влияние различных жиров на антиоксидантный статус организма, изменение уровня NO-метаболитов и трипсина в сыворотке крови, переваримость аминокислот и жирных кислот. Были установлены взаимосвязи между активностью пищеварительных ферментов в панкреатическом соке, химусе тонкого отдела кишечника и переваримостью питательных веществ. Широкий интерес также представляют результаты оценки микробиома

толстого отдела кишечника бычков при включении в рацион растительных жиров.

В разделе 3.3. «Результаты пилотных исследований по апробации включения минеральных веществ в рацион крупного рогатого скота» диссертантом на основе проведенных исследований был изучен обмен химических элементов в организме молодняка крупного рогатого скота при использовании в рационе различных по ингредиентному составу кормов, а также установлен дозозависимый эффект влияния данных добавок на рубцовое пищеварение жвачных животных. Проведенные исследования также позволили определить пороги токсичности химических элементов на моделях «репортерных» люминесцирующих клеточных тест-систем.

В разделе 3.4. «Влияние дополнительного включения в рационы микроэлементов на фоне белковых рационов на пищеварение и обмен веществ в организме молодняка крупного рогатого скота» приведены результаты экспериментов, направленных на изучение влияния дополнительного введения в рационы хрома и железа в белковые рационы. Выявлено, что хром оказывает значительное влияние на активность пищеварительных ферментов и регуляцию обменных процессов в желудочно-кишечном тракте. Дополнительное введение хрома в рацион бычков опытной группы способствовало увеличению активности пищеварительного фермента липазы, однако приводило к снижению липидного обмена в организме.

В разделе 3.5. «Изучение влияния дополнительного включения микроэлементов хрома и железа в жировые рационы молодняка крупного рогатого скота на пищеварение и обмен веществ в организме» приводятся результаты по изучению действия включения в рационы хрома и железа на обмен веществ и энергии в организме молодняка крупного рогатого скота. В частности, интересные закономерности получены при изучении микробиоты и адаптационных процессов пищеварительной системы при введении указанных микроэлементов в жировые рационы крупного рогатого скота.

В разделе 3.6. «Разработка математических моделей, описывающих метаболические процессы в организме бычков с различной нутриентной обеспеченностью рационов» детально охарактеризованы результаты моделирования, в основе которых положены корреляционно-регрессионные зависимости. Описанные в диссертационной работе модели позволяют оценивать влияние показателей переваримости, биохимических показателей крови, а также жирового компонента и фактора времени на секреторную функцию поджелудочной железы. В целом, данные модели могут стать основой коррекции пищеварительных процессов у животных и применяться для разработки приемов повышения продуктивности крупного рогатого скота.

В главе «Обсуждение полученных результатов» соискателем интерпретированы собственные результаты исследований, проведено сопоставление их с имеющимися литературными данными, что в конечном итоге позволило сформулировать 14 выводов и сделать объективные предложения производству.

Диссертационная работа Е.В. Шейда является результатом глубокого научного исследования и вносит существенный вклад в решение научных и практических проблем в области животноводства. Диссертация имеет вид законченного научного труда, выполненного на высоком научно-методическом уровне. Анализируемый материал иллюстрирован рисунками, работа написана доступным языком, легко читается.

Автореферат диссертационной работы в полной мере отражает весь объем выполненных научных исследований.

Положительно оценивая рецензируемую работу в целом, хочу отметить следующие недостатки.

В диссертационной работе приведено значительное количество табличного и графического материала, что несомненно является преимуществом работы. Тем не менее, некоторые из них довольно трудны к восприятию. Так, в разделе 3.1.2 «Результаты опытов *in vitro*» представлено три таблицы (5, 6 и 7), характеризующие таксономический состав (преобладающие таксоны) микробиома рубцовой жидкости *in vitro* при различных типах рациона, также разделе 3.5.4 «Влияние дополнительного включения в жировые рационы молодняка крупного рогатого скота железа на функциональную активность пищеварительной системы» представлено две таблицы (154 и 155), где описан таксономический состав микробиома рубцовой жидкости *in vitro*, с включением подсолнечного масла с включением или без включения железа. Стоило бы представить указанные результаты в виде одной объединенной таблицы или одного рисунка (например, как на рисунке 4), где наглядно бы прослеживались изменения микробиома рубцовой жидкости при различных рационах.

На некоторых рисунках, например, рисунок 2 «Переваримость сухого вещества рациона при дополнительном введении различных источников протеина, %», таблица 13 «Коэффициенты переваримости питательных компонентов корма, %», рис. 45 «Таксономический состав (преобладающие таксоны) микробиома рубцовой жидкости *in vitro*, с дополнительным включением хрома, на фоне белковых рационов» и др. имеются указания ссылки в виде звездочки, которое не представлено в подписи к рисунку.

Кроме того, не во всех случаях понятны обозначения осей на рисунках. Так, например, на рисунке 31 «Микрофлора толстого отдела кишечника бычков при жировом рационе» не подписана ось Y, где предположительно должно быть отражено доленое содержание микроорганизмов в % (общий процент 100), тогда как фактически единицы измерения достигали значений 50000.

В выводах отсутствуют данные о достоверности полученных результатов, которые указаны в тексте диссертационной работы, что несколько затрудняет общее восприятие информации о полученных закономерностях.

Вопросы, возникшие в ходе ознакомления с текстом диссертации:

1) В работе проводилась оценка состава микробиоты с применением метода NGS-секвенирования, который позволяет судить только о процентном соотношении отдельных таксономических групп в микробиоме. В связи с этим, применение термина «численность» того или иного микроорганизма, представляется не вполне корректным. Правильнее будет применение терминов «относительная численность», «доля», «содержание». В связи с этим возникает вопрос, почему в рамках данного исследования не предполагалась оценка количества или численности микроорганизмов в содержимом рубца и кишечника с применением молекулярно-генетических методов? В частности, интересно было бы изучить численность не только бактерий, но и архей, грибов-хитридиомицетов.

2) При характеристике результатов автор достаточно часто опирается на поиск и описание взаимосвязи между различными показателями, в частности, таксономического состава микробиоты рубца и физиолого-биохимическими показателями пищеварения. Для этого в работе используется анализ на основе коэффициента корреляции Спирмена. Чем обусловлен выбор указанного коэффициента корреляции, а не коэффициента Пирсона, например? Анализировалась ли автором достоверность рассчитанных коэффициентов корреляции?

3) Широкий интерес представляет оценка уровня NO-метаболитов, который играет важную роль в функционировании желудочно-кишечного тракта, в зависимости от состава рационов. Согласно приведенному автором разноречивому свидетельству исследователей о повышенном и пониженном синтезе метаболитов азота интересно узнать мнение автора диссертационной работы об этих процессах. Увеличение уровня NO-метаболитов на фоне введения в рацион бычков протеиновых компонентов в группе с подсолнечным жмыхом на 84,3 % ($p \leq 0,05$), с соевым шротом на 80,9 % ($p \leq 0,05$) (рисунок 6) или в группе с введением в рацион животных

подсолнечного масла (рисунок 22), хрома (рис.72) все-таки в большей степени имеет позитивный эффект в связи с повышением адаптационного потенциала организма или же свидетельствует об активации защитных механизмов, как в случае развития патогенеза?

4) Археи являются наиболее интересными и малоизученными микроорганизмами рубца, поэтому широкий интерес представляет изменение их представленности в микробиоме на фоне различных рационов. Так, в разделе 3.2.5 «Результаты опытов *in vitro* при использовании в рационах жировых компонентов» продемонстрировано, что при добавлении соевого масла отмечено наличие в рубцовой жидкости домена архей, в частности порядка *Methanomassiliicoccales*, концентрация которых в опытной группе была выше на 98 % относительно контроля. Чем это можно объяснить?

5) Как автор может прокомментировать результаты, характеризующие отсутствие значительного увеличения концентрации хрома и железа в мякоти животных при введении в их рацион вышеуказанных минеральных элементов, представленные в разделе 3.3.4 «Мясная продуктивность опытных бычков», таблица 104 - «Концентрация химических элементов в мякоти подопытных животных»?

6) В работе значительная и интересная часть исследований посвящена изучению адаптационных процессов пищеварительной системы при различных рационах крупного рогатого скота (на примере раздела 3.5.5 «Изучение адаптационных процессов пищеварительной системы при введении железа в жировые рационы крупного рогатого скота»). В разделах, посвященных данному вопросу, приводится довольно много различных показателей, начиная от формирования микробного сообщества пищеварительного тракта, до показателей переваривания корма, уровня ферментативной активности. Что по мнению автора, является определяющим в аспекте изучения адаптации животных к разного типа рационам?

Заключение

Диссертация Шейда Елены Владимировны является законченной научно-квалификационной работой, выполненной автором лично. Работа отличается высоким научным и методическим уровнем. Полученные результаты достоверны, выводы и предложения производству логично вытекают из материалов работы. Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, написана грамотным языком.

Считаю, что диссертационная работа Шейда Елены Владимировны «Обмен веществ, микробиом желудочно-кишечного тракта и продуктивность крупного рогатого скота в условиях различной нутриентной обеспеченности»

по актуальности решаемых проблем, научной новизне полученных результатов и их практической значимости, достоверности и обоснованности научных положений и выводов отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения научным и научно-педагогическим работникам ученых степеней» ВАК Министерства образования и науки РФ, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ № 415 от 18.03.2023 г.), предъявляемых к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 4.2.4. - Частная зоотехния, кормление, технологии приготовления кормов и производства продукции животноводства.

Официальный оппонент
доктор биологических наук,
(03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии),
06.02.08 Кормопроизводство, кормление
сельскохозяйственных животных и технология кормов,
2023 г.), профессор кафедры крупного животноводства
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Санкт-Петербургский
государственный аграрный университет»

Ильина
Лариса Александровна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет», 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Петербургское шоссе, дом 2, телефоны: +7 (812) 470-04-22; +7 (911) 296-57-23. e-mail: ilina@spbgau.ru

«05» декабря 2023 г.

Подпись Ильиной Ларисы Александровны заверяю:

Ректор ФГБОУ ВО СПбГАУ,
доктор ветеринарных наук,
профессор



В.Ю. Морозов