

О Т З Ы В

на диссертационную работу Усачева Ивана Ивановича – кандидата ветеринарных наук, доцента на тему “Микробиоценоз кишечника, его оценка и контроль у овец, целенаправленное формирование у новорожденных ягнят” на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 06.02.02-Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология с микотоксикологией и иммунологией.

Актуальность темы диссертационной работы. Овцеводство – по прежнему остается значимой отраслью сельского хозяйства в нашей стране. Для Брянской области наиболее перспективными являются романовская порода овец и прекос, у которых высокая мясная и шерстяная продуктивность, сочетаются со скороспелостью и плодовитостью. Для того, чтобы максимально реализовались генотипические и фенотипические качества этих пород, необходимо не только полноценное кормление, но и подробное изучение функционирования различных органов и систем этих животных, пребывающих в условиях современной экологии. Кишечный микробиоценоз, является одной из важнейших систем, определяющих жизнеспособность организма животных, в том числе и овец, на различных этапах их жизнедеятельности. Поэтому изучение закономерностей формирования индигенной микрофлоры кишечника овец, как в целом, так и различных его биотопов, является важным направлением в ветеринарной науке. Перспективность данного направления обусловлена, с одной стороны широким применением пробиотиков в животноводстве, с другой отсутствием в литературе данных отражающих нормативы различных популяций кишечной микрофлоры, которые можно было бы считать физиологически нормальными или защитными.

Особенно актуальным данное направление исследований являются в связи с тем, что сегодня многими исследователями отмечены нарушения формирования кишечного микробиоценоза и возникающими на этой почве дисбиотическими явлениями. Приведенные данные определяют актуальность исследований диссертанта.

Вх. № 14
23 января 2015 г.

Научная новизна, достоверность основных выводов и рекомендаций.

Диссертантом получены данные отражающие микробиоценоз химуса и слизистых оболочек анатомических структур, составляющих тонкий и толстый отделы кишечника овец. Проведена сравнительная оценка соотношения и количественного содержания микроорганизмов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia* (*E.colli*), *Vacillus* и *Candida*, на уровне рода в слизистых оболочках и содержимом 12-ти перстной, тощей, подвздошной, слепой, ободочной и прямой кишок овец. Установлены популяции микробов количественно доминирующие в различных биотопах и биоптатах кишечника. Выявлены преобладающие популяции микробиальной флоры в тонком и толстом отделах кишечника, как отдельных биотопах пищеварительной системы отличающихся своей функцией. Диссертант представил данные о закономерностях формирования кишечного микробиоценоза у ягнят в раннем постнатальном онтогенезе (1-60 суток). Определил период жизни новорожденных ягнят у которых вышеуказанные микроорганизмы достигают стабильных величин. Представил данные отражающие особенность микробиоценоза кишечника овец (в пределах изучаемых микробов), различных пород (романовская и прекос), холостых суягных и лактирующих маток, баранов производителей и молодняка 3,4, и 5 месячного возраста.

Выводы, практические предложения и результаты исследований диссертации научно обоснованы и достоверны. Они подтверждены значительными экспериментальными исследованиями, лабораторными анализами, биометрической обработкой цифрового материала, представленного в таблицах и рисунках в виде графиков, которые достаточно полно проанализированы.

Значимость полученных результатов для науки и производства.

Результаты исследований позволили автору установить что в 12 ти перстной кишке содержится наименьший уровень изучаемых микробов по сравнению с другими кишками составляющих кишечник анатомически при этом содержание исследуемой микрофлоры в химусе 12ти перстной кишки на 10,7% выше чем в её

слизистой оболочке. Тошая кишка овец романовской породы 3-5 летнего возраста наиболее богата микроорганизмами относящимися к родам *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia* (*E.colli*), *Bacillus* и *Candida*. А уровень этих микробов слизистой оболочке тощей кишки на 1,2% ниже чем в её химусе. Микорбиоценоз подвздошной кишки этих животных имел свои особенност заключающиеся в том что содержание микробов в химуче этой кишки на 6,3% выше чем в слизистой оболочке. Микробиоценозы слизистых оболочек и содержимого биологических структур анатомически составляющих толстый отдел кишечника овец имеют отличия, а именно : наиболее высокая концентрация изучаемых микробов присутствует в слизистой оболочке и содержимом прямой кишки животных 32.4 lg КОЕ/г.слиз и 38.8 lg КОЕ/г.фек., минимальное содержание 30.0 lg КОЕ/г.слиз и 31.0 lg КОЕ/г.хим. установлено в ободочной кишке, а промежуточные величины 31.6 lg КОЕ/г. слиз и 32.6 lg КОЕ/г. хим. выявлены в слепой кишке животных. В слизистых оболочках указанных кишек по сравнению с их содержимым суммарный уровень микрофлоры ниже на 19.7%, 3.3% и 3.1% соответственно. Формирование кишечного микробиоценоза у ягнят завершается в течении первых двух недель их жизни, что проявляется качественной и количественной стабильностью изучаемой микрофлоры в фецесе животных пятнадцати суточного возраста. Микробиоценозы фецеса овцематок и полученных от них ягнят имеют 50% сопряженность, а именно: уровни лактобактерий, энтерококков и аэробных спорообразующих бацилл имеют 100% соответствия. В фецесе овец того же возраста что и овцематке (3-5 лет) содержащихся в аналогичных условиях, но не являющихся матерями новорожденных животных, ни одна популяция микробов, за исключением лакто флоры, не имела 100% соответствия. Микробиоценозы фекалий холостых и суягных овцематок 3-5 летнего возраста, а так же лактирующих маток аналогичного возраста в молозивный и молочный период лактации отличаются суммарным содержанием микроорганизмов относящихся к родам *Bifidobacterium*, *Escherichia* (*E.colli*), *Enterococcus* и *Bacillus*, соответственно на 5.9% , 24.6%, 41.1%

и 10.3%. Микробиоценозы фецеса овец романовской породы и животных породы прекос отличаются содержанием бактерий рода *Bifidobacterium* и *Escherichia* (*E.colli*) на 5.4% и 11.9%. Количественные величины представителей родов *Lactobacillus* и *Enterococcus* были идентичны 8.0 lg КОЕ/г.фек и 6.0 lg КОЕ/г.фек., а микроорганизмы рода *Vacillus* и *Candida* количественно близки с представителями аналогичных родов присутствующих в фецесе овец указанных пород, их отличия не превышало 4.5%-5.7% соответственно. В фецесе молодняка овец 3,4 и 5 месячного возраста, баранов – производителей, холостых, суягных, и лактирующих маток в зимне-стойловый период технологического цикла при индивидуальном и групповом (по 8-12голов) содержание животных, в летний период у овец находящихся на выпасе и содержащихся стойлово – выгульным способом, физиологические количественные границы микрофлоры изучаемых родов различны, а именно *Bifidobacterium* 9.0 – 11.0 lg КОЕ/г. фек.; *Lactobacillus* 8.0 - 9.0 lg КОЕ/г. фек.; *Escherichia* (*E.colli*) 7.0 – 8.0 lg КОЕ/г. фек.; *Enterococcus* 5.0 – 7.0 lg КОЕ/г. фек.; *Vacillus* 4.0 – 6.0 lg КОЕ/г.фек.; *Candida* 2.0 – 4.0 lg КОЕ/г. фек.. Динамика количественных величин указанных микробов находятся в тесной взаимосвязи с породной принадлежностью, возрастом, полом, условиями содержания и физиологическим состоянием животных. В пищеварительной системе овец каждый род микрофлоры имеет не только количественную но и качественную стабильность, что отражается на соотношениях между различными популяциями микробов присутствующими в фецесе физиологических и половозрастных групп животных, а именно: наибольший удельный вес 25.8% принадлежит микроорганизмам рода *Bifidobacterium*, род *Lactobacillus* занимает вторую позицию - 21.0%, бактерии рода *Escherichia* (*E.colli*) - 18,8%, микробы рода *Enterococcus* – 14.5%, представители рода *Vacillus* - 13,7%, а уровень кандид находился в пределах 6.2%. Чем ниже концентрация бифидобактерий, лактобактерий, кишечной палочки и энтерококков тем выше содержание кандид. Эта закономерность довольно наглядна у новорожденных ягнят молозевного и молочного периодов питания, у которых выше указанные бактерии не достигли

своей стабильности. Десятикратные разведения (10^4 г/фек.) фецеса овцематок используемые для целенаправленного формирования микро биоценоза кишечника у новорожденных ягнят не содержит патогенных микробов: клостридий, сальмонелл, листерий и кишечной палочки, а так же яиц и личинок гельминтов: трематод, цистод и нематод. У ягнят 65 – 70 суточного возраста при устранении медикаментозного дисбактериоза кишечника вызванного (0.2 мг/кг) пероральным применением 10% раствора энрофлона , микрофлора фецеса овец в разведении 10^4 г/фек., от которых получены ягнята по своей пробиотической эффективности не уступает поли компонентному пробиотику бифитрилаку. Элеовит и седимин при совместном их применении *invitro* по 0.25 мл способствует увеличению содержания бифидобактерий, лактобактерий, кишечной палочки и аэробных спорообразующих бацилл в фекалиях овец на 32.3%, а концентрация кандид под действием этих препаратов снижается на 16.7% – 41.7% по сравнению с уровнем кандид содержащихся, в контрольных пробах фецеса животных. Разработанный способ целенаправленного формирования микробиоценоза кишечника у новорожденных ягнят с использованием синбиотической композиции (4.5 мл взвеси фецеса овцематок в разведении 10^4 г.фек+0.25 мл элеовита + 0.25 мл седимина) применяемой *per. os*, по схеме 1.5-2ч, 12 ч, 24ч, 3,6,9 и 12-е сутки, повышает уровень микрофлоры различных родов, содержащихся в фекалиях ягнят в молозевный, молочный и смешанный периоды питания: *Bifidobacterium* на 6.1%-10.2%, *Lactobacillus* на 2.5%-10.5% , *Enterococcus* на 10.0-13.1% и *Bacillus* на 11.1%. Сокращают период стабилизации исследуемых микроорганизмов в фекалиях ягнят. Увеличивает суммарный уровень иммуноглобулинов классов G и M в сыворотке крови животных в смешанный период их питания на 2.7%, увеличивает массу тела на 5.9%, повышает их сохранность на 13.3%.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Полученные автором данные, безусловно, представляют огромный интерес для профилактики дисбактериозов различных отделов кишечника ягнят периода раннего постнатального онтогенеза и взрослых

овец, с учетом нормативов кишечной микрофлоры животных отражающих состояния естественного микробиоценоза макроорганизма на различных этапах жизни.

Содержание и структура работы. Диссертация изложена в традиционном стиле на 368 страницах компьютерного текста и состоит из введения и четырех глав: обзор литературы; собственные исследования, в которую входят материалы и методы исследования, и результаты исследования; обсуждения результатов, а также выводов, практических предложений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 64 таблицами, 42 рисунками и 6 фотографиями. В приложении представлены 6 фотографий и акты внедрения результатов исследований в производство, государственное ветеринарное учреждение (ГБУ БО Почепская зональная ветлаборатория) и учебный процесс. Библиографический список включает 568 наименований, в том числе 150 зарубежных. Основные положения диссертационной работы опубликованы в 49 научных работах, в том числе 16 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2х методических разработках и 3х монографиях.

Во введении автор обосновывает актуальность, цель и задачи предпринятой работы, раскрывает ее научную новизну, практическую значимость и формулирует основные положения диссертации, вынесенные на защиту.

В обзоре литературы диссертант освещает вопросы значимости микрофлоры, в том числе кишечной, для состояния здоровья животных, микробиоценотическое значение и роль представителей различных родов (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia (E.colli)*, *Bacillus* и *Candida*) в жизнеобеспечении макроорганизма. Обосновывает необходимость целенаправленного формирования микробиоценоза кишечника у новорожденных ягнят.

Раздел материалы и методы исследования дает представление о характере и количестве исследованного материала, методах использованных в данной работе.

Разделы результатов собственных исследований представлены в соответствии с целью и задачами диссертационной работы. Они являются непосредственным следствием проведенных автором исследований. В каждом из этих разделов дается достаточно подробное описание экспериментального материала, документированное таблицами и рисунками. Проведен огромный объем исследований. В работе использовано 395 овец в возрасте 3-5 лет романовской породы и прекос, в том числе 90 ягнят от 1 сут. до 5 месячного возраста. Выделены и изучены 6 родов микробов кишечной микробиоты (из фекалии, химуса и слизистых оболочек двенадцатиперстной, тощей, подвздошной слепой, ободочной и прямой кишок овец различных пород, физиологических и половозрастных групп, в зимне-стойловый и летне-пастбищный периоды технологического цикла). Подводя итог изложенному материалу в данных разделах диссертации следует отметить, что они написаны лаконично, отражают представленные результаты исследования экспериментального материала и каждая завершается кратким обобщением.

В конце работы диссертант приводит 16 выводов, вытекающих из результатов собственных исследований.

Диссертационная работа достаточно апробирована и полно опубликована в печати в том числе в 2х методических разработках и 3х монографиях. Автореферат диссертации вкратце отражает основные положения диссертационной работы.

Заключение по оформлению, языку и стилю диссертации, её недостатки. Диссертационная работа Усачева Ивана Ивановича написана грамотно, хорошо оформлена. Данные, полученные по микробиоценозу кишечника овец и ягнятам в ранний постнатальный период развития, являются абсолютно новыми. Они выполнены классическими и современными методами. Однако, несмотря на положительные стороны работы при чтении диссертации возникли некоторые вопросы и замечания:

1. Почему вы применяете термин «Микробиоценоз»? Не лучше ли было использовать термин, бактериоценоз, как это отражено в названии вашей монографии (2007г.)?

2. Чем объясняются различия в содержании изучаемых микробов в химусе и слизистых оболочках изучаемых кишок, в различных кишках составляющих тонкий и толстый отделы кишечника анатомически?

3. Каково функциональное назначение изученных вами условно-патогенных микроорганизмов (микроскопические грибы рода *Candida*)?

4. Известно, что аэробные спорообразующие бациллы являются транзитной микрофлорой, в представленной работе они охарактеризованы Вами как разновидность облигатной микрофлоры, чем Вы это объясняете?

5. Все фотографии, представленные в приложении, не очень хорошего качества. Следовало бы проводить фото - съемки не через закрытые чашки Петри, а в открытом виде.

6. Почему в качестве пребиотических компонентов Вами выбранные препараты Элеовит и Седимин?

7. В какие конкретные сроки суток вы отбирали пробы фецеса у овцематок для целенаправленного формирования кишечного микробиоценоза у новорожденных ягнят и почему Вами выбран именно этот интервал 1,5-2 часа; 12 часов; 24 часа, 3-; 6 -; 9- и 12-е сутки?

8. Какое вы находите объяснение представленным вами данным, указывающим на то, что при характеристике микробиоценоза фецеса ягнят с целенаправленно сформированным кишечным микробиоценозом наиболее активно накапливаются бифидобактерии, а не представители остальных родов, на пример лактофлора?

9. В диссертации и автореферате встречаются единичные не выправленные орфографические и стилистические ошибки (представлены автору).

Некоторые авторы, представленные в обзоре литературы, не представлены в орфографическом списке.

Указанные вопросы и замечания носят чисто дискуссионный характер и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Заключение. Диссертация Усачева Ивана Ивановича на тему: «Микробиоценоз кишечника, его оценка и контроль у овец, целенаправленное формирование у новорожденных ягнят», представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая по актуальности, научной новизне, практической значимости, методологии решения проблемы отвечает требованиям п. 7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Усачев И.И. заслуживает присуждения ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности: 06.02.02-ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

12 января 2015 года

Официальный оппонент,
заместитель директора Естественно-научного института,
ФГБОУ ВПО «Брянского государственного университета
имени академика И.Г. Петровского»,
доктор биологических наук,
профессор кафедры биологии

Е.В. Зайцева

