ВІДГУК

офіційного опонента про результати дисертаційної роботи
Похилька Юрія Миколайовича
на тему «Біологічні властивості виділених з травного тракту кролів бактерій роду *Lactobacillus*, перспективних для створення пробіотичних препаратів», поданої на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Актуальність теми

Кролівництво є однією з перспективних галузей тваринництва, яка характеризується значними темпами відтворення поголів'я та швидкою окупністю вкладень у виробництво. Найбільшими виробниками кролятини у світі є Китай, Північна Корея та Єгипет. Стан вітчизняного виробництва на сьогодні не задовольняє мінімальні потреби населення України. За норми споживання кролятини – 2 кг на душу населення, в Україні фактично споживається в середньому 284 г.

Однією з основних проблем ведення кролівництва на сьогодні є шлунково-кишкові захворювання тварин, які посідають чільне місце у структурі захворювань молодняку, спричиняють його загибель і значні економічні збитки для виробників.

Під час становлення кишкового нормобіозу несформована імунна система кроленят ще не здатна адекватно відповідати на антигенні впливи напрацюванням гуморального й клітинного імунітетів. Важливою фізіологічною функцією нормальної мікробіоти кишківника є забезпечення колонізаційної резистентності, тобто сукупності механізмів, що надають їй стабільності і попереджають заселення кишківника сторонніми, в тому числі і патогенними мікроорганізмами. Провідна роль у підтриманні колонізаційної резистентності належить молочнокислим бактеріям (МКБ), які проявляють антагоністичну активність до широкого спектру патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів і часто є біоагентами пробіотичних препаратів. У звязку з цим, рецензована дисертаційна робота Похилька Юрія Миколайовича, присвячена вивченню біологічних властивостей нових, перспективних для створення пробіотичних препаратів штамів МКБ, виділених від кролів, є безперечно своєчасною та актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота Похилька Ю. М. є складовою частиною тематики досліджень лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН відповідно до планів завдання 05.00.03.03.Ф Дослідити синтез біологічно активних речовин пробіотичними штамами мікроорганізмів за впливу індукторів різної природи (ПНД 05 "Сільськогосподарська мікробіологія") та 07.00.05.02.П. Селекціонувати штами мікроорганізмів з високим пробіотичним потенціалом.

Створити ефективний біопрепарат для профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань (ПНД 07 "Сільськогосподарська мікробіологія").

Наукова і практична цінність отриманих результатів

Дисертантом встановлено якісний та кількісний склад мікробіоценозу ШКК кролів за різних типів годівлі та раціону, що дає можливість глибше зрозуміти адаптаційні можливості мікробіоти кишківника кролів. На основі вивчення морфологічних, фізіолого-біохімічних, адгезивних властивостей, кислотоутворюючої та антагоністичної активностей, стійкості до метаболітів травної системи та інших біологічних особливостей здобувачем запропоновано перспективний штам *L. rhamnosus* 13/2, що проявив найбільш широкий спектр пробіотичних властивостей.

Похильком Ю. М. науково обґрунтовано та експериментально підтверджено доцільність використання штаму *L. Rhamnosus* 13/2 з метою профілактики зараження дослідних тварин бактеріями роду *Salmonella*, що забезпечує збереженість від 67 до 100 % тварин. Доведена здатність штаму *L. rhamnosus* 13/2 до корекції балансу кишкової мікробіоти лабораторних тварин після антибіотикотерапії, що сприяє швидкому відновленню чисельності біфідобактерій та лактобактерій. Результати, отримані здобувачем під час виконання рецензованої дисертаційної роботи розширюють сучасні уявлення про вплив на макроорганізм пробіотиків, біоагентами яких є молочнокислі бактерії.

Дисертантом розроблено та затверджено регламент на виробництво кормової добавки на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2.

Як свідчать одержані експериментальні дані, застосування зазначеної пробіотичної кормової добавки для кролів, що знаходяться на відгодівлі, сприяє відновленню та/або корекції балансу мікробіоти кишківника, профілактиці шлунково-кишкових інфекцій, підвищує збереженість поголів’я до 97 %, зменшує витрати корму із розрахунку на 1 кг приросту живої маси до 9 %.

Використання кормової добавки на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2 під час вирощування молодняку кролів забезпечує позитивний економічний ефект: при збільшенні вартості реалізованої продукції на 1 гол. на 4%, собівартість 1 кг приросту та недоотриманий прибуток знижуються на 9 і 75 %, відповідно.

Результати визначення ефективності використання нового перспективного штаму *L. rhamnosus* 13/2 при вирощуванні молодняка кролів на відгодівлі апробовані за виробничих умов і підтверджені актом виробничого випробування.

Оформлення, аналіз змісту і структури дисертації та її методичне забезпечення

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел

та додатків. Текст дисертаційної роботи викладений на 131 сторінці основного тексту. Робота містить 31 таблицю, 13 рисунків. Бібліографічний список налічує 411 джерел, з них 275 латиницею.

У дослідженні використано низку класичних та сучасних методів досліджень: мікробіологічні, фізіолого-біохімічні, молекулярно-генетичні, зоотехнічні, економічні, математично-статистичні.

Мета і доцільність виконання роботи логічно випливають з теми дослідження. Актуальність, наукова новизна та практичне значення одержаних результатів обґрунтовані у вступі дисертаційної роботи та у розділі «Огляд літератури». В огляді літератури дисертант вивчив сучасні наукові дані щодо складу і ролі мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів, виявив відсутність опублікованих результатів про вплив типу годівлі на кишковий мікробіом молодняку кролів. Особливу увагу автор приділив поняттю дизбактеріозу, проаналізував його причини та наслідки. Здобувач описав пробіотичні препарати та ефективність їх використання у кролівництві, охарактеризував біологічні властивості молочнокислих бактерій, які є критеріями добору мікроорганізмів для створення нових пробіотичних препаратів.

У «Матеріалах та методиках досліджень» сформовано і відображено відомості щодо загальної схеми досліджень для досягнення поставленої мети дисертаційної роботи. Першим етапом досліджень було дослідження складу мікробіоти кишківника кролів та виділення молочнокислих бактерій. Наступний етап включав скринінг виділених ізолятів за біологічними властивостями. Надалі здобувачем досліджувався вплив селекціонованих молочнокислих бактерій на організм кроля для профілактики сальмонельозних інфекцій, відновлення мікробіоти кишківника. На заключному етапі була проведена виробнича перевірка нового перспективного штаму *L. rhamnosus* 13/2 під час вирощування молодняку кролів та розрахунок економічної ефективності від його застосування.

У дисертаційній роботі Похилька Ю. М. науково грамотно поєднано мікробіологічні, фізіолого-біохімічні, зоотехнічні та математично-статистичні методи і отримано відтворювані та співставні з літературними даними результати, які узагальнено здобувачем у висновках. Достовірність одержаних здобувачем даних підтверджена статистичною обробкою фактичного матеріалу.

Основну частину роботи становлять «Результати власних досліджень». Розділ написаний логічно та послідовно, містить основні наукові положення, винесені дисертантом на захист. Автором виділено та досліджено 250 ізолятів молочнокислих бактерій, що за фізіолого-біохімічними та морфолого-культуральними ознаками віднесені до бактерій роду *Lactobacillus*. На підставі результатів дослідження граничного кислотоутворення здобувачем було попередньо відібрано 10 ізолятів, що належать до філогенетичних груп *Lactobacillus acidophilus, L. lactis, L. casei, L. plantarum.* Дослідження параметрів росту нових штамів дало підстави вважати їх технологічними. Експериментально виявлено високу стійкість досліджуваних бактерій до низьких значень pH (4,0) та високих концентрацій жовчі (40 %), натрію хлориду (5 %), гідроген хлориду (3 %) та фенолу (0,5 %), що відіграє важливу

роль під час колонізації товстого відділу кишківника макроорганізму за перорального ведення.

На основі досліджених пробіотичних властивостей для подальшої роботи було обрано ізолят *Lactobacillus sp.* 13/2 як найбільш перспективний. За рядом морфолого-культуральних та біохімічних ознак його було попередньо ідентифіковано до філогенетичної групи *Lactobacillus acidophilus*. За допомогою молекулярно-генетичних досліджень встановлено, що обраний ізолят не містить генів, які наявні у більшості видів *L. acidophilus* та *L. helveticus*. Аналіз нуклеотидної послідовністі фрагменту гена 16S рРНК дав підстави автору віднести досліджуваний штам до виду *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

Під час дослідження вірулентних властивостей клітин автором встановлено, що штам *Lacticaseibacillus rhamnosus* 13/2 належить до групи авірулентних мікроорганізмів, що не здатні до інвазії у внутрішні органи лабораторних тварин.

На модельних дослідах за використання білих лабораторних мишей дисертантом доведено, що профілактичне введення штаму *L. rhamnosus* 13/2 дає змогу підвищити збереженість дослідних тварин до 90-100 % при зараженні збудниками сальмонельозних інфекцій. Також позитивний ефект виявлено при введенні досліджуваного штаму після інфікування бактеріями роду *Salmonella*, залежно від збудника збереженість становила 67-73 %.

Похильком Ю. М. продемонстровано ефективність використання досліджуваного штаму для відновлення та корекції мікробіоти кишечника кролів. На 14-й день пролонгованого введення відмічено збільшення кількості біфідобактерій та молочнокислих бактерій у дослідних тварин, що отримували 10 і більше мл/л води бактеріальної суспензії.

Проведене дослідження економічної ефективності нового штаму показало доцільність його використання для кролів, що знаходяться на відгодівлі з метою профілактики шлунково-кишкових інфекцій, відновлення або корекції балансу мікробіоти кишківника, що забезпечує зниження витрат корму, підвищує збереженість поголів’я кролів, істотно знижує недоотриманий прибуток.

За результатами проведених дослідів автором була розроблена біотехнологія отримання кормової добавки для кролів на основі пробіотичного штаму *L rhamnosus* 13/2.

Здобувач Похилько Ю. М. фахово грамотно, об’єктивно та критично співставляє результати власних досліджень з даними наукової літератури у розділі «Аналіз та узагальнення результатів досліджень». Автор володіє фактичним матеріалом, аргументовано та об’єктивно оцінює результати, інтерпретує з сучасних наукових позицій, узагальнює отримані дані у висновках.

Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації

Дисертація Ю. М. Похилька є самостійною і завершеною науковою працею, яка є підсумком власних експериментальних досліджень за період

2014–2017 років, зміст відповідає спеціальності 03.00.20 – біотехнологія (сільськогосподарські науки). Експериментальна робота виконана методично правильно, містить достатню кількість матеріалу, висновки аргументовані і випливають з результатів досліджень. Обґрунтований вибір схем та методик досліджень, інтерпретація отриманих результатів вказує на те, що дисертант володіє ними досконало і досяг поставленої мети.

Відповідність змісту автореферату основним положенням дисертації. Автореферат в повному обсязі відображає матеріали дисертаційної роботи. Основні положення, висновки, пропозиції виробництву є ідентичними в дисертації та авторефераті.

Публікації основних результатів дисертації

Результати досліджень висвітлено у 23 наукових працях, з них 6 – у наукових фахових виданнях, 1 – стаття у закордонному збірнику, 3 – статті в інших наукових виданнях України, 13 – у тезах доповідей.

Оцінюючи дисертаційну роботу позитивно, слід звернути увагу на деякі дискусійні положення, зауваження та побажання та отримати на них пояснення:

1. Згідно даних наукової літератури, одним з найважливіших механізмів антагоністичної дії молочнокислих бактерій на патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми є активність кислотоутворення. Проте обраховані Вами коефіцієнти кореляції для різних тест-культур вказують на слабкий або дуже слабкий зв'язок антагоністичної активності досліджуваних МКБ з активністю кислотоутворення. Які інші механізми, на Вашу думку, визначають антагоністичну активність селекціонованих штамів?

2. Поясніть, чим обумовлений вибір саме такого переліку тест-культур патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів для дослідження антагоністичної активності дифузним методом блоків.

3. Вивчення антибіотикорезистентності *L. rhamnosus* 13/2 дисково-дифузним методом показало, що штам стійкий до оксациліну, канаміцину, стрептоміцину, налідиксової кислоти. На Вашу думку, показана стійкість є його перевагою або недоліком для застосування бактерій як основи кормової добавки для кролів?

4. Потребують уточнення терміни «відновлення» і «корекція» балансу мікробіоти ШКК. Чи можливо їх повністю розмежувати?

5. Вами було розроблено біотехнологію отримання кормової добавки для кролів на основі нового перспективного штаму *L. rhamnosus* 13/2.

Чи плануєте Ви провести державну реєстрацію добавки для впровадження її в сільськогосподарське виробництво?

6. Подекуди трапляються стилістичні недоліки та помилки комп'ютерного друку.

Зазначені зауваження і побажання не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи Похилька Юрія Миколайовича.

Загальний висновок і оцінка дисертації щодо її відповідності чинним вимогам.

Дисертаційна робота «Біологічні властивості виділених з травного тракту кролів бактерій роду *Lactobacillus*, перспективних для створення пробіотичних препаратів» є завершеною цілісною самостійною науковою працею, яка характеризується належним методичним рівнем виконання і вирішення поставлених завдань, послідовністю, практичною спрямованістю та обґрунтованістю висновків та пропозицій виробництву.

Робота написана літературною мовою, добре оформлена, характеризується достатньою кількістю табличного та ілюстративного матеріалу, за своєю актуальністю, обсягом виконаних досліджень, їхнім теоретичним і практичним значенням відповідає вимогам п. 11 Постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567 «Порядок присудження наукових ступенів», а її автор, Похилько Юрій Миколайович, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент:

доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії бактеріологічного контролю якості і безпечності ветеринарних препаратів Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок І.М. Курніш