

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Степанькова Александра Александровича

«Функционирование уреалитического звена микробиома желудочно-кишечного тракта у представителей диких растительноядных птиц и млекопитающих», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология».

Введение. Обсуждаются возможные пути компенсации диетарного азота в питании растительноядных животных – азотфиксация, ферментация трудногидролизуемых азотных соединений и рециклизация мочевины. Согласно современным данным, последний вариант важнейший, и эффективность его зависит от интенсивности реабсорбции мочевины в почках и ЖКТ, и уреазной активности микроорганизмов в ЖКТ. Однако сведений об уреазной активности у диких животных-фитофагов, с разным типом пищеварительной системы и ферментации недостаточно, чтобы понять значение уреолитических микроорганизмов в обеспечении их азотом.

Актуальность. Известно, что рециклизация мочевины играет существенную роль в питании жвачных животных. Наиболее полные данные имеются о составе и активности уреалитического сообщества рубца сельскохозяйственных животных, так как от них зависит эффективность животноводства. Однако строение ЖКТ жвачных является лишь частным случаем из всего многообразия типов строения систем пищеварения. Поэтому работа направлена на сравнительное изучение уреалитического микробиома диких фитофагов (птиц и млекопитающих) с различными типами строения ЖКТ. Изучения микробиоты ЖКТ до последнего времени проводилась только культуральными методами. В связи с чем, поставили задачу отработки и применения метагеномного метода для более полного выяснения состава микробного сообщества ЖКТ.

Диссертация Александра Александровича объемом 100 страниц составлена по традиционному плану с введением, литературным обзором, объектами и методами, результатами и обсуждением, заключением, выводами и списком литературы, включающем 109 источников, в том числе 79 на иностранном языке.

В обзоре литературы сообщаются данные об особенностях азотного метаболизма растительноядных животных, описывается феномен рециклизации мочевины. В этой главе приводятся доводы о том, что именно активность уреалитического микробиома является основным фактором, регулирующим интенсивность рециклизации азота у животного. Указываются методические проблемы измерения уреазной активности в ЖКТ животных, приводящие к тому, что данные разных исследователей невозможно сравнивать между собой, что и стало одной из главных задач диссертации.

В объектах и методах перечислены животные, ЖКТ которых использовались в эксперименте. Это грызуны, зайцеобразные и курообразные: полуденная песчанка, общественная полевка, красная полевка, даурская пищуха, заяц-русак, сурок байбак, тетерев-косач, обыкновенный глухарь, обыкновенный фазан. Автор применил комплекс современных подходов, адаптировал методики для измерения уреазной активности и математической обработки метагеномных данных.

В результатах приведены значения уреалитической активности для всех отделов ЖКТ всех изученных животных. Указаны колебания этой величины, связанные с фазой суточной активности, сезоном, характером корма. Ключевой вывод, что у диких животных, не относящихся к жвачным, основная уреалитическая активность протекает в задних отделах кишечника. Следующий - уреалитическая активность прямо связана с типом кормовой базы. При питании богатыми кормами в летне-осенний период наблюдается падение активности, а при питании бедными зимними кормами —

возрастание. Автор связывает это с физиологической необходимостью повысить рециклизацию азота мочевины. К сожалению состав кормов не приведен.

Состав уреалитического микробного комплекса был показан для одного представителя от каждого изученного отряда: для песчанки, зайца и тетерева. Исследовали только отдел с максимальной активностью - слепую кишку. Основные культивируемые уреалитики относились к коринебактериям, бациллам, лактобациллам, энтеробактериям и бактероидам. Некультивируемые уреалитики установлены только для слепой кишки зайца-русака. Автор применил собственный алгоритм обработки метагеномных данных и составил список уреалитиков на уровне филумов. На уровне филумов, доминанты культуральных и метагеномных экспериментов совпадают, но, конечно, есть и отличия.

Основные результаты объединены в Заключение и сформулированы в Выводах, которые соответствуют положениям, выносимым на защиту, и представляются достоверными. Они опубликованы в статьях рецензируемых журналов.

Сильная сторона работы – её научная новизна. В частности, впервые проведено выявление бактерий-уреалитиков на основе метагеномного секвенирования *ureC* гена, и получены сопоставляемые данные об уреазной активности для диких млекопитающих и птиц. Проведено сравнение уреазной активности диких фитофагов с различными типами строения ЖКТ, по литературным данным и с домашними животными, оценено её изменение по сезонам.

Работа интересная, хорошо, четко написана, представляет законченное по поставленной цели и задачам исследование.

В тоже время при анализе диссертации возникает ряд вопросов и замечаний:

1. Почему автор считает гидролиз мочевины ключевым звеном рециклизации азота, а не накопление микробной биомассы и гидролиз микробных белков и их усвоение.

2. Какой уровень уреазной активности признается им физиологически значимым, несколько мг N-NH₃/г в час или более (1-3 десятка мг N-NH₃/г в час), от этого зависит принятие части первого вывода, сопоставимость активности в ЖКТ у диких грызунов и зайцеобразных и домашних животных (коров).

3. Биомасса прокариот по данным автора в ЖКТ не столь большая (прямым методом до 25 млрд. Кл в г, посевом сотни млн.), достаточна ли она для обеспечения диких животных и птиц путем рециклизации азота.

4. Часто используется термин симбионты ЖКТ, что же под этим понимается автором, изучается же весь микробиом ЖКТ.

5. Использована только одна диагностическая среда для уреалитиков – агар Кристенсена. В тоже время существуют другие диагностические среды, которые могли бы расширить список культивируемых уреалитиков. И в перспективе важно увидеть состав сообщества по данным метагеномного анализа на уровне более мелких таксонов.

6. В качестве уреалитического звена микробиома автор рассматривает только прокариот, преимущественно бактерий. В то же время уреазная активность содержимого ЖКТ складывается из активностей бактерий, архей, грибов и тканей съеденных растений. Не ясно какую долю активности обеспечивает именно бактериальная составляющая.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования, ряд из них носят характер пожеланий. Диссертация отвечает требованиям, работа Александра Александровича отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к диссертациям, представляемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Тема диссертации соответствует паспорту специальности 03.02.03 «Микробиология», а

содержание отвечает критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также требованиям приложений № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель - Степаньков Александр Александрович - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 «Микробиология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук по специальности 03.02.03 «Микробиология»
Заведующий кафедрой микологии и альгологии Биологического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова», Биологический факультет

Кураков Александр Васильевич
Дата подписания 29.11.2019



Тел.: 8(495)9393970, Email: kurakov57@mail.ru

Биологический факультет
Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова.
119234, Россия, Москва,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12
Тел. 495-939-2776, e-mail: info@mail.bio.msu.ru

Подпись Куракова А.В. удостоверяю:

Заместитель декана факультета, проф.



А.М.Рубцов