

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу

**Фецюх Анастасії Богданівни «Фізіологічні аспекти стійкості рослин
Salix viminalis L. в умовах техногенного забруднення»,**

подану на здобуття ступеня доктора філософії

з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми дисертації. Актуальність теми дисертаційної роботи обумовлена глобальною проблемою техногенного забруднення навколишнього середовища та пошуку безпечних способів його відновлення в сучасних умовах. Тривають пошуки стійких рослин, здатних рости на маргінальних техногенно забруднених субстратах, поступово відновлюючи їх; необхідне теоретичне обґрунтування їх практичного використання з метою фітореMediaції. У своїй дисертації Анастасія Фецюх досліджує цю проблему на прикладі субстратів полікомпонентно забрудненого хвостосховища хімічної збагачувальної фабрики Стебницького ДГХП “Полімінерал”. У роботі використано рослини енергетичної верби (верба прутувидна, *Salix viminalis* L.), яка, за даними літератури, стійка до засолення та використовується як рослина-фітореMediaтор на субстратах із важкими металами. Така стійкість є комплексною ознакою, яка охоплює низку фізіолого-біохімічних реакцій: зміни стану системи антиоксидантного захисту, складу та кількості білків, характеру біотичних взаємодій. Проте, в науковій літературі наявні обмежені дані, зокрема це роботи Н. Dannatt із співавторами (2010), щодо комплексного впливу полікомпонентно забрудненого техногенного субстрату на рослини та фізіолого-біохімічні механізми стійкості *S. viminalis*, а в природних умовах, як правило, нема дії лише одного стресового чинника. Дані щодо Стебницького хвостосховища відсутні. Відтак, актуальність дисертаційної роботи визначається потребою дослідження реакції та механізмів стійкості рослин *S. viminalis* до стресових умов техногенно забрудненого середовища Стебницького хвостосховища. Вибір теми дослідження цілком виправданий, а актуальність роботи не викликає сумніву.

Зв'язок дисертаційної роботи з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертаційні дослідження виконані в межах науково-дослідної теми «Використання енергетичних рослин для фітореMediaції техноземів» (№ держреєстрації 0117U000893) на кафедрі фізіології та екології рослин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка; та проектів «Development of native rhizosphere community-based microbial consortia (CBC) for crop stress tolerance improvement», «Bioremediation of pollution generated by manmade chemicals in the form of industrial activity, agricultural chemicals, or the improper disposal of waste» на кафедрі мікології лісу та патології рослин факультету природних ресурсів і сільськогосподарських наук Шведського університету сільськогосподарських наук (Уппсала, Швеція) за фінансової підтримки Шведського інституту (Svenska Institutet). Дисертантка була виконавцем усіх проектів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих в дисертації. Лабораторні вегетаційні та польові експерименти виконані з дотриманням вимог, у достатній повторності. Біохімічні експерименти проведено у п'ятикратній повторності. У кожному варіанті досліду використано по три біологічні повторності, а у них – по три аналітичні. Це достатньо для визначення статистичної достовірності отриманих даних із використанням програмного пакету аналізу даних MS Excel 2016. Візуалізацію результатів досліджень проведено за допомогою графічного функціоналу MS Excel 2016 та у програмі RStudio. Дані з нормальним розподілом значень представлені як середнє значення та стандартна похибка. Достовірність різниці між варіантами оцінена за критерієм Стьюдента, $p \leq 0,05$.

Аналіз даних секвенування Illumina MiSeq бактеріального мікробіому здійснено шляхом Байєсового моделювання з використанням бібліотек R rstan vers. 2.21.3 (Stan Development Team 2020) та brms версії 2.16.1 (Bürkner 2018).

Таким чином, дисертаційне дослідження Анастасії Фецюх виконано на достатньо високому методичному рівні з використанням комплексу сучасних методів експериментального дослідження та аналізу даних. Основні наукові положення та висновки, сформульовані в дисертації, логічно випливають із одержаних результатів. Вони відповідають поставленій меті та завданням дослідження.

Основні наукові результати, одержані автором, та їх новизна. Дисертантка отримала значний обсяг наукових результатів, що характеризуються новизною:

- вперше досліджено морфологічні зміни листків (флуктуаційна мінливість), кореневої системи, пагонів в умовах вирощування рослин *S. viminalis* на техногенно забрудненому субстраті Стебницького хвостосховища як у лабораторному вегетаційному, так і польовому експериментах,
- вперше досліджено потенційну роль ензиматичних (каталази, пероксидази) і неензиматичних (проліну, аскобінової кислоти, фенольних сполук, розчинних цукрів) антиоксидантів у забезпеченні стрес-протекторних реакцій *S. viminalis* в умовах комплексної стресової дії засолення й важких металів субстратів Стебницького хвостосховища,
- вперше показано причинно-наслідкові зв'язки між збільшенням рівня забруднення субстрату хвостосховища м. Стебник і вмістом осмолітів (проліну, розчинних цукрів), вмістом аскорбінової кислоти та активністю ензимів антиоксидантного захисту в органах *S. viminalis*,
- вперше визначено склад угруповань ендofітних бактерій коренів *S. viminalis* в умовах сумісного впливу техногенного забруднення Стебницького хвостосховища та нативних ризосферних бактерій *Salicornia europaea*, методом секвенування Illumina MiSeq продемонстровано наявність ендofітних бактерій родів *Halobacterium*, *Marinobacter*, *Idiomarina*, *Marinobacterium*.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів дослідження. Теоретична цінність наукових результатів представленої роботи полягає у детальному вивченні механізмів пристосування енергетичної верби *S. viminalis* до росту на непродуктивних та забруднених техногенних

субстратах, що у подальшому сприятиме розробці технологій фітореMediaції. Піонерні результати дослідження складу ендofітних угруповань коренів верби, що показали наявність родів бактерій, важливих для забезпечення стійкості рослин до засолення та впливу важких металів, становлять теоретичне підґрунтя їх подальшого використання для інокулювання рослин у техногенних умовах вирощування. Отримані дані важливі з огляду перспективності вирощування цього виду енергетичних рослин на території хвостосховища м. Стебник та інших техногенно забруднених територій України.

Окрім цього, отримані дані, як і апробовані методики досліджень, можуть використовуватися у науковій роботі та викладанні навчальних дисциплін біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка, а також інших установ.

Апробація результатів дисертації, повнота викладу основних положень, висновків і рекомендацій. Основні наукові результати та висновки дисертації пройшли апробацію на міжнародних наукових конференціях та опубліковані у фахових наукових виданнях. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано: 19 наукових праць, серед яких: 5 статей у наукових фахових виданнях України, 1 стаття у міжнародному виданні, що індексується наукометричною базою Scopus (IF 1,97), та 13 праць – у матеріалах і тезах вітчизняних і міжнародних конференцій.

Сукупність усіх публікацій відображає викладені в дисертації результати дослідження, що відповідає вимогам п. 8, 9 вимог до присудження ступеня доктора філософії «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44.

Відомості про дотримання академічної доброчесності. У наукових публікаціях і дисертаційній роботі Фецюх Анастасії Богданівни на тему «Фізіологічні аспекти стійкості рослин *Salix viminalis* L. в умовах техногенного забруднення» не виявлено ознак академічного плагіату, фальсифікації чи інших порушень, що могли б поставити під сумнів самостійний характер виконання дисертанткою представленого наукового дослідження. Текст є оригінальним, всі цитати коректно позначені та вказані в списку використаних джерел.

Структура та зміст дисертації. Дисертаційна робота відповідає вимогам щодо оформлення дисертацій, відповідно Постанові Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р. «Порядок присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії».

Дисертацію викладено на 182 сторінках українською мовою, основна частина складає 120 сторінок. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень, узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел і додатку. Рукопис містить список цитованої літератури до якого входять 293 найменування, серед яких 94 кирилицею та 199 латиницею, 30 рисунків і 10 таблиць.

Дисертаційна робота розпочинається з анотації, ключових слів і списку публікацій за темою дисертації, які написані державною та англійською

мовами. В анотації стисло представлені основні результати дослідження із зазначенням наукової новизни і практичного значення.

У **Вступі** (с. 20-27) обґрунтовано актуальність обраної тематики, сформульовано мету та завдання дослідження, визначено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, описано методи досліджень, анотовано результати дослідження, ступінь їх апробації та публікації, а також особистий внесок здобувача.

У першому розділі дисертації «**Огляд літератури**» (с. 28-45) розглянуто дані наукових публікацій щодо механізмів адаптації рослин до умов абіотичного стресу, зокрема засолення та важких металів, та роль мікробіому рослин у цьому процесі. Також наведено опис Стебницького хвостосховища та здійснено спробу обґрунтування доцільності вирощування енергетичних рослин на непродуктивних землях. Проведений аналіз літературних джерел дозволив здобувачці зробити висновок про пріоритетність обраного напрямку наукової роботи.

У другому розділі «**Матеріали та методи досліджень**» (с. 46-68) достатньо детально описано методику досліджень, яка відповідає меті та завданням дисертаційної роботи. Представлена узагальнена інформація про етапи, об'єкти, методи та обсяг досліджень. Описано методи відбору субстрату, закладання лабораторного та польового експериментів; методики вимірювання концентрації не-ензиматичних антиоксидантів та активності ензимів-антиоксидантів у листках, стеблах та коренях *S. viminalis*; методика визначення вмісту важких металів у субстраті та рослинних зразках, а також метод оцінки екологічного навантаження субстрату важкими металами; методика визначення загального вмісту білків; методика скринінгу ендofітних бактерій, методика числових розрахунків та візуалізації результатів досліджень з використанням програм MS Excel 2016 та RStudio.

У третьому розділі «**Результати досліджень та їхнє обговорення**» (с. 69-130) відображено результати вивчення впливу техногенного забруднення на морфометричні параметри енергетичних рослин, їх антиоксидантну систему та вміст білків і осмолітів; зміни вмісту важких металів у субстраті хвостосховища після вирощування верби, результати скринінгу складу угруповань ендofітних бактерій коренів. Отримані результати досліджень висвітлено у 9 таблицях та 25 рисунках.

У четвертому розділі «**Узагальнення**» (с. 131-140) дисертантка аналізує отримані результати, а також дає узагальнену оцінку впливу техногенного забруднення хвостосховища м. Стебник на фізіолого-біохімічні показники стресостійкості *S. viminalis*. В цьому розділі подано власне бачення дисертантки щодо фізіологічних реакцій верби енергетичної на полікомпонентний вплив техногенного субстрату м. Стебник. А також узагальнено механізми толерантності, в т.ч. із застосуванням RGPB, що уможливають використання *S. viminalis* з метою фіторемедіації в умовах м. Стебника та інших, схожих до цих умов, техногенно забруднених локацій.

Висновки (с. 141-143) Сформульовано 7 висновків, які логічно випливають з одержаних результатів, науково обґрунтовані, відповідають меті та завданням дослідження.

Список використаних джерел (с. 143-178) сформовано в алфавітному порядку, оформлений за встановленим стандартом.

Рукопис завершується додатком, що містить список опублікованих праць за темою дисертації, перелік наукових праць, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації.

Зауваження до дисертації. Подана дисертаційна робота свідчить про наукову зрілість дисертантки, її вміння бачити актуальні проблеми фізіології рослин і біології в цілому. Загалом, дисертаційна робота Фецюх А.Б. за своїм змістом і формою є завершеним самостійним науковим дослідженням. Високо оцінюючи наукове і практичне значення дисертаційної роботи, висловимо деякі зауваження та побажання:

1. У другому розділі “Матеріали та методи...”:

1) Загальне побажання опису усіх методик: звертатися до оригінальних статей, а не методичних вказівок. Якщо метод визначення описаний як ДСТУ, то в списку літератури потрібно надати посилання на цей конкретний ДСТУ, як наприклад ДСТУ 4288:2004 (с. 48). Бажано також вказувати назви приладів (водяна баня, спектрофотометр, сонікатор тощо), та їхніх виробників.

2) На жаль, в описі підрозділу 2.5 “Визначення ВМ у субстраті та рослинному матеріалі” допущено помилку в назві приладу та методу: вказано “*атомно-абсорбційної спектрофотометрії на спектрофотометрі СТЭ-1*”, тоді як СТЭ-1 — це за описом виробника — спектрограф, а метод визначення називається атомно-абсорбційна спектрометрія.

3) Враховуючи, що “... впливу іонів кадмію і цинку на різні клони рослин верби було встановлено, що деякі клони були толерантними до цих металів, інші – лише до одного... (Landberg, Greger, 1996). С.81”, доцільно вказувати звідки отримували живці *S. viminalis*, використані для експерименту.

4) Назва підрозділу 2.10 “Хроматографічне розділення низькомолекулярних білків”, вказана помилково, оскільки описує методику отримання витягів низькомолекулярних білків та їх електрофоретичне розділення, на жаль, наважка матеріалу для виділення білків, опис параметрів електрофоретичного розділення, назва приладу, який використовували з цією метою, не наведені. Так само відсутній опис методики аналізу спектрів розділених білків.

2. У розділі “Результати досліджень та їхнє обговорення” частина тверджень авторки в обговоренні спираються лише на дію засолення на рослини верби, тоді як у випадку субстратів Стебницького хвостосховища маємо комплексний вплив і засолення (сульфатного і хлоридного), і важких металів. Зокрема, “*В листках дослідних рослин помічено вплив засолення, який проявлявся у зменшенні вмісту білка відносно контролю*” (с.110), аналогічно с. твердження “*Виявлено достовірне зниження вмісту фенольних сполук відносно контролю, що могло виникнути на фоні адаптації рослин до нових умов зростання, або ж за токсичної дії засолення*” (с.115), та підсумки на с.119. В обговоренні: “*Згідно із результатами, стебла S.viminalis зазнавали найбільшого сольового навантаження в умовах хвостосховища*”. Водночас, авторка не враховує впливу важких металів, які теж спричиняють за даними літератури зростання вмісту проліну та інших неензиматичних антиоксидантів. І

саме в стеблі зосереджувалися токсичні кадмій і свинець. Таких неточностей вдалося б уникнути з використанням відповідних статистичних методів досліджень для оцінювання частки впливу кожного з факторів.

Окрім цього, є низка неточностей:

- 1) с.75 “*Результати польових досліджень показали, що найменше води накопичується у стеблах дослідних рослин, на 4 % нижче відносно контролю*”. В цьому випадку різниця не достовірна і про це слід вказувати.
- 2) Як розуміти позначення К+, Д+ в Таблиці 3.3. *Вміст ВМ у субстраті хвостосховища м. Стебник (до і після вирощування рослин S. viminalis), мг/кг (с.80)?* За описом у тексті можна зрозуміти, що це Контроль і Дослід, до і після росту верби, проте у назві таблиці чи примітках потрібно уточнити це. Так, як це зроблено в наступному розділі, табл. 3.5.
- 3) Неточність у назві Таблиця 3.7. Коефіцієнти безпеки (КБ) **ґрунтів** Стебницького хвостосховища (с.91). Очевидно, це субстрат або технозем, але не ґрунти.
- 4) Уточнення щодо назви підрозділу 3.6: “Визначення АСС-поглинаючих ендофітних бактерій”. Доцільніше використати назву виявлення, оскільки в роботі здійснено саме виявлення здатності бактерій до поглинання АСС.
- 5) Згідно із даними досліджень (Фецюх та ін., 2019), вміст кадмію перевищував ГДК у органах рослин *S. viminalis*, вирощених на субстраті хвостосховища. Відповідно це вказує на високий рівень акумуляції металу рослинами. Враховуючи ці результати, варто взяти до уваги ймовірність зростання вмісту фітохелатинів (роботи О. Vatamaniuk et al.) і білків металотіонеїнів, молекулярна маса яких теж близька до Mr 10, а не концентрувати увагу в обговоренні лише на нмБТШ. Зрештою, твердження, наведене на с.110 “Отримані результати підтверджують значення нмБТШ у запобіганні пошкодження за стресових умов, а також підкреслюють їх участь у рості та розвитку рослин” це лише припущення, оскільки за допомогою використаних дисертанткою методів неможливо ідентифікувати ці білки як БТШ.
- 6) КФ 1.11.1.7 — за міжнародною класифікацією ензимів — це гваяколпероксидаза, окрім цієї пероксидази в рослин функціонують інші форми цього ензима, зокрема, аспартатпероксидаза, глутатіонпероксидаза тощо. Активність якого ензима визначали у роботі? Загальну пероксидазну активність? Чи гваяколпероксидазну, як вказано в роботі?

та суперечливих тверджень:

- про зменшення доступності елементів “... це може свідчити про те, що ВМ знаходились у субстраті у менш доступній формі для поглинання рослинами” (с. 93-94). Тоді як пояснити той факт, що в органах верби накопичуються значні кількості ВМ?
- С.75: “Вміст води у листках та стеблах 30-ти добових рослин був у межах похибки, а у коренях – **більшим на 25 %**, порівняно із контролем”. Тоді як на с. 133: “Згідно із отриманими даними, у

коренях 30-ти добових *S. viminalis* виявлено зниження вмісту води відносно контролю”.

3. У тексті дисертаційної роботи інколи трапляються орфографічні та механічні помилки, які дещо погіршують сприйняття наукової інформації. Доцільно використовувати однакові назви елементів, уникаючи поєднання в одному абзаці тексту і купрум, і мідь; і ферум, і залізо (с.79, абзац. 2). Проте, ці зауваження дидактичного характеру і помилки можна легко виправити.

4. Розділ “Узагальнення” варто доопрацювати і поєднати в єдину схему отримані результати, які варто представити у вигляді рисунка. В цьому розділі не потрібно багато цитувань, натомість бажано подати власне бачення фізіологічних реакцій верби енергетичної на полікомпонентний вплив техногенного субстрату м. Стебник. А також узагальнити механізми толерантності цього виду, в т.ч. і з застосуванням РГРВ, що уможливають використання *S. viminalis* з метою фіторе mediaції в умовах м. Стебника та інших, схожих до цих умов, техногенно забруднених локацій. Підкреслити унікальність цієї роботи, адже таких досліджень не проводили.

5. У “Висновках”, пункт 6 висновків надто довгий, варто лаконічніше його сформулювати, обов’язково врахувавши достовірність різниці між контролем і дослідом, зокрема, це стосується вмісту аскорбінової кислоти: “... у листках та стеблах *S. viminalis* її вміст (АК) є більшим відносно контрольних рослин на 7,7 %...”, на жаль, ця зміна недостовірна щодо контролю.

Однак, вищенаведені зауваження істотно не впливають на науково-практичну цінність роботи і загальну позитивну оцінку дисертації.

Висновки про відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертаційна робота Фецюх Анастасії Богданівни на тему «Фізіологічні аспекти стійкості рослин *Salix viminalis* L. в умовах техногенного забруднення», є завершеною науковою працею, що за актуальністю проблеми, методичними підходами, обсягом, ґрунтовністю аналізу та інтерпретацією отриманих даних, повнотою викладу принципів наукових положень, науково-теоретичним та практичним значенням повністю відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р. «Порядок присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а дисертантка, з урахуванням виконання у повному обсязі освітньої складової освітньо-наукової програми та індивідуального плану наукової роботи, заслуговує присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

РЕЦЕНЗЕНТ:

к.б.н., доцентка кафедри фізіології та екології рослин
Львівського національного університету
імені Івана Франка, доцент

Н.Д. Романюк