

ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації
“Актиноміцети ризосфери ялівцю високого *Juniperus excelsa* M.-Bieb.: генетичне
різноманіття та біосинтетичні властивості” здобувача ступеня

доктора філософії з галузі знань

09 “Біологія” за спеціальністю 091 “Біологія”

Тістечка Степана Івановича

1. Актуальність теми дисертації

Відкриття антибіотиків та їхнє успішне використання в медицині привело до впевненості у безумовній та постійній ефективності цих сполук під час лікування мікробних інфекцій. Однак, з часом почали з’являтися мікроорганізми, стійкі до антибіотиків, що привело до усвідомлення їхньої недосконалості. Найперспективнішим способом вирішення цієї проблеми є впровадження нових антимікробних препаратів. Це в свою чергу зумовлює підвищений інтерес до скринінгу нових природних біоактивних сполук. Бактерії класу *Actinomycetia*, добре відомі своєю здатністю продукувати широкий спектр біоактивних сполук. Проте, виділення та впровадження нових сполук значно сповільнилося. Труднощі з впровадженням нових антибіотиків пояснюють значним повторним відкриттям раніше описаних сполук, особливо серед стрептоміцетів. Одним з підходів до вирішення цієї проблеми є дослідження нових і недостатньо вивчених середовищ існування мікроорганізмів. Перспективною для скринінгу нових природних біоактивних сполук є вузька зона субтропіків середземноморського типу на чорноморському узбережжі Кримського півострова. Значна варіабельність мікрокліматичних умов, велике різноманіття рослинних угруповань, яке включає значну кількість рідкісних і ендемічних рослин, сприяє великому мікробному різноманіттю. Однією з таких рослин є ялівець високий (*Juniperus excelsa* M.-Bieb.). Лікарські властивості цієї рослини, а також особливості мікрокліматичних умов, можуть формувати особливе угруповання актиноміцетів, філогенетична характеристика якого дозволить з великою вірогідністю виявити рідкісні роди. Всебічне дослідження біологічних властивостей ізолятів, головно спектру їхніх вторинних метаболітів, відкриє перспективи до виявлення продуцентів нових природних сполук.

Тему дисертації затверджено на засіданні Вченої ради Львівського національного університету імені Івана Франка, протокол № 43/12 від 06.12.2017 року. Уточнено тему дисертації на засіданні Вченої ради Львівського національного університету імені Івана Франка, протокол № 49/6 від 29.06.2023 року.

2. Зв’язок теми дисертації з державними програмами, науковими напрямами університету та кафедри

Дисертаційну роботу виконано на базі структурного підрозділу Колекція культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків (ККМПА), що функціонує при кафедрі генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка, в межах держбюджетних тем Бг-203Н “Колекція культур мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка” (№ держреєстрації 0103U008453, договір №Н/309-2003 від 20.04.2015), Бг-41Нр “Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічно активних речовин стрептоміцетами” (№ державної реєстрації 0116U008070, 2016-2018 рр.), Бг-09Ф “Мутації стійкості актинобактерій до антибіотиків: джерело нових уявлень про механізми резистентності та біотехнологічних знарядь” (№ державної реєстрації 0120U102039, 2020-2022 рр.). Частина досліджень

виконано під час наукового стажування на кафедрі фармацевтичної біотехнології Саарландського університету (Німеччина, 2018, 2019-2021 рр.) за індивідуальними грантами FEMS (FEMS-GO-2017-001) та DAAD (№57440918).

3. Особистий внесок здобувача в отриманні наукових результатів

Формування ідей, планування експериментів, аналіз та обговорення отриманих результатів, підготування рукописів статей та формування основних положень, виконувалось автором спільно з науковим керівником к.б.н. с.д. Громиком О.М. (ЛНУ імені Івана Франка). Увесь обсяг експериментальних досліджень виконано автором самостійно, або за безпосередньої участі. Спільно з науковим керівником охарактеризовано задепоновані в ККМПА 372 ізоляти актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*. Автор самостійно виконав філогенетичну характеристику ізолятів актиноміцетів, вивчення їхньої антибіотичної, фітостимулювальної активностей, скринінг продуцентів антибіотиків, аналіз ВЕРХ-МС хроматограм та очищення нових фурахіноцинів. ВЕРХ-МС аналіз вторинних метаболітів ізолятів та ЯМР виконано під час наукового стажування закордоном. Пошук й аналіз наукової літератури за темою дисертації та її оформлення автор виконав самостійно.

4. Достовірність та обґрунтованість отриманих результатів та запропонованих автором висновків, висновків, рекомендацій

Одержані результати є науково-обґрунтованими і достовірними, повністю підтверджуються сучасними та взаємодоповнюючими експериментальними методами досліджень та узгоджуються з літературними даними. Дослідження філогенії ізолятів здійснювали молекулярно-генетичними та біоінформатичними методами, усі нуклеотидні послідовності, отримані в цій роботі, були додатково перевірені та завантажені в базу даних нуклеотидних послідовностей (GenBank). Здатність продукувати біологічно активні сполуки вивчали використовуючи комбінацію фізико-хімічних та мікробіологічних методів (культивування ізолятів, екстракція вторинних метаболітів у актиноміцетів, високоефективна рідинна хроматографія маспектроскопія (ВЕРХ-МС), дереплікативний аналіз, нормально-фазова хроматографія, ексклюзійна хроматографія, обернено-фазова ВЕРХ). Наукові положення та висновки, сформульовані у дисертації, ґрунтуються саме на отриманих в ході роботи експериментальних даних. Результати досліджень, які наведені у дисертаційній роботі та опубліковані у наукових публікаціях багаторазово апробовані у вигляді доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях і симпозіумах, належать автору і є його науковим доробком.

5. Ступінь новизни основних результатів дисертації порівняно з відомими дослідженнями аналогічного характеру

Вперше проведено комплексний аналіз філогенетичного різноманіття та біосинтетичного потенціалу актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова. Встановлено таксономічне положення 372 ізолятів актиноміцетів, які представлені 11 родами (*Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* та *Streptomyces*). Вперше на території України виявлено рідкісний рід актиноміцетів – *Actinorectispora*, який на сьогодні включає лише два типові представники. Визначено здатність ізолятів продукувати антимікробні сполуки проти спектру тест-культур. Досліджено фітостимулювальні властивості ізолятів актиноміцетів, через їхню здатність синтезувати індоліл-3-оцтову кислоту, сидерофори, солубілізувати нерозчинні форми Фосфору та асимілювати атмосферний азот.

Вперше використано мікробний біосенсор *S. lividans* TK24 pMO16 для скринінгу продуцентів тіопептидних антибіотиків серед природних ізолятів актиноміцетів. В результаті

чого вперше на території Кримського півострова виділено продуцентів тіопептидних антибіотиків берніаміцинів – *Streptomyces* sp. Je 1-79 та Je 1-613.

Ідентифіковано, очищено та встановлено хімічну структуру двох нових нафтохінонвмісних антибіотиків фурахіноцинів К та L, які продукує штам *Streptomyces* sp. Je 1-369. В структурі фурахіноцину L виявлено дуже рідкісний, серед природних сполук, фрагмент ацетилгідразону. Виявлено перший, і поки єдиний, фурахіноцин із антимікробною активністю. Запропоновано ймовірний шлях біосинтезу нових фурахіноцинів К та L.

6. Перелік наукових праць, які відображають основні результати дисертації

6.1. Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Тістечок, С.І., Сирватка, В.Я., Федоренко, В.О., Громико, О.М. (2018). Актиноміцети ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – антагоністи фітопатогенної мікробіоти. Фактори експериментальної еволюції організмів, 23, 340–345. <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v23.1038> (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
2. Тістечок, С.І., Дацюк, Ю.Р., Федоренко, В.О., Громико, О.М. (2020). Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. Je 1-42: філогенетичний аналіз, біологічні властивості та спектр вторинних метаболітів. Фактори експериментальної еволюції організмів, 27, 276–281. <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v27.1338> (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
3. Tistechok, S.I., Tymchuk, I.V., Korniychuk, O.P., Fedorenko, V.O., Luzhetskyu, A.M., Gromyko, O.M. (2021). Genetic identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. strain Je 1–6 isolated from rhizosphere soil of *Juniperus excelsa* Bieb. *Cytology and Genetics*, 55, 28–35. <https://doi.org/10.3103/S0095452721010138> (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
4. Тістечок, С., Федоренко, В., Громико, О. (2023) Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. Je 1-93, продуцент антифунгальних антибіотиків. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 88, 17–25. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2023.88.02> (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)

6.2. Публікації у наукових періодичних виданнях інших держав, що індексуються у наукометричних базах Scopus та/або Web of Science Core Collection:

1. Rebets, Y., Schmelz, S., Gromyko, O., Tistechok, S., Petzke, L., Scrima, A., Luzhetskyu, A. (2018). Design, development and application of whole-cell based antibiotic-specific biosensor. *Metabolic engineering*, 47, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.019> (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень щодо тестування створеного біосенсору)
2. Tistechok, S., Myronovskiy, M., Fedorenko, V., Luzhetskyu, A. Gromyko O. (2022). Screening of thiopeptide-producing streptomycetes isolated from the rhizosphere soil of *Juniperus excelsa*. *Current Microbiology*, 79(10), 305. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03004-2> (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
3. Tistechok, S., Stierhof, M., Myronovskiy, M., Zapp, J., Gromyko, O., Luzhetskyu, A. (2022) Furaquinocins K and L: Novel naphthoquinone-based meroterpenoids from *Streptomyces* sp. Je 1-

369. *Antibiotics (Basel)*, 11(11), 1587. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111587> (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)

4. Tistechok, S., Roman, I., Fedorenko, V., Luzhetskyy, A., Gromyko, O. (2023) Diversity and bioactive potential of *Actinomycetia* from the rhizosphere soil of *Juniperus excelsa*. *Folia Microbiologica*, 68(4), 645–653. <https://doi.org/10.1007/s12223-023-01047-x> (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)

6.3. Патенти України:

1. Громико О.М., Тістечок С.І., Федоренко В.О. Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. ІМВ Ас-5039 - продуцент тіопептидного антибіотика бернінаміцину А : Пат. 122104 Україна : МПК (2020.01) С12N 1/20 (2006.01) С12R 1/465 (2006/01) А61К 31/00. № а 201903180; заявл. 01.04.2019; опубл. 10.09.2020, Бюл. № 17.

2. Тістечок С.І., Громико О.М., Федоренко В.О. Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. ІМВ Ас-5038 – продуцент антибіотика лідикаміцину та його похідних : Пат. 123122 Україна : МПК С12N 1/20 (2006.01) С12R 1/465 (2006.1) G01N 33/569 (2006.01) С12P 17/18 (2006.01). № а 2019 08169; заявл. 15.07.2019; опубл. 17.02.2021, Бюл. №7.

7. Апробація основних результатів дослідження на конференціях, симпозіумах, семінарах тощо

1. Тістечок С., Конечний Ю., Тимчук І., Панас М., Корнійчук О., Федоренко В., Громико О. (2018, 10–12 квітня). Актиноміцети ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – продуценти антимікотичних сполук. Збірник тез XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 150-151.

2. Тістечок С., Корнійчук О., Тимчук І., Громико О., Федоренко В. (2018, 16–20 квітня). Антибіотична активність актиноміцетів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – антагоністів MRSA. Третій щорічний регіональний науковий симпозіум в рамках концепції „Єдине здоров'я”, Київ, 135.

3. Тістечок С., Мицик Ю., Тимчук І., Конечний Ю., Качор А. (2018, 28–30 листопада). Метаболічний профіль та антибактеріальна активність штаму *Streptomyces* sp. Lv 1-120. Збірник тез XIII міжнародної конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери” Харків, Україна, 122-123.

4. Бабко А., Тістечок С., Федоренко В., Громико О. (2018, 9–11 квітня). Вплив плейотропного транскрипційного регулятора Адра на антибіотичну активність штамів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 16-17.

5. Мушинська В., Тістечок С., Мицик Ю., Лужецький А., Федоренко В., Громико О. (2018, 9–11 квітня). Скринінг продуцентів памаміцинів серед актиноміцетних штамів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 24.

6. Тістечок С., Федоренко В., Лужецький А., Громико О. (2021, 19–21 квітня). Аналіз послідовності чернетки генома штаму *Streptomyces* sp. Je 1-369. Збірник тез XVII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 116-117.

7. Тістечок С.І., Мироновський М. Л., Федоренко В. О., Лужецький А. М., Громико О.М. (2022, 25 серпня). Скринінг продуцентів тіопептидних антибіотиків з використанням

репортерної системи на основі промотора гена *tipA*. XXII міжнародна Гамовська конференція “The importance of G. Gamow’s ideas for biology of the 21st century”, Одеса, Україна, 115-116.

8. Рибчук А., Тістечок С., Федоренко В., Громико О. (2023, 26–28 квітня) Характеристика актиноміцетів родини *Pseudonocardiaceae* з ризосфери рослин кримського півострова. Збірник тез XIX Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 96-97.

9. Тістечок С.І., Ребець Ю.В., Федоренко В.О., Лужецький А.М., Громико О.М. (2023, 11–13 травня) Гетерологічна експресія кластера генів нового природного антибіотика Je478 у штаммах стрептоміцетів. Збірник тез VII міжнародної науково-практичної конференції “Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience – 2023”, Тернопіль, Україна, 165-168.

8. Наукове значення виконаного дослідження із зазначенням можливих наукових галузей та розділів програм навчальних курсів, де можуть бути застосовані отримані результати

Отримані результати дозволять сформуванню уявлення про різноманіття та біосинтетичний потенціал актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова, а також сформуванню колекцію штамів актиноміцетів – продуцентів антибіотиків. Створена і частково досліджена колекція природних ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* може бути однією зі стартових платформ для розвитку мікробних біотехнологій в Україні.

Результати досліджень використовуються у навчальному процесі при викладанні навчальної дисципліни “Великий практикум з генетики мікроорганізмів” на кафедрі генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка.

9. Практична цінність результатів дослідження із зазначенням конкретного підприємства або галузі, де вони можуть бути застосовані

В дослідженій колекції природних ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* виявлено продуцентів промислово важливих антибіотиків антимицинів та спіраміцинів, а також стамбоміцинів, десерторміцину А, бернінаміцинів та лідикаміцинів, що підтверджено двома патентами України на винахід. Ідентифіковані в роботі нові антибіотики фурахіноцини, мають практичне та фундаментальне значення. Крім антибіотичної активності у структурі фурахіноцину L міститься рідкісний фрагмент ацетилгідразону, поки не відомо які гени беруть участь у його формуванні. Таким чином, продуцент цих антибіотиків може стати платформою для з’ясування принципів формування гідразоновмісних природних сполук. Створена в ході роботи колекція продуцентів антибіотиків може бути платформою для формування повного циклу виробництва антибіотиків в Україні, що сприятиме зміцненню безпеки у сфері охорони здоров’я. Нуклеотидні послідовності окремих генів та цілих геномів актиноміцетів, отриманих в цій роботі, зареєстровані в міжнародних базах даних (зокрема, GenBank) та є доступними для досліджень науковими групами всього світу.

10. Оцінка структури дисертації, її мови та стилю викладення

Дисертація за структурою, мовою та стилем викладення відповідає вимогам МОН України.

Дисертацію заслухано та обговорено на науковому семінарі кафедри генетики та біотехнології біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка (протокол № 21 від 21 вересня 2023 року). У ході обговорення дисертації суттєвих зауважень, які стосуються суті роботи, не було висунуто.

В цілому дисертаційна робота Тістечка Степана Івановича “Актиноміцети ризосфери ялівцю високого *Juniperus excelsa* M.-Bieb.: генетичне різноманіття та біосинтетичні властивості” є завершеною науковою працею в межах визначених завдань, в якій досліджено

філогенетичне різноманіття природних ізолятів актиноміцетів ризосфери ялівцю високого та їхній потенціал продукувати біологічно активні сполуки, головню антибіотики.

Основні результати наукового дослідження опубліковані в 8 наукових статтях серед яких, 4 статті у міжнародних виданнях, які входять до наукометричних баз Scopus та Web of Science (квартиль Q1-Q3), 1 стаття в фаховому виданні України категорія А, яке індексується у наукометричній базі Scopus та 3 статті у фахових виданнях України категорія Б; 2 патенти України на винахід; та 9 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях та симпозиумах.

На основі вищесказаного можна зробити такі висновки щодо поданої дисертаційної роботи:

1. За актуальністю обраної теми, обсягом, достовірністю та рівнем апробації отриманих результатів, науковою новизною, обґрунтованістю висновків, практичною цінністю дисертаційна робота “Актиноміцети ризосфери ялівцю високого *Juniperus excelsa* M.-Bieb.: генетичне різноманіття та біосинтетичні властивості” відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. “Про затвердження Вимог до оформлення дисертації” та п. 6 “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 року № 44.

2. Дисертація відповідає спеціальності 091 “Біологія” (галузь знань 09 “Біологія”).

3. Наукові праці Тістечка Степана Івановича, опубліковані за результатами дисертаційної роботи, за кількістю та якістю відповідають п. 8-9 “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 року № 44.

4. Дисертація “Актиноміцети ризосфери ялівцю високого *Juniperus excelsa* M.-Bieb.: генетичне різноманіття та біосинтетичні властивості” Тістечка Степана Івановича рекомендується для подання до розгляду та захисту у спеціалізованій вченій раді.

Головуюча на засіданні фахового семінару,
доктор біологічних наук,
професор кафедри фізіології та екології рослин

Ольга ТЕРЕК

21.09.2023 року

Підпис професора Ольги ТЕРЕК засвідчую.

Вчений секретар
Львівського національного
університету імені Івана Франка,
доцент



Ольга ГРАБОВЕЦЬКА