

До разової спеціалізованої ради ДФ 35.051.130
Львівського національного університету
імені Івана Франка
м. Львів, вул. Університетська, 1

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу
Тістечка Степана Івановича

**“Актиноміцети ризосфери ялівцю високого *Juniperus excelsa* M.-Bieb.:
генетичне різноманіття та біосинтетичні властивості”**,
яка представлена на здобуття ступеня доктора філософії зі спеціальності
091 “Біологія” (галузь знань 09 “Біологія”)

Актуальність теми дисертації. Найперспективнішим способом вирішення проблеми множинної стійкості патогених мікроорганізмів до антибіотиків є впровадження у медицині нових антимікробних препаратів. На відміну від сполук, отриманих шляхом комбінаторного біосинтезу, природні антибіотики мікробного походження демонструють винятковий потенціал у подоланні мультирезистентності. Бактерії класу *Actinomycetia*, окрім низки інших біоактивних сполук, продукують приблизно дві третини всіх відомих на сьогодні антибіотиків. Зона субтропіків середземноморського типу на чорноморському узбережжі Кримського півострова, яка характеризується значною варіабельністю мікрокліматичних умов, великим різноманіттям угруповань рослин, зокрема, рідкісних і ендемічних, сприяє великому мікробному різноманіттю. За останнє десятиліття серед ізолятів з ризосфери рослин Кримського півострова було виділено продуцентів близько двадцяти нових біологічно активних сполук, серед яких олеакеран, антрахіноновий антибіотик рубіміцінон А, циклічні гексадепсипептидні антибіотики олеаміцини А та В, секвітерпен альбафлавенол В та інші. Тому дослідження Тістечком С. І. генетичного різноманіття природних ізолятів актиноміцетів ризосфери ялівцю високого (*Juniperus excelsa* M.-Bieb.) та їхнього потенціалу як продуцентів біологічно активних сполук, зокрема антибіотиків, є особливо актуальним завданням. Вибір теми дослідження цілком виправданий, має важливе практичне значення, а актуальність роботи не викликає сумніву.

Зв'язок дисертаційної роботи з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертаційну роботу виконано на базі структурного підрозділу Колекція культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків, 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.”

(№ держреєстрації 0116U008070, 2016–2018 рр.), Бг-09Ф “Мутації стійкості актинобактерій до антибіотиків: джерело нових уявлень про механізми резистентності та біотехнологічних знарядь” (№ держреєстрації 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). Дисертант був виконавцем усіх проєктів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей геномів, секвенованих фрагментів, а також підбір праймерів проведено з використанням Geneious 9.1.2. Пошук кластерів генів вторинних метаболітів та їхній аналіз здійснено з допомогою інструменту аналізу геному antiSMASH. Структурні формули хімічних сполук створено з використанням ChemDraw Ultra 12.0 (CambridgeSoft).

Загалом дисертаційне дослідження Тістечка С. І. виконано на достатньо високому методичному рівні з використанням комплексу сучасних мікробіологічних, молекулярно-генетичних, біоінформатичних та фізико-хімічних методів досліджень 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.

Дисертант отримав значний обсяг наукових результатів, що характеризуються новизною.

Вперше проведено комплексний аналіз філогенетичного різноманіття актиноміцетів, виділених з ризосфери *J. excelsa*, та встановлено таксономічне положення 372 ізолятів, серед яких є представники 11 родів (*Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* та *Streptomyces*) класу *Actinomycetia*. Виявлено, що 94% від усіх ізолятів належать до роду *Streptomyces*. Вперше з біотопів України виділено представника дуже рідкісного роду актиноміцетів *Actinorectispora*, який на сьогодні налічує лише два типових види.

Показано, що понад 40% досліджених ізолятів, більшість з яких стрептоміцети, інгібують ріст збудників внутрішньолікарняних інфекцій (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Proteus vulgaris* та *Candida albicans*). Понад 60% ізолятів виявилися антагоністами фітопатогенних бактерій та плісневих грибів.

Вперше виявлено, що для значної кількості досліджених ізолятів властиві фітостимульовані властивості, такі як асиміляція атмосферного азоту, солюбілізація нерозчинних форм Фосфору, синтез індоліл-3-оцтової кислоти та

сидерофорів. Ізоляти, які поєднують декілька досліджуваних властивостей, можуть бути перспективними для розробки біопрепаратів для рослинництва.

В результаті метаболічного профілювання окремих ізолятів за їхніми антимікробними активностями виявлено та описано продуцентів антибіотиків десертomicину А, канханаміцину А, стрепторубіну В, спектинабіліну (*Streptomyces* sp. Je 1-42); антиміцинів (*Streptomyces* sp. Je 1-93); спіраміцинів та стамбоміцинів (*Streptomyces* sp. Je 1-651).

Вперше використано мікробний біосенсор *Streptomyces lividans* ТК24 рМО16 для скринінгу продуцентів тіопептидних антибіотиків серед природних ізолятів актиноміцетів. Направлений скринінг природних сполук з використанням специфічних мікробних біосенсорних систем дозволив виявити продуцентів тіопептидних антибіотиків бернінаміцинів А і В (*Streptomyces* sp. Je 1-79 та Je 1-613), 31 потенційного продуцента антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану, серед яких продуцент лідикаміцинів *Streptomyces* sp. Je 1-6 та 26 потенційних продуцентів памаміцинів.

Відкрито два нові меротерпеноїдні антибіотики фурахіноцини К та L (*Streptomyces* sp. Je 1-369), які ідентифіковано, очищено та встановлено їхню хімічну структуру. Виявлено, що їхня особливість полягає у модифікаціях полікетид-нафтохінонового скелету, які раніше не були описані для фурахіноцинів. В структурі фурахіноцину L виявлено дуже рідкісний, серед природних сполук, фрагмент ацетилгідразону. Ідентифікований кластер генів біосинтезу фурахіноцинів в ізоляті *Streptomyces* sp. Je 1-369 на 60% схожий з *fur* кластером штаму *Streptomyces* sp. КО-3988. Запропоновано ймовірний шлях біосинтезу фурахіноцинів К та L на основі наявних даних біосинтезу фурахіноцину С та подібних сполук.

Показано, що фурахіноцин К виявляє цитотоксичну активність щодо клітинної лінії HepG2 на рівні 12,6 мкг/мл (IC50). Виявлено перший і поки єдиний фурахіноцин із антимікробною активністю. Фурахіноцину L властива антибактеріальна активність проти грампозитивних бактерій *Staphylococcus aureus* Newman (МІК на рівні 2 мкг/мл) та *Bacillus subtilis* (МІК на рівні 64 мкг/мл), що виявлено вперше для фурахіноцинів.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів дослідження. Теоретична та практична цінність наукових результатів представленої роботи полягає у розкритті потенціалу природних ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* як продуцентів широкого спектру біологічно активних сполук, зокрема антибіотиків. Серед досліджених ізолятів актиноміцетів, дисертантом виявлено продуцентів промислово важливих антибіотиків антиміцинів та спіраміцинів, а також стамбоміцинів, десертomicину А, бернінаміцинів та лідикаміцинів, що підтверджено двома патентами України на винахід. Ідентифікація нових антибіотиків фурахіноцинів має важливе практичне та фундаментальне значення. Крім антибіотичної активності, у структурі фурахіноцину L міститься рідкісний фрагмент ацетилгідразону, однак 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 дисертаційної 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 у роботі Тістечка С. І., зареєстровані в міжнародних базах даних (зокрема, GenBank) та є доступними для досліджень іншими науковцями.

Апробація результатів дисертації, повнота викладу основних положень, висновків і рекомендацій. Основні наукові результати та висновки дисертації пройшли апробацію на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях та симпозіумах і достатньо повно відображені в публікаціях автора у фахових наукових виданнях. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 20 наукових праць, зокрема: 8 наукових статей, 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 1 патент України на корисну модель; 9 тез доповідей на наукових конференціях та симпозіумах.

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 Тістечка Степана Івановича “Актиноміцети ризосфери ялівцю високого *Juniperus excelsa* M.-Bieb.: генетичне різноманіття та біосинтетичні властивості” не виявлено ознак академічного плагіату, фальсифікації чи інших порушень, що могли б поставити під сумнів самостійний характер виконання дисертантом 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 до наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації».

Дисертацію викладено українською мовою на 204 сторінках друкованого тексту та проілюстровано 39 рисунками та 7 таблицями. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень,

висновків, списку використаних джерел та додатків. Рукопис містить список цитованої літератури, до якого входять 265 найменувань.

Дисертаційна робота розпочинається з анотації, ключових слів, які написані державною та англійською мовами, і списку публікацій за темою дисертації. В анотації стисло представлені основні результати дослідження із зазначенням наукової новизни і практичного значення.

У **“Вступі”** (с. 22–28) обґрунтовано актуальність обраної тематики, сформульовано мету та завдання, об’єкт та предмет дослідження, описано методи досліджень, зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами, визначено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, вказано особистий внесок здобувача, численні апробації результатів досліджень на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях та симпозіумах, а також публікації за матеріалами роботи.

У першому розділі дисертації **“Огляд літератури”** (с. 29–50) розглянуто дані наукових публікацій щодо таксономії, морфології та життєвого циклу бактерій класу *Actinomycetia*, їх поширення та екології, описано роди актиноміцетів як джерела природних біологічно активних сполук та висвітлено роль цих бактерій у відкритті нових природних сполук, розглянуто підходи щодо скринінгу нових біологічно активних сполук мікробного походження, описано дослідження нових середовищ існування та геномний видобуток як знаряддя для відкриття нових біологічно активних сполук. Цей розділ проілюстровано зображенням життєвого циклу спороутворювальних актиноміцетів, оригінальною схемою про основні антибіотики, виділені у різні роки зі стрептоміцетів, а також зображенням структури цільноклітинного біосенсора. Аналіз проведених іншими авторами досліджень свідчить про зрілість дисертанта як науковця, глибоке усвідомлення проблеми, розуміння завдань, які варто розв’язати. Опрацювання значної кількості літературних джерел дозволило здобувачу зробити висновок про пріоритетність обраного напряму наукової роботи.

У другому розділі **“Матеріали та методи досліджень”** (с. 51–63) достатньо детально описано як матеріали, так і методики досліджень, які відповідають меті та завданням дисертаційної роботи. Представлено інформацію про штами мікроорганізмів, середовища та умови їх культивування, реактиви, праймери. Описано методики визначення антимікробної активності ізолятів, виділення сумарної ДНК, електрофоретичне розділення ДНК в агарозному гелі, підготування сумарної ДНК до геномного секвенування, проведення полімеразної ланцюгової реакції, елюювання фрагментів ДНК із агарозного гелю, секвенування ампліфікованих фрагментів ДНК, проведення таксономічного аналізу та філогенії ізолятів актиноміцетів, мультилокусного аналізу, скринінгу продуцентів тіопептидних антибіотиків, памаміцинів, антибіотиків інгібіторів пептидоглікану, екстракції та аналізу вторинних метаболітів, дереплікації вторинних метаболітів, екстракції та очищення фурахіноцинів K і L, здійснення ЯМР аналізу, визначення мінімальної інгібувальної концентрації фурахіноцинів K і L та їх цитотоксичності. Також описано біоінформатичний аналіз даних. У роботі

використано сучасні мікробіологічні, молекулярно-генетичні, біоінформатичні та фізико-хімічні методи досліджень, що є адекватними і дозволяють досягти поставленої у роботі мети.

У третьому розділі **“Результати досліджень”** (с. 64–123) відображено результати досліджень різноманіття та антимікробної активності актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*, їх філогенії та властивостей як продуцентів біологічно активних сполук, скринінгу продуцентів тіопептидних антибіотиків, антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану, макролідних антибіотиків полікетидної природи памамацинів з використанням біосенсорів, представлено дані дослідження ідентифікації, визначення хімічної структури та біологічної активності нових нафтохінон подібних меротерпеноїдів фурахіноцинів К та L, встановлення кластера генів та ймовірного шляху біосинтезу нових фурахіноцинів. Отримані результати досліджень висвітлено у таблицях та рисунках. Усі підрозділи розділу містять підсумки, які свідчать про величезний об’єм проведеної дисертантом роботи та є висвітленням новизни, яку він вносить у розробку проблеми.

У четвертому розділі **“Аналіз та узагальнення результатів дослідження”** (с. 124–136) дисертант аналізує та подає узагальнену характеристику отриманих даних, які порівнює з описаними у літературі результатами досліджень інших авторів. Розділ проілюстровано узагальненою схемою оцінки біосинтетичного потенціалу актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*, відібраних та ідентифікованих автором, а також зображенням хімічної структури антибіотиків, продуценти яких виявлені в результаті використання різних підходів скринінгу, в т.ч. специфічних мікробних біосенсорів. Аналіз результатів, одержаних дисертантом, свідчить про повноту вирішення ним поставлених завдань, достовірність отриманих даних, їх наукову новизну та безумовну практичну цінність.

Висновки (с. 137–138). Сформульовано 7 висновків, які логічно випливають з одержаних результатів, науково обґрунтовані, відповідають меті та завданням дослідження.

Список використаних джерел (с. 139–173), який налічує 265 найменувань, серед яких велика кількість опублікованих за останні 5 років, сформовано в алфавітному порядку та оформлено за встановленим стандартом.

Рукопис завершується **додатками**. Додаток А містить список наукових праць, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації, та перелік наукових праць, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації. Додаток Б включає 2 таблиці з переліком ізолятів актиноміцетів, виділених з ризосфери *J. excelsa*, їхніх депозитарних номерів в базі даних GenBank та антимікробною активністю і штамів інших мікроорганізмів, використаних в роботі. У додатку В наведено склад поживних середовищ, у додатку Г перелічено праймери, використані в роботі, та подано їхню характеристику. Додаток Д містить 14 рисунків з результатами ЯМР-спектроскопії фурахіноцинів К та L.

Зауваження до дисертації. Подана дисертаційна робота свідчить про наукову зрілість дисертанта, його вміння бачити актуальні проблеми генетики, мікробіології, молекулярної біології, біотехнології і біології в цілому. Загалом, дисертаційна робота Тістечка С. І. за своїм змістом і формою є завершеним самостійним науковим дослідженням. Високо оцінюючи наукове і практичне значення дисертаційної роботи, можна висловити деякі зауваження та побажання:

1. На с. 5 наведено видові назви низки штамів, родові назви яких при першому згадуванні слід писати повністю (*P. savastanoi*, *S. lividans*, *B. subtilis*, *S. albus*).
2. У кінці розділу “Огляд літератури” бажано виокремити узагальнюючі висновки або підсумки до розділу, у яких слід, аналізуючи опрацьовану літературу, обґрунтувати наукову доцільність власної роботи.
3. Зауваженням до розділу “Матеріали та методи досліджень” є відсутність підрозділу з описом статистичної обробки результатів, у якому слід вказати, яким методом опрацьовували отримані дані, оцінювали їх достовірність, кількість повторів і паралельних постановок дослідів.
4. Вираз “актиноміцетні ізоляти” на с. 66–67, можливо, було б коректніше замінити на “ізоляти актиноміцетів”.
5. Дані результатів на діаграмах рис. 3.8 (с. 75), 3.9 (с. 76) та 3.10, а (с. 78) бажано представити зі стандартними відхиленнями ($\pm SD$) середнього значення (\bar{x}).
6. У примітках до таблиць 3.3 та 3.4 назви “вуглеців” доцільніше замінити на “карбонів”.
7. У тексті роботи є незначні орфографічні та пунктуаційні помилки, які дещо погіршують сприйняття наукової інформації.

Загалом, вищенаведені зауваження не зменшують наукову і практичну цінність роботи, яка є актуальним, багатограним, завершеним дослідженням, виконаним на високому науковому та методичному рівні.

Висновки про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Тістечка Степана Івановича “Актиноміцети ризосфери ялівцю високого *Juniperus excelsa* М.-Вієб.: генетичне різноманіття та біосинтетичні властивості” є завершеною науковою працею. Результати дисертаційної роботи достатньо повно відображені в публікаціях автора. Дисертація за змістом відповідає спеціальності 091 “Біологія”. Дисертаційна робота Тістечка С. І. за актуальністю проблеми, методичними підходами, обсягом, ґрунтовністю аналізу та інтерпретацією отриманих даних, повнотою викладу принципів наукових положень, достовірністю отриманих результатів, 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 дисертант, Тістечок Степан Іванович, з урахуванням виконання у повному обсязі освітньої складової освітньо-наукової програми та індивідуального плану наукової роботи, заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 “Біологія” зі спеціальності 091 “Біологія”.

Рецензент:

к.б.н., провідний науковий співробітник
НДЧ кафедри мікробіології
Львівського національного університету
імені Івана Франка, старший дослідник

Оксана МОРОЗ