

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

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертацію **Тістечка Степана Івановича**
**“Актиноміцети ризосфери ялівцю високого *Juniperus excelsa* M.-Vieb.: генетичне
різноманіття та біосинтетичні властивості”**
подану на здобуття ступеня доктора філософії
з галузі знань 09 — Біологія, за спеціальністю 091 — Біологія

Актуальність теми дисертації. Актуальність теми дисертаційної роботи обумовлена пошуком нових біологічно активних речовин, передовсім антимікробних, перспективним джерелом яких є ґрунтові мікроорганізми, зокрема, актиноміцети. На сьогодні спостерігають явище виникнення полірезистентних штамів патогенів, небезпечних для здоров'я людини в глобальних масштабах. Водночас, темпи відкриття чи створення нових ефективних антибіотиків із різних причин сповільнені. З іншого боку, зміни клімату та ріст народонаселення Землі зумовлюють потребу у достатньому забезпеченні харчовими продуктами належної якості, а тому — у підвищенні врожайності рослин та їхньої стійкості до інфекційних захворювань. Відповідно, сучасні наукові дослідження спрямовані на пошук нових ефективних біологічно активних сполук, а також їх продуцентів, у маловивчених екосистемах, прикладом яких можна вважати екосистеми території Кримського півострова. Недостатньо вивчений мікробіологічний склад і можливість продукування біологічно активних сполук ризосфери ялівцю високого (*J. excelsa*) на цій території. У своєму дисертаційному дослідженні С. І. Тестечок обґрунтовує і доводить актуальність досліджень різноманіття та потенціалу актиноміцетів цієї унікальної екосистеми. Вибір теми дослідження щодо цілком виправданий, а актуальність та своєчасність роботи не викликає сумніву.

Зв'язок дисертаційної роботи з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертаційні дослідження виконувалися в межах держбюджетних тем Бґ-203Н “Колекція культур мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка” (№ держреєстрації 0103U008453, договір №Н/309-2003 від 20.04.2015), Бґ-41Нр “Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічно активних речовин стрептоміцетами.” (№ державної реєстрації 0116U008070, 2016-2018 рр.), Бґ-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 дисертанта на кафедрі фармацевтичної біотехнології Саарландського університету (Німеччина, 2018, 2019-2021 рр.) за індивідуальними грантами FEMS (FEMS-GO-2017-001) та DAAD (№57440918).

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Основні наукові положення та висновки, сформульовані в дисертації, логічно випливають із одержаних результатів, вони достатньо обґрунтовані, відповідають поставленій меті та завданням дослідження.

Основні наукові результати, одержані автором, та їх новизна. Дисертант із використанням нових сучасних генетичних і молекулярно-біологічних методичних підходів здобув великий обсяг наукових результатів, що безсумнівно характеризуються новизною.

Вперше комплексно вивчено різноманіття актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова. Виконано філогенетичний аналіз і встановлено таксономічне

положення 372 ізолятів, що представлені 11 родами актиноміцетів. Серед ізолятів виявлено представників рідкісних родів, зокрема, вперше з біотопів України виділено *Actinorectispora* sp.. Виявлено широкий спектр антагоністичної (антибактерійної, протигрибкової) та потенційно фітостимулювальної (здатність до азотфіксації, синтез сидерофорів, ауксинів, солюбілізації фосфору) активності досліджуваних ізолятів; для окремих ізолятів встановлено здатність до продукування низки відомих антибіотиків.

Дисертантом вперше використано штам-біосенсор *S. lividans* ТК24 рМО16 для скринінгу тіопептидних антибіотиків серед природних ізолятів і, вперше на території Кримського півострова, виділено продуцентів тіопептидних берніаміцинів.

Здійснено відкриття двох нових нафтохінон-вмісних антибіотиків родини фурахіноцинів — фурахіноцини К та L, продукованих ізольованим штамом *Streptomyces* sp. Je 1-369. Вперше описано будову та біологічні властивості цих сполук, виявлено рідкісний ацетилгідразоновий елемент будови фурахіноцину L. Вперше виявлено поки єдиний фурахіноцин із антимікробною активністю. Запропоновано ймовірний шлях біосинтезу нових фурахіноцинів К та L; вперше описано генетичний кластер, ймовірно відповідальний за біосинтез фурахіноцинів.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів дослідження. Теоретична цінність наукових результатів представленої роботи полягає у детальному вивченні різноманіття ризосферних актиноміцетів маловивченого середовища *J. excelsa* Кримського півострова. Піонерні результати дослідження складу і біологічної активності виділених природних ізолятів актиноміцетів, наявність серед них родів, потенційно важливих для забезпечення здоров'я людини, ґрунтів і рослин, становлять теоретичне підґрунтя для їх подальшого практичного використання у медицині, ветеринарії та рослинництві. Отримані дані важливі також із огляду перспективності досліджень ризосферних мікроорганізмів рідкісних рослин унікальних місцезростань з метою виявлення потенційних продуцентів біологічно активних сполук. Визначені нуклеотидні послідовності окремих генів і цілих геномів актиноміцетів, досліджених у цій роботі, зареєстровано в міжнародних базах даних (зокрема, GenBank) із відкритим доступом для наукової спільноти.

Практичну цінність роботи з виявлення продуцентів промислово важливих антибіотиків, таких як антиміцини, спіраміцини, стамбоміцини, десерторміцини А, берніаміцини та лідикаміцини підтверджують два патенти України на винахід. Відкриття та встановлення будови нових антибіотиків – фурахіноцинів, теж має як практичне, так і фундаментальне значення. Виявлення рідкісного фрагменту ацетилгідразону у будові молекули фурахіноцину L., брак інформації щодо генів залучених у його синтез, є передумовою використання продуцента цього антибіотика як платформи для дослідження механізмів утворення гідразоновмісних природних сполук, і способів модифікування будови відомих антибіотиків.

Створена колекція антибіотико-продуцентів важлива для розробки повного циклу промислового виробництва антибіотиків в Україні, а це зміцнення безпеки в галузі охорони здоров'я.

Окрім цього, експериментальні дані й апробовані методики досліджень можуть бути використані у науковій роботі та викладанні навчальних дисциплін на біологічному факультеті Львівського національного університету імені Івана Франка, а також інших освітніх та наукових установ.

Апробація результатів дисертації, повнота викладу основних положень, висновків і рекомендацій. Основні наукові результати та висновки дисертації апробовані на численних міжнародних наукових зібраннях та опубліковані у фахових наукових виданнях. Зокрема, за результатами дисертаційної роботи опубліковано 19 наукових праць, серед яких: 4 статті у міжнародних виданнях індексованих у наукометричних базах Scopus та WoS (Q1- Q3), стаття в фаховому виданні України категорії А, індексованого у Scopus, і 3 статті у фахових

виданнях України категорії Б; а також 2 патенти України на винахід; 9 тез доповідей на наукових конференціях та симпозиумах.

Сукупність 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 на тему «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 оригінальний, 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 на 204 сторінках українською мовою, основна частина складає 139 сторінок. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел і додатків. Рукопис містить список цитованої літератури до якого входять 265 найменувань, серед яких 18 кирилицею та 247 латиницею, 39 рисунків і 7 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** (стор. 22-28) обґрунтовано актуальність обраної теми, 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**» (стор. 29-50) розглянуто дані наукових публікацій щодо пошуку нових антибіотичних сполук і їх продуцентів серед актиноміцетів. Наведено дані успішних стратегій скринінгу актиноміцетів, такі як оптимізація середовища культивування, використання активаторів біосинтезу, мікробних біосенсорів та поєднання різних підходів для всебічного скринінгу окремих штамів. Також проаналізовано дані літератури щодо вивчення нових середовищ існування актиноміцетів, зокрема морських, екстремальних та ендоефітних екосистем, як джерела збагачення їх різноманіття. Обговорюється використання геномного видобутку для ідентифікації нових кластерів біосинтезу природних сполук та їхнього експериментального підтвердження. Зазначено, що дослідження нових актиноміцетів із невивчених біотопів, таких як, наприклад, Кримський півострів, можуть сприяти пошуку нових антибіотичних сполук. Проведений аналіз даних літератури дозволив здобувачу зробити висновок про пріоритетність обраного напрямку наукової роботи.

У другому розділі «**Матеріали та методи досліджень**» (стор. 51-63) описано детальну методику досліджень, яка відповідає меті та завданням дисертаційної роботи. Представлена узагальнена інформація про етапи, об'єкти, методи та обсяг досліджень. У цьому розділі детально описані методи, які доповнено матеріалом Додатків Б, В, Г.

У третьому розділі «**Результати досліджень**» (стор. 64-123) показано результати дослідження філогенії та біосинтетичного потенціалу 372 ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* з використанням культуральних підходів, їх антибіотичної та потенційної фітостимулювальної активності. Наведено дані виявлених за допомогою біосенсорних систем продуцентів тіопептидних, пептидоглікан синтез інгібуючих та інших антибіотиків, відкриття будови і властивостей нових фурахіноцинів К та Л продукованих ізолятом *Streptomyces* sp. Je 1-369; ідентифікації та аналізу біосинтетичного кластеру генів для утворення фурахіноцинів. Кожен підрозділ роботи завершується логічними підсумками та переліком публікацій дисертанта, у яких опубліковані представлені результати. Загалом, отримані результати досліджень наведено у 7 таблицях та 34 рисунках.

У четвертому розділі «**Аналіз та узагальнення результатів дослідження**» (стор. 124-136) дисертант аналізує отримані результати роботи, а також дає оцінку перспективності подальшого вивчення мікробіоти Кримського півострова та інших унікальних біотопів для пошуку нових біоактивних речовин.

Висновки (стор. 137-138) Сформульовано 7 лаконічних висновків, які логічно впливають з одержаних результатів, науково обґрунтовані, відповідають меті та завданням дослідження.

Список використаних джерел (стор. 139-173) сформований в алфавітному порядку, оформлений за встановленим стандартом, засвідчує, що під час роботи проаналізовано сучасні дані наукових досліджень.

Рукопис завершується **додатками А-Д**, що містить список опублікованих праць за темою дисертації, перелік наукових праць, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації (А), а також Перелік штамів мікроорганізмів, використаних у роботі (Б); склад поживних середовищ (В); праймери, використані в роботі та їхня характеристика (Г) і ЯМР-спектри та інші характеристики відкритих фурахіноцинів К і Л (Д).

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

- До «Переліку умовних скорочень» доцільно внести скорочення **БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ СПОЛУКИ** або речовини (БАР), оскільки в тексті цей термін трапляється дуже часто.
- Щодо завдання 3. Дослідити фітостимулювальні властивості досліджуваних ізолятів і відповідного підрозділу в Результатах... ; у роботі досліджено здатність до синтезу ауксиноподібних сполук індольної природи, які дають забарвлення із реактивом Сальковського. Реакція не є специфічною для ІОК, тому вважаємо не цілком правильним твердження про здатність ізолятів синтезувати саме цей ауксин. А вже ідентифікування ІОК жодним чином не проводили, хоча це цілком можливо, навіть за допомогою звичайної ТШХ. В літературі використовують термін IRS – indol-related substances. На загал, фітостимулювальні властивості в цьому випадку не доведені, оскільки експериментів із рослинами не проводили. Дисертант може стверджувати лише про потенційну фітостимулювальну здатність досліджених ізолятів.
- У роботі в Розділі «Об'єкт та методи досліджень» відсутній опис методики відбору зразків ризосферного ґрунту, використаного для виділення мікроорганізмів.
- Розділ «Аналіз та узагальнення» варто доопрацювати і поєднати в єдину схему не лише підходи, а й окремим рисунком представити найвагоміші результати оцінки біосинтетичного потенціалу ризосферних актиноміцетів *J. excelsa*, виокремивши ізоляти, які становлять практичний інтерес.

Однак, вищенаведені зауваження не впливають на високу науково-практичну цінність роботи і загальну високу позитивну оцінку дисертації, а тому не є перешкодою для її представлення до одноразової спеціалізованої вченої ради для офіційного захисту.

Висновки про відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертаційна робота Тістечка Степана Івановича на тему «**АКТИНОМЦЕТИ З РИЗОСФЕРИ ЯЛВЦЮ ВИСОКОГО *JUNIPERUS EXCELSA* М.-ВІЕВ.: ГЕНЕТИЧНЕ РІЗНОМАНІТТЯ ТА БІОСИНТЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ**», 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 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 з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

РЕЦЕНЗЕНТ:

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

Наталія РОМАНЮК