

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

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника, завідувачої відділом загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
БІЛЯВСЬКОЇ ЛЮДМИЛИ ОЛЕКСІЇВНИ

на дисертаційну роботу Тістечка Степана Івановича на тему «АКТИНОМІЦЕТИ РИЗОСФЕРИ ЯЛІВЦЮ ВИСОКОГО *JUNIPERUS EXCELSA* М.-ВІЕВ.: ГЕНЕТИЧНЕ РІЗНОМАНІТТЯ ТА БІОСИНТЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ»,
представлену на здобуття ступеня доктора філософії
з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертаційного дослідження

Швидке та неконтрольоване поширення патогенних мікроорганізмів із множинною стійкістю до антибіотиків є серйозною проблемою для глобальної охорони здоров'я. Ця ситуація створює нагальні виклики для світової спільноти, оскільки загрожує знищенню досягнутого прогресу у боротьбі з інфекційними захворюваннями. Зростаюча кількість мультирезистентних патогенів підкреслює необхідність пошуку інноваційних стратегій для подолання цієї проблеми. Актиноміцети здатні продукувати різноманітні біологічно активні вторинні метаболіти, які використовують у медицині, ветеринарії та сільському господарстві. Зокрема, їхній потенціал як продуцентів антибіотиків визнаний в боротьбі з інфекційними, онкологічними та іншими захворюваннями. Необхідність подальших досліджень цих бактерій стає особливо актуальною в контексті сповільнення темпів відкриття нових антибіотиків. Дослідження нових та недостатньо вивчених середовищ існування мікроорганізмів, якою є територія України, дозволить виявити нові аспекти мікробного біорізноманіття та сприятиме розширенню наших знань про потенційних продуцентів нових антибіотиків. Це може привести до відкриття нових джерел корисних біологічно активних сполук і зробити свій внесок в подальший розвиток нових

антибіотичних препаратів, що є критично важливим в контексті глобального здоров'я та боротьби зі загрозою мультирезистентних інфекцій.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційну роботу виконано на базі структурного підрозділу Колекція культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків (ККМПА), 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), Бг-41Нр «Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічно активних речовин стрептоміцетами» (№ державної реєстрації 0116U008070), Бг-09Ф «Мутації стійкості актинобактерій до антибіотиків: джерело нових уявлень про механізми резистентності та біотехнологічних знарядь» (№ державної реєстрації 0120U102039). 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).

Новизна наукових досліджень та їхня значущість для науки

У дисертаційній роботі вперше проведено комплексний аналіз філогенетичного різноманіття та біосинтетичного потенціалу актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова. Зокрема, здійснено філогенетичний аналіз 372 ізолятів актиноміцетів, які представлені 11 родами (*Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* та *Streptomyces*). Вперше на території України виділено представника дуже рідкісного роду актиноміцетів *Actinorectispora*, який на сьогодні налічує лише два види. Визначено їхню здатність продукувати антимікробні сполуки проти спектру тест-культур, та досліджено їхні фітостимулювальні властивості. Крім того, у дисертаційній роботі вперше використано мікробний біосенсор *S. lividans* ТК24 рМО16 для скринінгу продуцентів тіопептидних антибіотиків серед природних ізолятів актиноміцетів. В результаті чого, вперше на території Кримського півострова виділено продуцентів тіопептидних антибіотиків бернінаміцинів – *Streptomyces* sp. Je 1-79 та Je 1-613.

Здійснено метаболічне профілювання низки природних ізолятів актиноміцетів, що привело до виявлення продуцентів антибіотиків десерторміцину 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). А також ідентифіковано два нових

нафтохінонвмісних антибіотиків - фурахіноцини 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, фурахіоцин із антимікробною активністю. Запропоновано ймовірний шлях біосинтезу нових фурахіоцинів К та L.

Практичне значення отриманих результатів

Отримані результати демонструють потенціал природних ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*, як продуцентів широкого спектру біологічно активних сполук, які мають практичне значення у сферах фармацевтики, біотехнології та агрономії. У дослідженій колекції природних ізолятів актиноміцетів виявлено продуцентів промислово важливих антибіотиків антиміцинів та спіраміцинів, а також антибіотиків бернінаміцинів та лідикаміцинів, що підтверджено двома патентами України на винахід. Крім того, ідентифіковані в роботі нові антибіотики фурахіоцини, мають не лише практичне, а й фундаментальне значення, оскільки, у структурі фурахіоцину L міститься рідкісний фрагмент ацетилгідразону. Формування цього фрагменту на сьогодні є недостатньо вивченим. Таким чином, фурахіоцин L може розглядатись як об'єкт для вивчення принципів формування гідразоновмісних природних сполук. Не менш важливе практичне значення ця робота має і для освітнього процесу. Результати дослідження можуть бути використані при викладанні студентам природничих спеціальностей.

Обсяг і структура дисертації

Дисертація містить такі розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати досліджень», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних джерел» та «Додатки». Дисертацію викладено на 204 сторінках друкованого тексту і проілюстровано 39 рисунками та 7 таблицями. Список літератури включає 265 найменувань.

У **Вступі** розкрита суть проблеми, актуальність та важливість теми, визначені мета і завдання дослідження, описані об'єкт, предмет і методи досліджень, висвітлені наукова новизна роботи, практичне значення та власний внесок дисертанта, перераховані публікації та представлена інформація про апробацію результатів дисертаційного дослідження.

У розділі **Огляд літератури** дисертант наводить аналіз наукових праць, спрямованих на вивчення аспектів, пов'язаних із його дослідженням. Перший підрозділ цього розділу висвітлює загальну характеристику актиноміцетів. В наступному підрозділі надається детальний огляд ролі цих мікроорганізмів у

синтезі біологічно активних сполук. Розділ завершується детальним розглядом стратегій скринінгу нових біологічно активних сполук мікробного походження. У цьому підрозділі дисертації висвітлюються різноманітні підходи до скринінгу, які можуть призвести до виявлення нових біологічно активних сполук. Зокрема, дисертант розглядає один з таких підходів, а саме дослідження нових середовищ існування, для ідентифікації та характеристики нових природних сполук. Це дозволяє встановити тісний зв'язок між теоретичними знаннями та практичним використанням скринінгових методів для отримання цінних результатів у сфері біологічно активних сполук.

Розділ **Матеріали та методи досліджень** включає в себе опис використаних мікроорганізмів, середовищ і умов їхнього культивування. Методи досліджень детально описано, з урахуванням використання приладів та параметрів, за якими проводилися експерименти. Важливим аспектом цієї роботи є використання методів біоінформатичного аналізу, що дозволило оцінити отримані результати та порівняти їх з наявними в базах даних у всьому світі. Крім того, дисертант подає докладний опис хімічного аналізу екстрактів вторинних метаболітів та методів очищення нових сполук. Загалом, використані методи в цьому дослідженні свідчать про високий рівень методологічної компетентності дисертанта.

У розділі **Результати досліджень** наведено комплексний аналіз актиноміцетів ризосфери ялівцю високого. Дисертант розкриває їхню філогенію та потенціал у виробництві антибіотичних сполук, визначаючи їхню ефективність проти різних тест-культур бактерій та грибів. Також, один з розділів присвячений дослідженню потенційних фітостимулювальних властивостей актиноміцетів. Ці дослідження розширюють спектр використання цих штамів в майбутньому. Крім того, у роботі використано специфічні мікробні біосенсорні системи для направленою скринінгу певних типів сполук, які привели до виявлення продуцентів берніаміцинів, лідикаміцинів та памаміцинів. Серед ізолятів актиноміцетів дисертантом було відібрано ізолят Je 1-369, який демонстрував широкий спектр антагоністичних властивостей. Здійснений дисертантом детальний аналіз метаболітів цього ізоляту привів до ідентифікації двох нових нафтохінонвмісних антибіотиків, які дисертант назвав фурахіноцин К та L, продовживши ряд вже описаних фурахіноцинів. Дисертант здійснив низку досліджень із цим штамом та ідентифікував кластер генів, який ймовірно продукує ці сполуки та передбачив їхній імовірний шлях біосинтезу. Результати цього розділу проілюстровані 34 рисунками та 7 таблицями, що належним чином демонструють отримані відомості. Кожен підрозділ результатів завершується проміжними висновками, а також представлені публікації, в яких

були опубліковані результати даного підрозділу, що додає вагу та авторитет отриманим результатам.

У розділі **Аналіз та узагальнення результатів дослідження** дисертант проводиться аналіз отриманих результатів, їхнє порівняння з вже існуючими науковими даними, а також виявляє закономірності та тенденції. Дисертант ретельно аналізує виявлені властивості антибіотиків, продуцентів яких було ідентифіковано у попередньому розділі. Особлива увага приділяється їхньому потенціалу у боротьбі з патогенами, а також можливості їхнього використання у медицині чи сільському господарстві. Під час узагальнення результатів, дисертант висуває гіпотези та робить висновки, спираючись на об'єктивні наукові факти. Окрема увага приділяється визначенню того, як отримані результати вписуються в сучасну наукову картину світу та як вони можуть бути використані для подальших досліджень та практичних застосувань. Крім того, аналізується набір даних, які можуть слугувати основою для подальших наукових публікацій та розвитку відповідної галузі науки.

Загальні **Висновки** у дисертаційній роботі відповідають поставленій меті і завданням. У них показані головні здобутки роботи.

Повнота викладу результатів дисертаційної роботи та наукових положень в наукових публікаціях за темою дисертації

Основні результати дисертації були апробовані на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях, а також представлені в публікаціях у фахових наукових виданнях. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 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 наукометричних базах Scopus та Web of Science та 3 статті у фахових виданнях України категорія Б. Також, дисертант отримав 2 патенти України на винахід. Матеріали дисертаційного дослідження були представдені 9 тезами доповідей на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях та симпозиумах.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності

У дисертаційній роботі не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації чи фальсифікації. Для всіх публікацій у співавторстві чітко зазначено особистий внесок дисертанта. Дисертація представляє собою самостійне наукове дослідження, в якому висвітлені ідеї та результати досліджень дисертанта. Використані в дослідженні ідеї та положення інших науковців належним чином відзначені посиланнями та використані з метою підкріплення ідей автора.

Пропозиції та зауваження до дисертаційної роботи

Під час детального ознайомлення з дисертацією С.І. Тістечка, не виявлено жодних суттєвих зауважень щодо змісту та наукової значущості роботи.

Однак, під час опрацювання тексту дисертації виникли деякі запитання та уточнюючі питання:

1. На рис. 3.7 (ст. 71) варто було б додати по декілька представників відповідних родів, це б показало філогенетичну взаємодію ізолятів в межах відповідного роду.
2. Як взаємодія різних властивостей (синтез антимікробних сполук, продукція фітогормонів та інші) може зробити ізоляти актиноміцетів перспективними для використання в сільському господарстві?
3. Чи є перспектива у застосуванні ізоляту *Streptomyces* sp. Je 1-651, як можливого промислового продуцента спіраміцинів?
4. Для очистки фурахіноцинів ви використали три методи, це нормально-фазова хроматографія з використанням колонки з силікагелем; ексклюзійна хроматографія, в колонці з сефадексом; та семі-препаративна ВЕРХ. Які були критерії вибору саме цих методів?
5. Сполуки фурахіноцини К та L мають яскраві кольори, у випадку К жовтого кольору, а L – червоного. Як відомо природні сполуки насичених яскравих кольорів не завжди стабільні коли на них впливає денне світло. Чи перевіряли ви ідентифіковані фурахіноцини на стабільність?

Ці недоліки не зменшують наукового внеску роботи та її важливості. В цілому, дисертація вражає своєю глибиною аналізу та новизною підходів, що свідчить про високий рівень наукової роботи автора.

Загальна оцінка роботи і висновок

Ретельний аналіз дисертаційної роботи дає підстави вважати, що дослідження Тістечка Степана Івановича є завершеними, цілісними і самостійними. За зазначеною актуальністю, обсягом експериментального матеріалу, новизною, науковим і практичним значенням, рівнем застосованих методологічних підходів дисертаційна робота «Актиноміцети ризосфери ялівцю високого *Juniperus excelsa* M.-Bieb.: генетичне різноманіття та біосинтетичні властивості» відповідає встановленим вимогам «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, та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України від 12 січня 2017 року № 40, які пред'являються до дисертаційних робіт на здобуття ступеня доктора філософії. Враховуючи вищезазначене, Тістечок Степан Іванович заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
завідуюча відділом загальної та
грунтової мікробіології
Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України

Людмила БІЛЯВСЬКА

Підпис д.б.н., ст.наук. співроб. завідділу Людмили БІЛЯВСЬКОЇ засвідчую.

Вчений секретар
Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України
к.б.н.

Олена АНДРІЄНКО