РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу **Мушинської Вікторії Станіславівни** на тему: «**Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus* sp. SB12**», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія», галузь знань 09 «Біологія», що подана в разову спеціалізовану вчену раду ДФ 35.368.013 Інституту біології тварин НААН.

Актуальність теми дисертаційної роботи. Актуальність теми дисертаційної роботи зумовлена необхідністю пошуку безпечних та ефективних альтернатив антибіотикам в умовах глобального поширення антибіотикорезистентності, а також потребою у створенні нових пробіотичних препаратів із науково доведеними функціональними властивостями. Особливої уваги в цьому контексті набувають представники роду «*Enterococcus*», які, з одного боку, характеризуються вираженим пробіотичним і біотехнологічним потенціалом, здатністю синтезувати бактеріоцини та інші біологічно активні сполуки, а з іншого — потребують ретельної оцінки безпечності через можливу наявність факторів вірулентності та антибіотикорезистентності.

У своїй дисертаційній роботі Вікторія Мушинська зосередила свої дослідження на комплексній характеристиці нового штаму *Enterococcus* sp. SB12, виділеного з традиційного харчового продукту, із застосуванням сучасних геномних, біоінформатичних, мікробіологічних, метагеномних та біохімічних підходів. Проведене дослідження дозволило оцінити генетичні детермінанти безпечності штаму, його здатність до синтезу бактеріоцинів та інших біоактивних метаболітів, а також встановити особливості впливу на мікробіоту кишечника та фізіолого-біохімічні показники організму господаря.

Отримані результати мають особливу актуальність і своєчасність у контексті розроблення нових пробіотичних препаратів для потреб тваринництва та ветеринарної медицини, зменшення використання антибактеріальних засобів і профілактики дисбіотичних станів. Дисертантка переконливо доводить та

обґрунтовує значущість проведених досліджень, що підтверджує як фундаментальну, так і прикладну цінність обраної теми дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертаційну роботу виконано в лабораторії біотехнології та відтворення клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН у межах науково-дослідної роботи «Дослідити пробіотичний потенціал нового штаму бактерій *Enterococcus* sp. SB12 для підвищення адаптаційної здатності тварин до впливу кліматичних чинників» (номер державної реєстрації 0124U001989). Крім того, окремі етапи досліджень були реалізовані в рамках міжнародних грантових проєктів UASEEDs_P3_CoD10_12 «Biotechnological preparations – an alternative to antibiotics in animal husbandry», що фінансувався Європейським Союзом у межах European Innovation Council, а також індивідуального гранту FEMS (Application ID 5385) за проєктом, присвяченим ідентифікації та характеристиці бактеріоцинів штаму *Enterococcus* sp. SB12.

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 і є достатньо обґрунтовані, відповідають поставленій меті та завданням дослідження.

Основні наукові результати, одержані автором, та їх новизна. Дисертанткою вперше здійснено повногеномне секвенування та детальну характеристику геному штаму *Enterococcus* sp. SB12, виділеного з традиційної карпатської бринзи. Встановлено наявність у його геномі п'яти кластерів генів бактеріоцинів (ентероцини A, P, SE-K4, L50a та ентеролізин A), що визначають високий антимікробний потенціал досліджуваного штаму.

Важливим науковим результатом є проведення комплексної оцінки безпечності штаму шляхом аналізу генетичних детермінант антибіотикорезистентності та факторів вірулентності. На підставі отриманих даних встановлено відсутність плазмід-асоційованих генів резистентності та підтверджено низький ризик горизонтального перенесення небажаних генетичних детермінант.

Вперше для штаму *Enterococcus* sp. SB12 проведено комплексне дослідження метаболічного потенціалу, в результаті якого охарактеризовано його вітамінний та амінокислотний склад, а також виявлено низку біологічно активних вторинних метаболітів, що можуть бути залучені до реалізації пробіотичних властивостей мікроорганізму.

Наукову новизну становлять результати досліджень *in vivo*, якими показано, що тривале введення штаму лабораторним мишам не спричиняє негативних змін фізіолого-біохімічних показників організму та не порушує оксидативно-антиоксидантний баланс. За допомогою метагеномного аналізу вперше встановлено здатність штаму *Enterococcus* sp. SB12 позитивно модулювати склад кишкової мікробіоти, сприяючи збільшенню чисельності представників корисної мікрофлори та зменшенню частки умовно-патогенних мікроорганізмів.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів дослідження. Отримані результати дисертаційної розширюють наукові знання щодо біосинтетичного потенціалу ентерококів, механізмів їх антагоністичної активності, а також впливу пробіотичних штамів на структуру кишкової мікробіоти та фізіолого-біохімічний стан організму господаря. Важливе теоретичне значення мають результати повногеномного аналізу штаму *Enterococcus* sp. SB12, які доповнюють сучасні дані про генетичні детермінанти безпечності та пробіотичних властивостей представників роду *Enterococcus*.

Практичне значення одержаних результатів полягає в науковому обґрунтуванні перспектив використання штаму *Enterococcus* sp. SB12 як основи для створення нових пробіотичних препаратів та кормових добавок. Встановлені антагоністичні властивості штаму, його здатність продукувати біологічно активні метаболіти, а також підтверджена безпечність за результатами досліджень *in vitro* та *in vivo* свідчать про можливість його практичного застосування у тваринництві як альтернативи кормовим антибіотикам. Важливим практичним результатом є депонування повногеномної послідовності штаму в міжнародній базі даних NCBI, що створює підґрунтя для подальших геномних, біотехнологічних та прикладних досліджень. Отримані результати можуть бути використані при

розробленні нових пробіотичних препаратів, удосконаленні технологій виробництва кормових добавок, а також у навчальному процесі закладів вищої освіти біологічного та ветеринарного профілю.

Апробація результатів дисертації, повнота викладу основних положень, висновків і рекомендацій. Основні наукові результати та висновки дисертації апробовані на численних міжнародних та українських наукових конференціях, а також опубліковані у фахових наукових виданнях. Зокрема, за результатами дисертаційної роботи опубліковано 10 наукових праць, серед яких: 2 статті у міжнародних виданнях індексованих у наукометричних базах Scopus та WoS (Q2- Q3), 1 стаття у фаховому виданні України категорії Б; а також 7 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях.

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 Вікторії Мушинської на тему ««Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus* sp. SB12» не виявлено ознак академічного плагіату, фальсифікації чи інших порушень, що могли б поставити під сумнів самостійний характер виконання дисертанткою 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 119 сторінках друкованого тексту, ілюстровано 27 рисунками та 9 таблицями. Робота містить анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати власних досліджень, аналіз та

узагальнення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел і додатки. Список використаної літератури налічує 377 найменувань, з яких 372 джерела подано латиницею.

Дисертаційна робота розпочинається з анотації, поданої українською та англійською мовами, а також переліку ключових слів і списку публікацій за темою дослідження. В анотації стисло відображено основні результати роботи, її наукову новизну та практичне значення.

У **Вступі** (стор. 20-26) обґрунтовано актуальність теми дослідження, сформульовано мету та завдання роботи, визначено об'єкт і предмет дослідження, описано методологічну базу, наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, наведено відомості щодо апробації результатів та особистого внеску здобувача.

Перший розділ – **«Огляд літератури»** (стор. 27-52) присвячено аналізу сучасних наукових даних щодо бактерій роду *Enterococcus*, їх екологічної ролі, фізіолого-біохімічних властивостей, а також подвійної природи ентерококів як потенційних пробіотиків і опортуністичних патогенів. Окрему увагу приділено бактеріоцинам, пробіотичному потенціалу та питанням безпечності штамів.

Другий розділ – **«Матеріали та методи досліджень»** (стор. 53-67) містить детальний опис використаних у роботі матеріалів, експериментальних моделей та методів дослідження. Представлено підходи до повногеномного секвенування штаму *Enterococcus* sp. SB12, біоінформатичного аналізу геному, мікробіологічних, фізико-хімічних, метаболічних, метагеномних та біохімічних методів дослідження, а також методів статистичної обробки даних.

Третій розділ – **«Результати досліджень»** (стор. 68-118) включає комплексну характеристику штаму *Enterococcus* sp. SB12. Представлено результати повногеномного аналізу, виявлення генів, пов'язаних із синтезом бактеріоцинів та вторинних метаболітів, антибіотикорезистентністю та факторами вірулентності, а також оцінку його антагоністичної активності. Окремо наведено дані щодо стійкості штаму до екстримальних факторів середовища, його метаболічного потенціалу (включно з синтезом вітамінів і біоактивних сполук), а також результати *in vivo* експериментів на лабораторних

мишах, що демонструють вплив штаму на мікробіоту та фізіолого-біохімічні показники організму.

Четвертий розділ – **«Аналіз та узагальнення результатів досліджень»** (стор. 119-138) стор. містить порівняння отриманих результатів із сучасними науковими даними, узагальнення встановлених закономірностей та інтерпретацію отриманих результатів у контексті сучасних уявлень про пробіотичні властивості ентерококів.

У розділі **«Висновки»** (стор. 139-141) сформульовано 7 узагальнених висновків, що логічно випливають із результатів дослідження та відповідають поставленій меті й завданням.

Список використаних джерел (стор. 142-194) оформлено відповідно до встановлених вимог і відображає сучасний стан досліджень у галузі пробіотичної мікробіології та геноміки ентерококів.

Рукопис завершується **додатками А-Г**, містить список інших штамів мікроорганізмів, використаних у дослідженні (А); склад поживних середовищ (Б); характеристику умов за яких були отримані екстракти вторинних метаболітів штаму (В) та їх хроматограми (Г).

Зауваження до дисертації. Дисертаційна робота за своїм змістом і формою є завершеним самостійним науковим дослідженням, що вказує на зрілу наукову обізнаність Вікторії Мушинської, її вміння самостійно проводити дослідження та інтерпретувати отримані результати. Високо оцінюючи наукове і практичне значення дисертаційної роботи, хочу висловити деякі зауваження та побажання:

- Стор. 21–24 (Вступ, мета та практичне значення) - У роботі декларується перспективність використання штаму в тваринництві, однак усі дослідження *in vivo* виконані лише на мишах. Виникає питання: чому саме миші були обрані моделлю для оцінки пробіотичного потенціалу штаму, якщо кінцеві перспективи застосування можуть бути значно ширшими? Пропоную додати кілька речень із поясненням вибору моделі та її обмежень. Наприклад, зазначити, що миші використовувались як стандартизована модель первинної оцінки безпечності та фізіологічних

ефектів, тоді як видоспецифічні дослідження потребують окремого вивчення.

- У розділі «Наукова новизна» зазначено:...доведено генетичну безпеку штаму SB12 шляхом встановлення виключно хромосомної локалізації детермінант...» Однак у попередніх розділах вказано на наявність численних мобільних елементів, профагів та потенціалу горизонтального переносу генів. Термін «доведено генетичну безпеку» звучить занадто категорично. Пропоную замінити на більш обережне формулювання: «отримані результати свідчать про низький ризик горизонтального переносу виявлених детермінант...» або «не виявлено ознак високого ризику передачі досліджених детермінант». Це зробить висновки більш науково виваженими.
- Ст. 76–81; 94–99 - Авторка робить висновки щодо потенційної колонізації та пробіотичних властивостей штаму, однак відсутні класичні *in vitro* тести адгезії (гідрофобність поверхні, автоагрегація, коагрегація або адгезія до клітинних культур). Особливо це важливо для ентерококів, де адгезини можуть бути одночасно пов'язані як із пробіотичністю, так і з вірулентністю. Пропоную: у розділі «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» прямо зазначити це як обмеження дослідження: «оцінка адгезивних властивостей потребує подальшого вивчення із застосуванням відповідних моделей».
- Ст. 132: «Таким чином, було виявлено значний позитивний вплив штаму *Enterococcus* sp. SB12 на мікробіом травного тракту мишей, що підтверджує його потенціал як можливого пробіотика». - У наведеному реченні використано термін «мікробіом травного тракту», однак у дослідженні аналізували мікробіом вмісту кишечника, а не всього травного тракту. Тому коректніше використовувати формулювання «мікробіом кишечника» або «кишкова мікробіота».
- У тексті трапляються поодинокі помилки, які бажано виправити: Ст. 19: «ЛПВЩ – ліпопротеїни високої щіллності» - правильно з однією «л»; Ст. 19: КУО – «колонієутворюючі одиниця» - правильно: «колонієутворюючі

одиниці»; Ст. 25: «проналізувала метагеном кишківника лабоаторних мишей» - пропущено букву «р» в слові; Ст. 26: «377 найменуваннь» - правильно з однією «н»; Ст. 68 – назва розділу не розташована відповідним чином; сторінки підрозділів 3.3.1 та 3.3 вказані не зовсім послідовно (91 та 94); Ст.99-100 – назви вітамінів та амінокислот в таблицях слід перекласти з англійської на українську мову; Ст.106 – підписи на діаграмі слід перекласти з англійської на українську мову; Ст. 113 – висновки не пронумеровано в послідовному порядку і подано в табличній формі.

Попри це, робота є сильною з точки зору сучасних підходів до характеристики пробіотичних штамів: поєднання повногеномного аналізу, фенотипової оцінки, дослідження вторинних метаболітів та експерименту *in vivo* є безумовною перевагою дисертації.

Викладені зауваження не стосуються методичних прорахунків чи помилок в проведенні досліджень дисертанткою, при глибокому аналізі дисертації таких – не виявлено. Зауваження стосуються роз'яснень результатів та кращого їх сприйняття, тому не впливають на високу науково-практичну цінність роботи, загальну позитивну оцінку дисертації і не є перешкодою для її представлення до одноразової спеціалізованої вченої ради для офіційного захисту.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня доктора філософії. Дисертація Вікторії Станіславівни на тему: «Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus* sp. SB12» відповідає вимогам до оформлення дисертації, затвердженим Наказом Міністерства освіти і науки від 12 січня 2017 року № 40 (зі змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства освіти і науки України № 759 від 31.05.2019 р.) та «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, з урахуванням змін згідно Постанови Кабінету Міністрів України від 03.05.2024, № 507, а її авторка Мушинська Вікторія Станіславівна заслуговує

на присудження наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія», за спеціальністю 091 «Біологія».

Рецензент:

кандидат сільськогосподарських наук,
виконуючий обов'язки Вченого секретаря
старший науковий співробітник
лабораторії екологічної фізіології та якості продукції
Інституту біології тварин НААН **Андрій ПИЛИПЕЦЬ**

Підпис к. с.-г. н. ПИЛИПЦЯ А. З. засвідчую,
Провідний фахівець з кадрів
Інституту біології тварин НААН
к. с. -г. н. **Ірина НЕВОСТРУЄВА**