

## ВИСНОВОК

### ПРО НАУКОВУ НОВИЗНУ, ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

*Мушинської Вікторії Станіславівни*

**здобувача ступеня доктора філософії**

*«Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу  
штаму *Enterococcus* sp. SB12»*

**за спеціальністю 091 Біологія**

**(галузь знань 09 Біологія)**

**Актуальність теми дисертації.** Використання пробіотиків у тваринництві та медицині, як безпечна та екологічно обґрунтована альтернатива антибіотикам є передовою стратегією в умовах глобального поширення антибіотикорезистентності. Сучасні уявлення про функціональні властивості пробіотичних мікроорганізмів змістили акцент з їх антагоністичних властивостей щодо патогенів на системну модуляцію метаболізму та підтримку гомеостазу господаря. Одним із ключових механізмів такого впливу є регуляція оксидантно-антиоксидантної рівноваги та зниження інтенсивності окисного стресу. Пробіотичні мікроорганізми здатні нейтралізувати активні форми кисню завдяки синтезу антиоксидантних ензимів і низькомолекулярних захисних сполук, що визначає їхню потенційну біологічну безпечність та функціональну цінність.

Серед молочно-кислих бактерій особливу увагу привертає *Enterococcus faecium* – типовий представник кишкової мікробіоти ссавців, який характеризується високою стійкістю до кислотності шлункового соку, жовчних солей і температурних коливань. Важливою цінністю штамів *Enterococcus faecium* є здатність синтезувати біологічно активні сполуки, зокрема бактеріоцини (ентероцини) – рибосомно синтезовані антимікробні пептиди. Бактеріоцини можуть пригнічувати розвиток патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, модулювати склад кишкового мікробіому та підсилювати потенціал штамів-продуцентів, водночас будучи безпечними для споживання

продуктами білкового походження.

Водночас ентерококи характеризуються подвійним біологічним значенням. Поряд з технологічною і пробіотичною цінністю окремі представники роду *Enterococcus* належать до опортуністичних патогенів і можуть бути носіями факторів вірулентності та антибіотикорезистентності. Відсутність для ентерококів статусів QPS і GRAS, а також значна штамова варіабельність генетичних детермінант безпечності зумовлюють необхідність ретельної індивідуальної оцінки кожного ізоляту перед його потенційним застосуванням.

Отже, актуальність даного дослідження зумовлена необхідністю комплексної оцінки безпечності та функціонального потенціалу нових штамів *Enterococcus faecium* як перспективних пробіотичних агентів чи промислово важливих продуцентів. Комплексне дослідження від аналізу геному штаму через його функціональну та метаболічну оцінку до безпосереднього впливу на організм лабораторних тварин дозволяє не тільки довести безпечність його використання, а й оцінити його біотехнологічний потенціал та технологічні переваги в якості промислового продуцента для виробництва ферментованих продуктів.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана в лабораторії біотехнології відтворення Інституту біології тварин НААН та на базах Колекції мікробних культур продуцентів антибіотиків та кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках науково-дослідної роботи 43.00.02.10.П «Дослідити пробіотичний потенціал нового штаму бактерій *Enterococcus* sp. SB12 для підвищення адаптаційної здатності тварин до впливу кліматичних чинників» (номер державної реєстрації – 0124U001989) та 27.00.02.01 Ф «Молекулярно-генетичні основи використання біотехнологічних платформ антимікробної дії як альтернатива антибіотикам у тваринництві» (номер державної реєстрації – 0126U002014), а також виконання грантів UASEEDs\_P3\_CoD10\_12 «Biotechnological preparations - an alternative to antibiotics in animal husbandry» from Seeds of Bravery (UASEEDs) funded by the

European Union under the European Innovation Council (EIC) та індивідуального гранту FEMS (Application ID 5385) за проектом «Ідентифікація та характеристика бактеріоцинів штаму *Enterococcus* sp. SB12 з антимікробним потенціалом».

### **Особистий внесок здобувача.**

Формування ідей, планування експериментів, аналіз та обговорення отриманих результатів, підготування рукописів статей та формування основних положень, виконувалося автором спільно з науковими керівниками д.б.н. Оксаною Штапенко та к.б.н. Василем Сирваткою. Увесь обсяг експериментальних робіт виконано автором самостійно або за безпосередньої участі. Спільно з науковими керівниками провела біохімічний аналіз показників зразків тканин та крові лабораторних мишей для оцінки впливу *Enterococcus* sp. SB12. Автор самостійно здійснила біоінформатичний та філогенетичний аналіз геному штаму SB12, дослідила антагоністичні, антибіотичні та мікробіологічні властивості, здійснила ВЕРХ-МС та MALDI-TOF аналіз хроматограм та проаналізувала метагеном кишківника лабораторних мишей. ВЕРХ-МС-аналіз вторинних метаболітів виконано в співпраці з к.б.н. М.Л. Мироновським й проф. А.М. Лужецьким (Саарландський університет, Німеччина). ВЕРХ-МС-аналіз первинних метаболітів, зокрема вітамінів та амінокислот було виконано в співпраці з к.б.н. Р.М. Остаповим (Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, Україна). MALDI-TOF аналіз виконано в співпраці з проф. Р. Мюлером (Гемгольц центр фармацевтичних досліджень, Німеччина). Пошук й аналіз наукової літератури за темою дисертації та її оформлення автор виконала самостійно.

### **Ступінь достовірності результатів проведених досліджень та обґрунтованість висновків, що викладені в дисертації.**

Викладені у дисертації наукові положення та узагальнені на їх підставі висновки зроблені на основі отриманих даних відповідно до первинної документації. Рівень обґрунтованості результатів проведених досліджень достатній, використані сучасні методи досліджень, результати статистично опрацьовані та отримані вірогідні дані. Кількість варіантів у вибірках відповідає критеріям варіаційної статистики, що дозволило зробити

обґрунтовані висновки та сформувані практичні рекомендації. Результати дисертаційного дослідження оприлюднені та обговорені на науково-практичних форумах.

### **Наукова новизна одержаних результатів.**

Вперше здійснено комплексну характеристику та повногеномну анотацію нового штаму *Enterococcus* sp. SB12, виділеного з традиційної карпатської бринзи. На основі повногеномного секвенування (WGS) виявлено унікальний біосинтетичний потенціал штаму, що полягає у наявності розширеного набору з п'яти кластерів генів бактеріоцинів (ентероцини A, P, SE-K4, L50a та ентеролізін A), які зумовлюють його високу антагоністичну активність щодо широкого спектра патогенних мікроорганізмів. Доведено генетичну безпеку штаму SB12 шляхом встановлення виключно хромосомної локалізації детермінант вірулентності та антибіотикорезистентності, що науково обґрунтовує мінімальний ризик горизонтального переносу генів резистентності в умовах кишкового мікробіому.

Уточнено таксономічний статус та філогенетичну спорідненість досліджуваного ізоляту з безпечними комерційними пробіотичними культурами, а також ідентифіковано специфічні генетичні локуси (*efaA*, *WxL locus C*), що відповідають за його високу адаптивність до умов шлунково-кишкового тракту. Вперше із застосуванням метагеномного аналізу встановлено здатність штаму SB12 позитивно модулювати склад мікробіоти кишечника мишей, стимулюючи ріст здорового мікробіому кишківника та пригнічуючи розвиток умовно-патогенних бактерій.

Експериментально доведено біологічну інертність штаму *in vivo*, що підтверджується стабільністю метаболічних показників крові та збереженням окислативно-відновного гомеостазу макроорганізму за умов тривалого застосування пробіотика. Отримані дані розширюють уявлення про механізми пробіотичної дії ентерококів та теоретично обґрунтовують перспективність використання штаму *Enterococcus* sp. SB12 як основи для створення нових функціональних препаратів.

### **Обсяг публікацій автора за матеріалами дисертаційної роботи.**

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 10 наукових праць, у тому числі 2 наукові статті у фахових виданнях, які індексуються у міжнародних наукометричних базах даних Scopus з імпаکت-фактором, 1 стаття у фаховому журналі категорії Б та 7 тез наукових доповідей.

**Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:**

1. Mushynska, V., Roman, I., Tistechok, S., Slyvka, I., Tsisaryk, O., Gromyko, O., Shtapenko, O., & Syrvatka, V. (2024). Draft genome sequence of *Enterococcus* sp. SB12 isolated from artisanal cheese of the Carpathian. *Microbiology resource announcements*, 13(1), e0086523. <https://doi.org/10.1128/MRA.00865-23>. (Дисертанткою особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).
2. Mushynska, V., Tistechok, S., Roman, I., Slyvka, I., Tsisaryk, O., Gromyko, O., Shtapenko, O., & Syrvatka, V. (2025). Genome Analysis and Characterization of *Enterococcus* sp. SB12 Isolated from Carpathian Artisanal Cheese. *Current microbiology*, 82(8), 349. <https://doi.org/10.1007/s00284-025-04337-4>. (Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).
3. Мушинська В. С., Сирватка В. Я., Штапенко О. В. (2026). Вплив довготривалого введення штаму *Enterococcus* sp. SB12 на показники оксидативного стресу мишей. *Біологія тварин*, 28(1), 56-61. <https://doi.org/10.15407/animbior28.01.056> (Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. Мушинська В., Роман І., Тістечок С., Громико О., Цісарик О., Сливка І., Штапенко О., Сирватка В. Аналіз послідовності чернетки геному ізоляту *Enterococcus* sp. SB12. (2023, 18-19 травня). Тези доповідей XXI Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна: «Біологія тварин», Львів, Україна, ст. 69.

2. Mushynska V., Tistechok S., Slyvka, I., Tsisaryk O., Gromyko O., Shtapenko O., Syrvatka V. (2023, November 15<sup>th</sup>-16<sup>th</sup>). The effect of low pH and high temperatures on the survival of *Enterococcus* sp. SB12 strain. The International Scientific and Practical Conference «Modern aspects of microbiology, virology and biotechnology in wartime and post-war period»: abstract book, Kyiv, Ukraine, P.157-158.
3. Кукуян С., Мушинська В., Громико О., Тістечок С., Штапенко О., Сирватка В. (2024, 18-20 квітня).). Пробиотична дія *Enterococcus faecium* SB-12 на організм мишей. *Збірник тез XX Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ в біології», присвяченої 90-річчю від дня народження професора Ореста Демківа*, м. Львів, Україна, ст. 150-152.
4. Мушинська В., Тістечок С., Роман І., Громико О., Штапенко О., Сирватка В. (2024, 19-20 вересня). Вплив Штаму *Enterococcus* sp. SB12 на мікробіом кишківника мишей. *Тези доповідей XXII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 75-річчю від дня народження доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН Ростислава ФЕДОРУКА (11.08.1949 — 21.06.2023): «Біологія тварин»*, м. Львів, Україна, ст. 159.
5. Mushynska V., Tistechok S., Gromyko O., Shtapenko O., Syrvatka V. (2024, November 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup>). Determining the optimum pH for cultivation *Enterococcus* sp. SB12 strain in industry. *The V Scientific Conference of Young Researchers «Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology: abstract book*, Kyiv, Ukraine, P.31.
6. Кукуян С., Мушинська В., Громико О., Тістечок С., Штапенко О., Сирватка В. (2025, 14-15 травня). Порівняльний аналіз геномів штаму *Enterococcus* sp. SB12 та штамів *Enterococcus faecium*, виділених з молочнокислих продуктів. *Матеріали міжнародної наукової конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування»*, м. Харків, Україна, ст. 72-73.
7. Mushynska V., Tistechok S., Gromyko O., Shtapenko O., Syrvatka V. (2025, May 15<sup>th</sup>-16<sup>th</sup>). Investigation of biogenic amine production by the *Enterococcus* sp. SB12 strain. *Materials of XXIII All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists dedicated to the 110th anniversary of the Doctor of Biological*

*Sciences, Professor, Honored Figure of Science and Technology of Ukraine Zenoviy SKORODYNSKYI (16.09.1915–10.04.1985) and to the 100th anniversary of the Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the UAAS Fedir PALFIY (03.03.1925–31.12.1996): «The Animal Biology», Lviv, Ukraine, P. 62*

**Конкретний особистий внесок здобувача в одержання наукових результатів, що виносяться на захист.**

Автор самостійно проаналізувала та систематизувала наукову літературу, виконала п'ять серій досліджень, статистичний обрахунок експериментальних даних, підготувала й опублікувала статті, тези, написала дисертаційну роботу. Разом у співпраці з науковими керівниками проаналізувала результати досліджень, сформулювала та узагальнила висновки. Запозичень ідей та розробок у співавторів публікацій не було, конфлікту інтересів немає.

**Наукове значення виконаного дослідження та практична цінність одержаних результатів.**

Практичне значення роботи насамперед полягає в отриманні фундаментальних генетичних даних: повногеномну послідовність та детальний генетичний профіль штаму *Enterococcus* sp. SB12 депоновано у міжнародній базі даних NCBI, що відкриває можливості для їх використання у порівняльних геномних дослідженнях та ідентифікації нових бактеріоцинових локусів.

На основі цих даних науково обґрунтовано доцільність використання досліджуваного штаму як перспективної та безпечної генетичної основи для створення вискоєфективних пробіотичних препаратів. Зокрема, встановлена відсутність плазмідних детермінант резистентності дозволяє рекомендувати штам SB12 для впровадження у тваринництво як екологічну альтернативу кормовим антибіотикам.

Технологічну цінність результатів підтверджує виявлена висока термотолерантність штаму, що дозволяє інтегрувати його у процеси виробництва гранульованих кормів без втрати біологічної активності. Разом з тим, доведена здатність штаму позитивно модулювати склад кишкової мікробіоти та підтримувати антиоксидантний статус макроорганізму *in vivo* є

підґрунтям для впровадження нових схем профілактики дисбіозів та зміцнення резистентності молодняка тварин.

Результати дисертаційного дослідження також можуть бути використані в навчальному процесі вищих навчальних закладів біологічного та ветеринарного профілів при підготовці курсів з мікробіології, біотехнології та фізіології тварин.

Основні результати та матеріали дисертаційної роботи впроваджено у навчальний процес Львівського національного університету імені І. Франка при викладанні дисципліни «Великий практикум» та «Генетика і селекція біотехнологічних продуцентів» що викладаються в межах ОПП «Біотехнології та біоінженерія» першого (бакалаврського) рівня вищої освіти для здобувачів спеціальності G21 Біотехнології та біоінженерія

#### **Перевірка дисертаційної роботи на наявність академічного плагіату.**

Комісія з питань академічної доброчесності та етики в Інституті біології тварин НААН, створена наказом директора №115 від 28.09.2022, перевіривши дисертацію Мушинської В. С. на тему *«Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму Enterococcus sp. SB12»*, прийшла до наступного висновку: унікальність дисертаційної роботи становить 98,34 % і відповідно до п.-6 «Положення про виявлення та запобігання академічного плагіату в Інституті біології тварин НААН» допускається до захисту.

#### **Відомості щодо проведення біоетичної експертизи дисертаційних досліджень.**

Усі маніпуляції з піддослідними тваринами проводили з дотриманням положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001 р.), керівних принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин» (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи №2010/63/ЄС, закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», прийняття від 10.10.2024, підстави 4017IX. Проведені дослідження були затверджені на засіданні комісії з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН, протокол №162, від 02.12.2024 року.

### **Оцінка структури дисертації, її мови та стилю викладення.**

Дисертаційна робота Мушинської В. С. «Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus sp. SB12*», за структурою, мовою та стилем виконана відповідно до вимог щодо оформлення дисертації МОН України (наказ МОН від 12.01.2017 року № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації»). Рукопис написаний українською мовою, матеріали викладені у доступному стилі, складається з анотацій українською та англійською мовами, списку публікацій за темою дисертації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаної літератури. Дисертаційна робота Мушинської В. С. виконана на високому теоретичному і науково-методичному рівні та відповідає сучасним напрямкам досліджень біології та вимогам МОН України, які ставляться до дисертацій науково-освітнього ступеня доктора філософії.

### **Зауваження до дисертації щодо її змісту та оформлення.**

Принципових зауважень до змісту, оформлення та стилю дисертаційної роботи немає. Мали місце деякі стилістичні помилки, на які вказано автору та які не знижують цінності використаного матеріалу.

### **Відповідність дисертації вимогам, що пред'являються до дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії.**

Дисертація відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії (Постанова Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44), Про внесення деяких змін до деяких постанов Кабінету Міністрів України з питань підготовки та атестації здобувачів наукових ступенів від 03.05.2024 р. № 507.

**Висновок:** за актуальністю теми, методичним рівнем виконаних досліджень, науковою новизною, теоретичним і практичним значенням дисертаційна робота Мушинської В. С. «Геномна та функціональна

характеристика пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus sp.* SB12», відповідає вимогам ПОРЯДКУ, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р., відносно дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії. Рекомендації дисертації до захисту. Дисертаційну роботу заслухано та обговорено на розширеному засіданні лабораторії біотехнології відтворення та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН (протокол № 6 від 30.06.2026 р). В процесі обговорення дисертаційної роботи Мушинської В. С. суттєвих зауважень, що стосуються суті роботи, не було висунуто. Дисертаційна робота Мушинської В. С. «Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus sp.* SB12», є завершеною науковою працею, у якій вирішено наукові завдання: здійснити повногеномне секвенування, збірку та анотацію геному штаму *Enterococcus sp.* SB12 для верифікації його таксономічного положення та уточнення філогенетичних зв'язків у межах роду *Enterococcus*; провести біоінформатичний аналіз геному з метою ідентифікації кластерів генів вторинних метаболітів, антимікробних сполук (бактеріоцинів) та оцінки генетичної безпеки (пошук детермінант антибіотикорезистентності та факторів вірулентності); дослідити біотехнологічні та пробіотичні властивості штаму *in vitro*, зокрема його резистентність до екстремальних факторів (температури, солі, лізоциму) та здатність до виживання в умовах моделювання ШКТ; охарактеризувати метаболічний профіль штаму SB12 та ідентифікувати ключові біоактивні метаболіти з використанням методів вискоєфективної рідинної хроматографії з мас-спектрометрією (ВЕРХ-МС) та матрично-асистованої лазерної десорбції/іонізації – часу прольоту (MALDI-TOF); провести метагеномний аналіз складу мікробіому кишечника піддослідних тварин для з'ясування закономірностей впливу штаму SB12 на кількісне та якісне співвідношення представників кишкового мікробіоценозу; з'ясувати фізіолого-біохімічні ефекти тривалого застосування штаму *in vivo*, оцінивши стан оксидативно-відновного гомеостазу та стабільність метаболічних показників сироватки крові мишей., що має важливе значення для галузі знань 09 «Біологія».

У 10 наукових публікаціях повністю відображені основні результати дисертації, з них 2 статті опубліковано у журналах, що належать до наукометричної бази Scopus, 1 статтю – у фаховому журналі категорії Б, 7 – тез доповідей.

Дисертація відповідає вимогам, передбаченим пп. 6, 7, 8 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженому Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 з урахуванням змін згідно Постанови Кабінету Міністрів України від 03.05.2024 р. № 507.

З урахуванням наукової зрілості та професійних якостей, робота Мушинської В. С. «*«Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму Enterococcus sp. SB12»*» рекомендується для подання до розгляду та захисту у разовій спеціалізованій вченій раді.

Пропонується створити в Інституті біології тварин НААН разову спеціалізовану вчену раду з правом прийняття до розгляду та проведення захисту дисертації Мушинської Вікторії Станіславівни, яка здобуває ступінь доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», галузі знань 09 «Біологія» у складі:

**Голова разової спеціалізованої ради:**

Віщур Олег Іванович, доктор ветеринарних наук, професор, завідувач лабораторії імунології ІБТ НААН.

**Опоненти:**

Зінченко Оксана Юріївна, кандидат біологічних наук, доцент, доцентка кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова.

Мошинець Олена Володимирівна, доктор біологічних наук, провідний науковий співробітник відділу регуляторних механізмів клітини ІМБГ НАН України.

**Рецензенти:**

Пилипець Андрій Зіновійович, кандидат сільськогосподарських наук, виконуючий обов'язки Вченого секретаря, старший дослідник лабораторії екологічної фізіології та якості продукції ІБТ НААН.

Козак Марія Романівна, кандидат біологічних наук, старший дослідник,

виконуюча обов'язки завідувача лабораторії молекулярної біології та генетики.

За затвердження висновку проголосували:

За – 24

Проти – немає

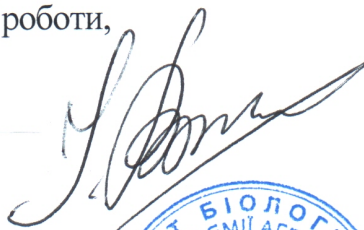
Утримались – немає

Голова на засіданні фахового семінару

заступник директора з наукової роботи,

д. с. – г. н., проф.

06.07.2026



Ігор ВУДМАСКА

Підпис д. с. – г. н. ВУДМАСКИ І. В. засвідчую,

в. о. вченого секретаря Інституту біології тварин НААН,

к. с. -г. н., с. н. с.



Андрій ПИЛИПЕЦЬ