

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, Мошинець Олени Володимирівни на дисертаційну роботу Мушинської Вікторії Станіславівни на тему: «Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus* sp. SB12», представлену на здобуття науково-кваліфікаційного ступеня доктора філософії, зі спеціальності 091 - «Біологія» (галузь знань 09 - «Біологія»).

Актуальність теми дисертації та її зв'язок з науковими програмами. Проблема пошуку нових пробіотичних мікроорганізмів останніми роками набуває особливого значення у зв'язку зі стрімким поширенням антибіотикорезистентності, необхідністю скорочення застосування антибактеріальних препаратів у медицині та тваринництві, а також розвитком концепції функціонального харчування та мікробіомної терапії.

Особливу увагу сьогодні привертають представники роду *Enterococcus*. Незважаючи на значний технологічний потенціал окремих штамів, ентерококи залишаються суперечливою групою мікроорганізмів через можливу наявність факторів вірулентності, мобільних генетичних елементів та детермінант антибіотикорезистентності. Саме тому комплексна оцінка нових ізолятів із використанням повногеномного секвенування, сучасної біоінформатики та фенотипових методів дослідження є необхідною перед їх можливим практичним використанням.

Представлена дисертаційна робота повністю відповідає сучасним тенденціям розвитку прикладної та фундаментальної мікробіології. Авторкою вперше проведено комплексне дослідження штаму *Enterococcus* sp. SB12, виділеного з традиційної карпатської бринзи, що включало геномну характеристику, аналіз генетичних детермінант антибіотикорезистентності та вірулентності, дослідження антагоністичних властивостей, оцінку стійкості до факторів шлунково-кишкового тракту, впливу на мікробіом та оксидантно-антиоксидантний статус лабораторних тварин.

Отже, актуальність теми не викликає сумнівів і визначається як фундаментальним значенням отриманих результатів для сучасної мікробіології, так і перспективами створення нових пробіотичних препаратів для ветеринарної медицини та тваринництва.

Зв'язок роботи з науковими програмами. Дисертаційну роботу виконано відповідно до планів науково-дослідної діяльності Інституту біології тварин НААН України. Дослідження проводилися у межах державних наукових тем, присвячених вивченню пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus* sp. SB12 (ДР 0124U001989) та розробленню біотехнологічних альтернатив антибіотикам у тваринництві (ДР 0126U002014). Окремі етапи роботи були підтримані міжнародними грантовими програмами European Innovation Council та Federation of European Microbiological Societies (FEMS), що свідчить про міжнародне визнання актуальності виконаних досліджень.

Ступінь обґрунтованості наукових положень. Наукові положення, сформульовані авторкою, є достатньо аргументованими та базуються на використанні сучасного комплексу класичних і молекулярно-біологічних методів досліджень. У роботі застосовано методи повногеномного секвенування, біоінформатичний аналіз геному, порівняльну геноміку; MALDI-TOF мас-спектрометрію та аналіз вторинних метаболітів методом ВЕРХ-МС; досліджено мікробіологічні властивості штаму; проведено експериментальні дослідження *in vivo* та статистичну обробку отриманих результатів.

Такий комплекс методів є достатнім для вирішення поставленої мети, а отримані результати логічно взаємопов'язані та взаємно підтверджують один одного. Особливо

позитивно слід відзначити поєднання геномних підходів із функціональними дослідженнями, що значно підвищує достовірність зроблених висновків.

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна дисертаційної роботи полягає у комплексному дослідженні нового природного ізоляту *Enterococcus* sp. SB12 із застосуванням сучасних геномних, біоінформатичних, мікробіологічних та експериментальних підходів, що дозволило суттєво розширити сучасні уявлення про біологічні властивості цього штаму та перспективи його практичного використання.

У роботі вперше здійснено повногеномне секвенування штаму *Enterococcus* sp. SB12, виділеного із традиційної карпатської овечої бринзи, встановлено особливості його геномної організації, проведено структурно-функціональну анотацію геному, охарактеризовано хромосому, плазмиди, профагові послідовності та мобільні генетичні елементи. Показано, що досліджуваний штам характеризується високою генетичною пластичністю при відносно низькому ризику поширення клінічно значущих детермінант антибіотикорезистентності.

Важливим науковим результатом є комплексна оцінка безпечності штаму. Авторкою не лише проведено пошук генів антибіотикорезистентності та факторів вірулентності, але й здійснено їх фенотипову верифікацію. Показано, що незважаючи на наявність окремих генетичних детермінант, штам залишається чутливим до клінічно важливих антибіотиків, зокрема ампіциліну та ванкоміцину, а виявлені фактори вірулентності переважно пов'язані з процесами адгезії, колонізації та адаптації до умов існування, що характерно і для коменсальних представників роду *Enterococcus*.

Науковий інтерес становлять результати аналізу вторинного метаболізму досліджуваного штаму. Уперше для штаму SB12 встановлено наявність комплексу генів синтезу ентероцинів A, P, SE-K4, L50 та ентеролізину A, а також кластера генів полікетидсинтази III типу, що значною мірою пояснює його виражену антагоністичну активність щодо грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів.

Заслужують на увагу результати порівняльної геноміки, які свідчать про спорідненість штаму SB12 із харчовими та пробіотичними ізолятами *Enterococcus faecium* і водночас демонструють його суттєві відмінності від клінічних госпітальних штамів. Це має важливе значення для оцінки перспектив практичного використання досліджуваного ізоляту.

Оригінальними є результати комплексної оцінки пробіотичних властивостей штаму, його стійкості до факторів шлунково-кишкового тракту, технологічних умов культивування та впливу на організм лабораторних тварин. Отримані дані істотно доповнюють сучасні уявлення про біологічний потенціал природних ізолятів ентерококів.

Таким чином, дисертаційна робота містить низку нових наукових результатів, які мають фундаментальне та прикладне значення для сучасної мікробіології, пробіотичної біотехнології та ветеринарної медицини.

Теоретичне і практичне значення одержаних результатів. Практична цінність дисертаційної роботи полягає у формуванні науково обґрунтованої основи для подальшого створення пробіотичних препаратів на основі штаму *Enterococcus* sp. SB12.

Комплексна характеристика геному, визначення антибіотикочутливості, оцінка потенційної безпечності, дослідження антагоністичних властивостей та біологічної активності створюють необхідне підґрунтя для практичного використання досліджуваного штаму у тваринництві, ветеринарній медицині та виробництві функціональних харчових продуктів.

Важливе практичне значення мають результати, що підтверджують відсутність продукції гістаміну та путресцину, а також незначне утворення тираміну, що суттєво знижує потенційні токсикологічні ризики застосування штаму у складі ферментованих продуктів.

Особливо слід відзначити використання сучасного комплексу біоінформатичних платформ для аналізу геному, що дозволяє застосовувати запропонований підхід як універсальну схему комплексної оцінки перспективних пробіотичних штамів інших видів молочнокислих бактерій.

Практичну цінність також підсилює впровадження окремих результатів дослідження у виконання державних наукових програм та міжнародних грантових проєктів, що свідчить про їх актуальність і затребуваність.

Повнота викладу основних наукових положень відповідає встановленим вимогам Міністерства освіти і науки України. За результатами дисертації опубліковано 10 наукових праць, у тому числі 2 статті у фахових виданнях, які індексуються у базі даних Scopus, та 1 статтю у фаховому журналі категорії Б, і 7 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях. Аналіз тексту дисертації не вказує на те, що в дисертаційній роботі може бути наявний плагіат чи фальсифікації; у подачі матеріалу простежується особистий стиль автора.

Структура та зміст дисертації. Дисертаційна робота має чітку, логічну та добре продуману структуру. У вступі обґрунтовано актуальність обраної теми, сформульовано мету і завдання дослідження, визначено об'єкт, предмет та методи дослідження, висвітлено наукову новизну, практичне значення отриманих результатів, а також наведено відомості щодо апробації результатів і особистого внеску здобувачки. Основна частина роботи складається з чотирьох розділів, у яких послідовно викладено сучасний стан досліджуваної проблеми, описано матеріали та методи досліджень, наведено результати власних експериментальних досліджень і здійснено їх аналіз та узагальнення. Дисертація завершується висновками, які логічно випливають із проведених досліджень, списком використаних джерел, що охоплює сучасну наукову літературу за тематикою роботи, та інформативними додатками, які доповнюють основний текст. Загалом структура дисертації є послідовною, а виклад матеріалу – логічним і таким, що забезпечує цілісне сприйняття результатів проведеного дослідження. Загальний обсяг дисертації – 201 сторінка, з яких 119 сторінок займає основна частина. Робота проілюстрована 27 рисунками та 9 таблицями; містить анотацію двома мовами. Список використаної літератури налічує 377 найменувань, з яких 372 джерела подано латиницею, що свідчить про широке використання актуальної зарубіжної наукової літератури.

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».

Зауваження до дисертаційної роботи. Загалом дисертаційна робота справляє позитивне враження, виконана на сучасному науково-методичному рівні, характеризується достатньою повнотою експериментальних досліджень та логічністю викладення матеріалу. Разом із тим під час ознайомлення з роботою виникли окремі зауваження та дискусійні питання:

- У розділі огляду літератури авторка детально характеризує сучасні уявлення щодо пробіотичних властивостей представників роду *Enterococcus*. Разом із тим недостатньо висвітлено сучасні підходи EFSA та міжнародних регуляторних організацій щодо критеріїв оцінки безпечності ентерококів як пробіотиків. Доцільним було б більш детально обговорити сучасні вимоги до відбору кандидатних штамів для практичного використання.
- При аналізі генів антибіотикорезистентності авторка правильно наголошує на відсутності фенотипового прояву більшості виявлених детермінант. Разом із тим дискусія могла б бути ширшою щодо потенційної експресії цих генів за різних

умов стресу або селективного тиску антибіотиків, що активно обговорюється у сучасній літературі.

- У роботі встановлено виражену антагоністичну активність щодо широкого спектра тест-культур. Разом із тим доцільно було б порівняти отримані результати із референтними пробіотичними штамами (*Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, *Enterococcus faecium* SF68 або іншими), що дозволило б об'єктивніше оцінити конкурентні переваги штаму SB12.
- Значний інтерес становлять результати біоінформатичного аналізу кластерів бактеріоцинів. Водночас робота виграла б від експериментального підтвердження експресії окремих генів шляхом транскриптомного аналізу або RT-qPCR, що дозволило б безпосередньо пов'язати геномні дані із функціональною активністю штаму.
- Трапляються окремі редакційні неточності: місцями використано різні варіанти написання латинських назв (*Enterococcus* sp. SB12 та *Enterococcus* sp. SB12), зустрічаються поодинокі невіривняні скорочення, а також окремі стилістичні повтори у вступі та розділі обговорення, назви окремих таблиць та даних вказані англійською мовою. Ці недоліки мають редакційний характер і не впливають на загальне позитивне сприйняття роботи.
- Окремі рисунки, що містять результати біоінформатичного аналізу, є достатньо інформативними, однак через значну кількість елементів їх читабельність дещо знижується. Доцільним було б збільшити розмір шрифту або винести частину пояснень до підписів рисунків.

Запитання до здобувача:

1. У геномі штаму виявлено низку генів вірулентності. Які з них, на Вашу думку, можуть бути характерними саме для коменсальних або пробіотичних ентерококів і не повинні автоматично трактуватися як маркери патогенності?
2. Чим Ви пояснюєте наявність генів вірулентності у штаму, який Ви характеризуєте як перспективний пробіотик?
3. Чим Ви можете пояснити відсутність фенотипового прояву окремих генів антибіотикорезистентності, виявлених під час біоінформатичного аналізу?
4. Чи оцінювали Ви ризик горизонтального перенесення виявлених генів антибіотикорезистентності до інших представників кишкової мікробіоти?
5. Які додаткові експериментальні підходи Ви вважаєте найбільш перспективними для підтвердження експресії виявлених кластерів бактеріоцинів?
6. Які фактори культивування, на Вашу думку, могли б стимулювати експресію виявлених кластерів бактеріоцинів?
7. Чому для досліджень *in vivo* було обрано саме такий термін експерименту? Чи очікуєте Ви інших результатів за тривалішого застосування пробіотичного штаму?
8. Які основні бар'єри Ви вбачаєте для реєстрації препарату на основі *Enterococcus* sp. SB12 у країнах Європейського Союзу?
9. Які додаткові критерії безпечності Ви вважаєте обов'язковими перед практичним використанням штаму SB12 як пробіотика?

Висновок. Дисертаційна робота Мушинської Вікторії Станіславівни «Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus* sp. SB12» є завершеним самостійним науковим дослідженням, у якому отримано нові науково обґрунтовані результати, що мають теоретичне та практичне значення для сучасної мікробіології та біотехнології. Висловлені зауваження мають переважно рекомендаційний

характер і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи. За актуальністю, науковою новизною, методичним рівнем, обґрунтованістю та достовірністю отриманих результатів дисертаційна робота 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».

Офіційний опонент:

Доктор біологічних наук,
Провідна наукова співробітниця
Відділу регуляторних механізмів клітини
Інституту молекулярної біології і генетики
Національної академії наук України

Олена МОШИНЕЦЬ

Підпис *Олена Мошинець*
посвідчується
Зав. кафедр. І. М. Мейсєва