

ВІДГУК
офіційного опонента на дисертаційну роботу
Мушинської Вікторії Станіславівни
«Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу
штаму *Enterococcus* sp. SB12», подану на здобуття наукового ступеня
доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (галузь знань 09
«Біологія»)

Актуальність теми дисертаційної роботи та її зв'язок із науковими програмами

Одним із сучасних напрямів розвитку мікробіології, біотехнології та молекулярної біології є пошук нових штамів мікроорганізмів, здатних виконувати пробіотичні функції, забезпечувати антагоністичну активність щодо патогенних мікроорганізмів та бути безпечними для використання у медицині, ветеринарії й харчовій промисловості. Особливу увагу останніми роками приділяють представникам роду *Enterococcus*, оскільки поряд із високим біотехнологічним потенціалом окремі представники цього роду можуть бути носіями факторів вірулентності та антибіотикорезистентності. Саме тому комплексна оцінка безпечності потенційних пробіотичних штамів із використанням сучасних геномних, біоінформатичних і функціональних методів є надзвичайно актуальною.

Дисертаційна робота Мушинської Вікторії Станіславівни присвячена комплексному дослідженню нового ізоляту *Enterococcus* sp. SB12, виділеного з традиційної карпатської овечої бринзи, із застосуванням сучасних методів повногеномного секвенування, порівняльної геноміки, біоінформатики, мікробіології, метаболоміки та експериментальних досліджень *in vivo*. Такий міждисциплінарний підхід дозволив не лише оцінити пробіотичний потенціал штаму, але й комплексно дослідити його безпечність, функціональні властивості, антимікробний потенціал та вплив на мікробіом кишечника лабораторних тварин.

Тематика дисертації відповідає сучасним світовим тенденціям розвитку функціональної мікробіології, пробіотичних технологій, досліджень мікробіому та біобезпеки, а також безпосередньо пов'язана з науковими дослідженнями Інституту біології тварин НААН.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій

Дисертаційне дослідження виконане на високому методичному рівні. Для досягнення поставленої мети авторкою використано широкий спектр

сучасних методів молекулярної біології, мікробіології, геноміки, біоінформатики, мас-спектрометрії, хроматографії та експериментальної біології. Проведено повногеномне секвенування досліджуваного штаму, функціональну анотацію геному, порівняльний геномний аналіз, дослідження антибіотикочутливості, антимікробної активності, здатності до синтезу біогенних амінів, оцінено стійкість до факторів шлунково-кишкового тракту, виконано MALDI-TOF та ВЕРХ-МС аналіз метаболітів, а також проведено експерименти *in vivo* із використанням метагеномного аналізу кишкового мікробіому лабораторних тварин.

Обсяг проведених досліджень є значним, а використані методичні підходи повністю відповідають поставленим завданням. Отримані результати є статистично обґрунтованими, логічно проаналізованими та підтверджують сформульовані висновки.

Наукова новизна одержаних результатів

Наукова новизна роботи не викликає сумнівів.

Уперше проведено комплексне дослідження геномних, фізіолого-біохімічних та пробіотичних властивостей нового природного ізоляту *Enterococcus* sp. SB12 із використанням сучасних геномних технологій.

Встановлено особливості геномної організації штаму, проаналізовано мобільні генетичні елементи, плазміди, гени вірулентності та антибіотикорезистентності, а також доведено відсутність фенотипового прояву більшості потенційно небезпечних детермінант. Виявлено кластери синтезу кількох бактеріоцинів, досліджено їх можливий функціональний потенціал та показано виражену антагоністичну активність штаму щодо патогенних мікроорганізмів.

Особливої уваги заслуговує поєднання результатів геномного аналізу із фенотиповими дослідженнями та експериментами *in vivo*, що дозволило підтвердити пробіотичний потенціал досліджуваного штаму, його позитивний вплив на структуру кишкового мікробіому та відсутність негативного впливу на фізіолого-біохімічні показники організму лабораторних тварин.

Теоретичне та практичне значення роботи

Результати дисертаційної роботи істотно розширюють сучасні уявлення про геномну організацію, механізми безпечності та функціональні властивості пробіотичних ентерококів.

Практичне значення роботи полягає у можливості використання штаму *Enterococcus* sp. SB12 як перспективного кандидата для створення пробіотичних препаратів, функціональних харчових продуктів та

біотехнологічних розробок. Отримані результати можуть бути використані під час створення нових пробіотичних композицій, удосконалення систем оцінки безпечності пробіотичних культур та викладання дисциплін «Мікробіологія», «Біотехнологія», «Молекулярна біологія», «Геноміка» та «Біоінформатика».

Повнота викладення результатів у наукових публікаціях

Основні положення дисертації достатньо повно висвітлені у наукових публікаціях здобувачки. Результати досліджень опубліковано у двох статтях у виданнях, що індексуються у базах даних Scopus, одній статті у фаховому науковому журналі України та апробовано на міжнародних і всеукраїнських наукових конференціях.

Зауваження та дискусійні питання

Попри безумовно позитивну оцінку роботи, окремі положення можуть бути предметом наукової дискусії.

1. Подекуди зустрічається застаріла термінологія «мікрофлора» поряд із сучасним терміном «мікробіота».

2. У вступі дисертації, на нашу думку, дещо звужено сформульовано об'єкт дослідження як «пробіотичний потенціал, генетичні детермінанти безпеки та метаболічна активність штаму *Enterococcus* sp. SB12». З огляду на фактичний обсяг виконаних досліджень, який охоплює геномні, філогенетичні, мікробіологічні, метаболічні, технологічні та *in vivo* характеристики штаму, доцільніше було б визначити об'єкт ширше, тоді як генетичні детермінанти безпеки, метаболічну активність та інші конкретні властивості віднести до предмета дослідження.

3. У геномі штаму виявлено декілька кластерів генів бактеріоцинів, однак їх функціональна експресія та продукція відповідних бактеріоцинів експериментально остаточно не підтверджені. З огляду на це твердження про здатність штаму до синтезу бактеріоцинів доцільно було б формулювати як встановлений генетично детермінований бактеріоциногенний потенціал, що потребує подальшої функціональної верифікації.

4. Для характеристики кишкової мікробіоти в роботі застосовано ампліконне секвенування V3–V4 ділянки гена 16S рРНК та ITS2, яке авторка визначає як метагеномний аналіз. На мою думку, коректніше в цьому випадку використовувати термін «ампліконне профілювання мікробіоти». Крім того, роздільна здатність використаного підходу не дозволяє однозначно підтвердити персистенцію саме штаму *Enterococcus* sp. SB12 на підставі збільшення представленості роду *Enterococcus*. Для підтвердження цього

висновку доцільним було б застосування штамоспецифічної ПЛР/qPCR або іншого методу з роздільною здатністю на рівні штаму.

5. У практичному значенні отриманих результатів авторка рекомендує штам *Enterococcus* sp. SB12 для впровадження у тваринництво як альтернативу кормовим антибіотикам та зазначає можливість його інтеграції у технології виробництва гранульованих кормів. Водночас експериментальну оцінку ефектів штаму *in vivo* проведено лише на лабораторних мишах. На мою думку, висновок щодо можливості практичного впровадження штаму у тваринництво є дещо передчасним і потребує попереднього підтвердження його безпечності та ефективності на цільових видах продуктивних сільськогосподарських тварин.

Запитання до дисертантки:

1. Чи можна вважати хромосомну локалізацію генів антибіотикорезистентності достатньою підставою для висновку про мінімальний ризик їх горизонтального перенесення, враховуючи наявність у геномі SB12 мобільних генетичних елементів та профагових ділянок?

2. В експерименті мишам давали 1×10^8 КУО/г маси тіла. Для миші приблизно 27–28 г це близько $2,7\text{--}2,8 \times 10^9$ КУО на тварину на добу. Але бактерії вводили через питну воду, а концентрація життєздатних клітин у воді помітно зменшувалася вже протягом доби. Як фактично розраховували індивідуальну отриману дозу, якщо вода споживається тваринами *ad libitum*?

3. Чим був обґрунтований вибір набору DNeasy PowerSoil Pro Kit для виділення сумарної ДНК із вмісту кишечника мишей? Чому для цього типу біологічного матеріалу не було використано спеціалізований набір PowerFecal Pro, оптимізований для дослідження кишкового мікробіому? Чи могли, на думку авторки, особливості використаного методу екстракції вплинути на представленість окремих таксономічних груп у подальшому 16S/ITS-профілюванні?

4. В антагоністичному тесті штам *Enterococcus* sp. SB12 попередньо культивували на MRS протягом 24 годин. Чим був обґрунтований саме цей час культивування? Чи досліджувалась кінетика продукції антимікробних сполук протягом експоненційної та стаціонарної фаз росту штаму і чи встановлено, що через 24 години їх концентрація є максимальною?

5. Яким чином у цьому експерименті було диференційовано дію бактеріоцинів від впливу органічних кислот та інших метаболітів? Чи проводили нейтралізацію культурального супернатанту, обробку каталазою та протеазами для підтвердження білкової природи антимікробної активності?

Зазначені зауваження не знижують загальної високої наукової цінності роботи та мають переважно рекомендаційний характер.

Загальний висновок

Дисертаційна робота Мушинської Вікторії Станіславівни є завершеним самостійним науковим дослідженням, виконаним на високому методичному та науковому рівні. Авторкою успішно інтегровано сучасні підходи геноміки, біоінформатики, мікробіології, метаболоміки та експериментальної біології, що дозволило комплексно оцінити пробіотичний потенціал нового штаму *Enterococcus* sp. SB12, його безпечність, антагоністичні властивості та перспективність практичного використання.

Загалом, вважаю що за актуальністю, науково-теоретичним рівнем, новизною постановки та розв'язанням проблем і практичним значенням дисертаційна робота Мушинської Вікторії Станіславівни «Геномна та функціональна характеристика пробіотичного потенціалу штаму *Enterococcus* sp. SB12», подана на здобуття наукового ступеня доктора філософії, оформлена відповідно до наказу МОН України від 12 січня 2017 року № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» та відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р. № 44 та Постанови Кабінету Міністрів України «Про внесення змін до деяких постанов Кабінету Міністрів України з питань підготовки та атестації здобувачів наукових ступенів» від 03.05.2024 р. № 507, а її авторка заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент,
к. б. н., доцент кафедри мікробіології,
вірусології та біотехнології
Одеського національного університету
імені І.І. Мечникова



Оксана ЗІНЧЕНКО

Проректор
з науково-педагогічної роботи
та соціально-економічного розвитку
Одеського національного університету
імені І.І. Мечникова



Олександр ГРИГОР'ЄВ