

ВІДГУК

офіційного опонента – доктора біологічних наук, професора Іваниці Володимира Олексійовича на дисертацію Тарабас Ольги Володимирівни «Перетворення сполук сульфуру і нітрогену фототрофними пурпуровими бактеріями, виділеними з техногенно зміненого середовища», подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 - мікробіологія

Актуальність обраної теми дисертаційного дослідження. Основною групою фототрофних мікроорганізмів, які мешкають у водних і наземних середовищах, є аноксигенні фототрофні пурпурові бактерії, здатні фіксувати вуглекислий газ, молекулярний азот і окиснювати відновлені сполуки сірки та азоту. Завдяки своєму метаболізму вони відіграють важливу роль у біогеохімічних циклах вуглецю, сірки та азоту в водних екосистемах. Багато представників цієї групи фототрофів є унікальними, оскільки можуть також рости за хемотрофних аеробних умов, отримуючи енергію у процесі дихання під час використання органічних речовин. За наявності світла ці бактерії можуть утворювати водень під час використання органічних субстратів. Виділення та дослідження нових штамів фототрофних бактерій є важливим для розроблення біотехнологічних процесів виробництва водню та розробки мікробних паливних елементів з виробництва електроенергії.

Зв'язок наукової роботи з науковими планами, темами. Дослідження виконані в рамках науково-дослідних робіт кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка за темами: “Функціонування мікробоценозів антропогенно змінених територій”, “Функціонування мікробоценозів техногенно змінених територій та їхня участь у трансформації сполук важких металів і Сульфуру”, “Адаптації мікроорганізмів, які перетворюють сполуки Сульфуру у природі, до впливу хімічних забруднень як стресових чинників”, “Моделювання та прогнозування впливу хімічних забруднень на мікроорганізми, які перетворюють сполуки Сульфуру».

Структура дисертаційної роботи традиційна. Дисертація містить анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, результати та їх узагальнення, висновки, список використаних джерел та додатки. Дисертацію викладено на 180 сторінках, містить 38 рисунків і 15 таблиць. Список використаної літератури налічує 192 джерела.

Дисертантка поставила за мету встановити закономірності використання сульфід-, тіосульфат- і нітрит-іонів фототрофними пурпуровими несірковими бактеріями *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016, виділеними з озера Яворівське, для визначення їхньої ролі у перетворенні сполук Сульфуру та Нітрогену і встановлення можливості їх практичного використання. Поставлені задачі відповідають об'єкту і предмету дослідження.

У першому розділі здійснено вичерпний огляд сучасної літератури, в якому розглянуто дані про фототрофні пурпурові бактерії та їх значення у перетворенні сполук Сульфуру й Нітрогену у природі. Розглянуто особливості метаболізму

фототрофних пурпурових бактерій, їх поширення у різних екологічних нішах. Наведено механізми перетворення сполук Сульфуру та Нітрогену цими мікроорганізмами. На основі аналізу наукової літератури обґрунтовано актуальність і необхідність проведення досліджень за темою дисертації.

Другий розділ – Матеріали та методи дослідження, містить детальний опис використаних методів проведених експериментів – мікробіології, молекулярної біології, аналітичної хімії, статистичного аналізу за допомогою пакету MS Excel 365. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками альтернативних сукупностей даних використовували ANOVA. У роботі застосовано штам пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016, який було ідентифіковано за фізіологічними, морфологічними та біохімічними ознаками та на основі аналізу *in silico* нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК. Склад газової фази визначали, використовуючи стандартну методику на газовому хроматографі ЛХМ-8-МД. Для досліджень екзоелектрогенних властивостей бактерій використовували однокамерний мікробний паливний елемент. В цьому розділі дисертації бажано було окремими підрозділами детально описати методики проведення експериментів та умов культивування досліджуваних бактерій при вивченні продукування ними водню та електричного струму.

Третій розділ «Результати досліджень і обговорення» містить 6 глав.

У **главі 3.1** дисертації наведена «Фізико-хімічна характеристика води озера Яворівське та чисельність фототрофних бактерій у ній». Дисертантка визначила фізико-хімічний склад води озера Яворівське на різних глибинах кількість фотосинтезувальних сіркових та несіркових бактерій. Треба відзначити, що не коректним є визначення джерельної води заповідника Розточчя як контролю для озера Яворівське, оскільки це натурні дослідження, а не експериментальні.

У **главі 3.2** наведено фізіолого-біохімічні властивості та ідентифікацію ізоляту пурпурових несіркових бактерій Ya-2016. Встановлено, що бактерії ізоляту Ya-2016 можуть використовувати різні органічні сполуки як основне джерело Карбону та сульфат-іони як джерело Сульфуру. Досліджувані бактерії ростуть за анаеробних і аеробних умов, а для росту потребують вітаміну B₁₂. За результатами секвенування консервативної ділянки гена 16S рРНК встановлено, що за нуклеотидною послідовністю 16S рРНК та за деякими своїми фізіолого-біохімічними властивостями штам *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 не належить до описаних раніше видів цього роду. За результатами вищеописаних досліджень дисертантка ідентифікувала бактерії отриманого ізоляту Ya-2016 як представників роду *Rhodopseudomonas* та запропонувала надати назву *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620. Проте автору потрібно було враховувати, що це лише пропозиція, а не валідація назви виду.

У **главі 3.3** «Використання сполук Сульфуру та Нітрогену бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620» наведено результати використання відновлених сполук Сульфуру та нітрогену як донорів електронів фототрофними пурпуровими несірковими бактеріями досліджуваного штаму. Вперше показано,

що *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 використовують відновлені сполуки Сульфору та Нітрогену як донори електронів. Виділений штам перевірено на здатність до анаеробного фототрофного окиснення нітрит-іонів та зроблено логічний висновок, що нітрит-іони слугують донорами електронів та окиснюються бактеріями до нітрат-іонів у процесі аноксигенного фотосинтезу.

У главі 3.4 «Продуктування водню бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620» наведено здатність бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 продукувати водень у середовищах з органічними сполуками як джерелами Карбону і донорами електронів. Максимальну концентрацію водню у складі газової фази визначили на 14-ту добу культивування в середовищі з натрій цитратом. Сумарний об'єм водню за росту досліджуваних мікроорганізмів у середовищі з натрій цитратом і NH_4^+ за 7 діб становив 1,1 л водню за фотоферментації 1 кг натрій цитрату (сухої маси). Отже, виділення та вивчення штамів H_2 -утворювальних фототрофних несіркових бактерій є перспективним для розробки біотехнологічних процесів виробництва водню, як джерела екологічно чистого виду енергії.

Глава 3.5 Біоремедіація стічних вод за використання фототрофних несіркових бактерій *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620.

Встановлено, що найбільшу біомасу бактерії нагромаджували під час росту у стічній воді дріжджового заводу, розведений у 10 разів. До 14-ї доби культивування біомаса бактерій становила 2,2 г/л і в подальшому залишалася незмінною. Культивування бактерій у цій стічній воді спричиняло зменшення вмісту Ca^{2+} , Mg^{2+} , нітрит- і нітрат-іонів, сульфат-іонів та Cl^- . За значеннями хімічного споживання кисню стічної води визначено, що ефективність окиснення органічних сполук у ній бактеріями *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 становила 42,3% на 21 добу. За результатами культивування *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 у воді фільтрату відстійника № 3, розведений у 10 разів, ефективність окиснення органічних сполук становила 65,6%. Отримані результати можуть стати основою для розроблення ефективних біотехнологій очищення стічних вод від сполук Хлору, Феруму, Нітрогену, Сульфору й органічних речовин за участю бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016. Однак, при цьому потрібно враховувати, що в реальних умовах в очисній споруді фототрофним бактеріям прийдеться конкурувати з гетеротрофними бактеріями, які, як правило, мають набагато вищу швидкість росту ніж фототрофні бактерії.

Глава 3.6 Екзоелектрогенні властивості *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620.

Викладені в цій главі результати свідчать про те, що фототрофні пурпурові несіркові бактерії *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 за використання натрій цитрату за концентрацій 42; 60; 90 мМ здатні до генерування електричного струму в однокамерному мікробному паливному елементі (нажаль в дисертації не наведено детального описання та його розробника).

Встановлено, що бактерії *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 генерують електричний струм з максимальною густиною потужності мікробних паливних елементів 1463 мВт/м² за росту в розведений у 10 разів стічній воді дріжджового

заводу. Отримані результати демонструють, що бактерії *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 можуть генерувати електричний струм в однокамерному мікробному паливному елементі за росту як на модельному субстраті, так і на стічних водах.

В «Узагальненні результатів дослідження» на основі одержаних експериментальних даних пропонується узагальнена схема, яка відображає деякі фізіолого-біохімічні властивості *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 і можливі перспективи використання цих бактерій у біотехнологіях очищення стічних вод від органічних та неорганічних сполук, а також для продукування водню та генерування електричного струму в мікробному паливному елементі.

Достовірність та наукова новизна отриманих результатів. Дисертаційне дослідження має системний, цілісний, самостійний характер та відзначається високим рівнем наукової новизни. Авторкою вперше визначено кількість фотосинтезувальних пурпурових бактерій у воді озера Яворівське. Виявлено здатність бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 продукувати водень у середовищах зі сукцинатом, цитратом натрію, малатом, глюкозою та крохмалем як джерелами Карбону і донорами електронів. Встановлено здатність бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 використовувати нітрит-іони, сульфід- і тіосульфат-іони як донори електронів під час аноксигенного фотосинтезу. Внаслідок окиснення бактеріями гідроген сульфід та натрій тіосульфату в середовищі нагромаджуються сульфат-іони, а елементна сірка є проміжним метаболітом. Показано, що фототрофні бактерії досліджуваного штаму в експериментальних дослідженнях здатні до генерації молекулярного водню та електричного струму в паливному елементі. Отримані результати дали автору підставити зробити висновки щодо ймовірного впливу фотосинтезувальних пурпурових несіркових бактерій на цикл Нітрогену та перспективи використання бактерій штаму *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 для розробки біотехнології отримання водню, електричного струму.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Результати дисертаційної роботи мають як теоретичне, так і практичне значення, яке полягає у можливості використання пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 для дослідження механізмів генерування електричного струму, продукування водню та біоремедіації стічних вод підприємств харчової промисловості. Геномні послідовності виділеного штаму пурпурових несіркових бактерій внесено у GenBank, сам штам зберігається в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України як *Rhodopseudomonas yavorovii* IMB B-7620 та на нього отримано патент України на корисну модель. Бактерії штаму *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 є перспективними для подальших досліджень з розробки біотехнології очищення забруднених органічними та неорганічними сполуками водних середовищ. Результати дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 7 статей у фахових журналах, із них 2 – у виданні бази Scopus, 1 – Web of Science, 1 патент України на корисну модель і 18 тез доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій.

Оцінка змісту дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, узагальнення отриманих результатів, висновків і додатків. Опубліковані анотації українською та англійською мовами повною мірою відповідають положенням, що викладені в тексті дисертації та не містять даних, які були б відсутні в основному тексті роботи і оформлені відповідно до діючого Порядку присудження наукових ступенів. З аналізу змісту дисертації вбачається дотримання вимог академічної доброчесності в повному обсязі. Робота містить посилання на згадані у тексті джерела інформації, автором дотримано вимоги норм законодавства про авторське право, надано необхідну інформацію про результати наукової діяльності, а також використані методи досліджень.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертантка для досягнення мети і вирішення поставлених задач використала сучасні методи мікробіології, молекулярної біології, аналітичної хімії, статистичного аналізу за допомогою пакету MS Excel 365. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками альтернативних сукупностей даних використано ANOVA. Штам пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 було ідентифіковано за фізіологічними, морфологічними та біохімічними ознаками та на основі аналізу *in silico* нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК. Склад газової фази визначали, використовуючи стандартну методику на газовому хроматографі ЛХМ-8-МД. Для досліджень екзоелектрогенних властивостей бактерій використовували однокамерний мікробний паливний елемент. Комплексне застосування цих методів дозволило вирішити поставлені задачі та отримати достовірні результати. Висновки повною мірою відповідають отриманим результатам, є обґрунтованими та мають наукову новизну.

Дискусійні положення, запитання та побажання щодо змісту дисертації.

Викладені в дисертації результати досліджень, їх аналіз та сформульовані висновки в цілому не викликають принципових зауважень, але разом з тим є запитання до дисертантки та деякі зауваження:

1. У главі 3.1 «Фізико-хімічна характеристика води озера Яворівське та чисельність фототрофних бактерій у ній» для більш повного розуміння екологічної ситуації в цій екосистемі важливо було б знати загальну кількість не лише фототрофних, а й гетеротрофних бактерій. Чи є у вас такі дані?
2. Чим було мотивовано вибір штаму фототрофних пурпурових бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-216 для дослідження?

3. Оскільки бактерії штаму *Rhodopseudomonas* sp. Ya-216 залежать від наявності вітаміну B₁₂, виникає запитання – як вони забезпечують себе цим вітаміном в природних умовах озера, з води якого були віділені?
4. В роботі виявлено, що досліджувані бактерії продукують водень в середовищі з NH₄⁺. Яку роль йон амонію може відігравати в процесі генерації водню та що відомо взагалі про механізм утворення водню у фототрофних несіркових бактерій з літератури?
5. Чому в тексті дисертації водень визначається в відсотках газової фази, а в Додатку В в ммольах H₂ на грам сухої маси за годину?
6. Чи визначали та чи відомий кількісний і якісний вміст органічних сполук при культивуванні фототрофних бактерій досліджуваного штаму в середовищі з стічними водами (до культивування та в процесі культивування)?
7. Отримані результати з продукції водню та електричного струму бажано проаналізувати порівнюючи з даними літератури в розділі Узагальнення результатів дослідження.
8. Свідectvo про розміщення штаму в Депозитарії не є публікацією та не надає права на присвоєння видової назви. Для цього існують діючі правила номенклатури Бактерій і Архей. Автор може лише рекомендувати назву таксона, зроблену у відповідній публікації, а для валідації назви виду потрібно пройти довгий формальний шлях її визнання.

Усі висловлені зауваження та побажання не носять принципового характеру, не стосуються концепції дисертаційного дослідження і не впливають на його загальну позитивну оцінку.

Загальний висновок та оцінка дисертації. Дисертаційна робота Тарабас Ольги Володимирівни «Перетворення сполук сульфуру і нітрогену фототрофними пурпуровими бактеріями, виділеними з техногенно зміненого середовища» є самостійним, завершеним науковим дослідженням. Актуальність теми, обґрунтованість наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації, їх достовірність та наукова новизна, повнота їх викладення в опублікованих працях свідчать про наукову самостійність авторки та її високий рівень теоретичної підготовки. В роботі вперше визначено кількість фотосинтезувальних пурпурових бактерій у воді озера Яворівське. Встановлено здатність ізольованих бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 як представника фототрофних несіркових використовувати нітрит-іони як донор електронів. Описано наукові підходи щодо використання *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 у процесах отримання водню, електричного струму та біоре mediaції стічних вод підприємств харчової промисловості. Отримані результати дали авторці підставити зробити висновки щодо ймовірного впливу фотосинтезувальних пурпурових бактерій на цикл Нітрогену та перспектив використання бактерій штаму *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 в розробці біотехнології отримання водню, електричного струму та біоре mediaції стічних вод підприємств харчової промисловості.

Таким чином, дисертаційна робота Тарабас Ольги Володимирівни відповідає спеціальності 03.00.07 – мікробіологія, вимогам Постанови Кабінету Мініст

рів України від 24 липня 2013 р. № 567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів», наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 "Про затвердження Вимог до оформлення дисертації" і наказу Міністерства освіти і науки України від 23.09.2019 № 1220 «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук», а її авторка Тарабас Ольга Володимирівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України,
проректор з наукової роботи, професор
кафедри мікробіології, вірусології та
біотехнології Одеського національного
університету імені І.І. Мечникова



Володимир ІВАНИЦЯ