

*Голові разової спеціалізованої вченої ради
у Національному університеті біоресурсів
і природокористування України,
доктору ветеринарних наук,
професору Ларисі Шевченко*

ВІДГУК

офіційного опонента

доктора ветеринарних наук, професора **КУХТИНА Миколи Дмитровича**
на дисертацію **МАРТИНЕНКО Ольги Анатоліївни**

на тему: **«Оцінка інтенсивності передачі мікрофлори молока
до антибіотиків у процесі його переробки»,**

подану на здобуття ступеня доктора філософії
а спеціальністю 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза»
галузі знань 21 «Ветеринарна медицина»

Актуальність теми дисертації. У сучасному молочному виробництві гарантування безпечності молочних продуктів є пріоритетним завданням. Виробництво твердих сичужних сирів пов'язане з мікробіологічними небезпечними факторами на різних етапах технологічного процесу. Молоко, як основна сировина, є сприятливим середовищем для розвитку широкого спектру мікроорганізмів. Навіть за дотримання гігієнічних вимог під час виконання технологічних операцій, таких як пастеризація, бактофугування та нормалізація, повністю усунути мікробіологічні небезпечні фактори практично не можливо.

Основними джерелами контамінації під час виробництва твердих сирів є сире молоко, обладнання, виробниче середовище, персонал, допоміжні інгредієнти та закваски. Особливу небезпеку становлять мікроорганізми, здатні утворювати біоплівки на поверхнях обладнання, що ускладнює санітарну обробку. Ефективний контроль безпечності молочних продуктів потребує системного підходу на основі процедур, заснованих на принципах НАССР. Саме вирішенню проблеми встановлення видового складу мікрофлори на всіх етапах виробництва твердого сичужного сиру «Український» – від сирого молока до готового продукту – з використанням технології MALDI-TOF MS та оцінки антибіотико-чутливості мікроорганізмів для визначення потенційних ризиків направлена робота Мартиненко Ольги Анатоліївни.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертація є складовою частиною науково-дослідної тематики кафедри гігієни тварин і харчових продуктів імені професора А. К. Скороходька «Санітарно-гігієнічні аспекти забезпечення безпечності харчових продуктів тваринного походження» (номер державної реєстрації 0116U001299; 2016–2027 рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертація Мартиненко Ольги Анатоліївни характеризується високим рівнем методичного забезпечення, чіткою логікою побудови дослідження та відповідністю поставленим меті й завданням. Здобувачка використала комплекс сучасних експериментальних методів. Усі етапи дослідження логічно послідовні, ретельно проаналізовані й узагальнені.

Висновки та рекомендації, сформульовані в дисертації, базуються на аналізі фактичного матеріалу, отриманого в результаті власних експериментальних досліджень.

Вони демонструють високий рівень обґрунтованості, наукової новизни та практичної значущості. Об'єкт, предмет і методи дослідження повністю відповідають тематиці та науковому рівню дисертації щодо визначення інтенсивності передачі стійкості мікрофлори до антибіотиків на різних етапах виробництва твердого сичужного сиру «Український».

Достовірність основних наукових положень, висновків проведених наукових досліджень та одержаних результатів. Дисертація Мартиненко Ольги Анатоліївни за змістом, структурою та оформленням повністю відповідає вимогам 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 № 44 від 12 січня 2022 року.

Сформульовані авторкою основні наукові положення, висновки та рекомендації базуються на достовірних експериментальних даних, отриманих у результаті коректно спланованих і проведених досліджень відповідно до поставлених п'яти завдань. У роботі використано сучасні інформативні методи аналізування, статистичну обробку отриманих результатів з визначенням рівнів вірогідності, здійснено опрацювання значної кількості актуальних українських і закордонних наукових джерел. Це забезпечило належний рівень теоретичного узагальнення та ґрунтовність висновків.

Теоретичні положення та практичні рекомендації, сформульовані у дисертації, є науково обґрунтованими та відображають виявлені експериментальні закономірності.

Отже, основні положення, висновки та результати дисертаційного дослідження Мартиненко Ольги Анатоліївни є достовірними й заслуговують на наукове визнання.

Новизна основних наукових положень, висновків, проведених наукових досліджень та одержаних результатів. Вперше проведено виділення та ідентифікація мікроорганізмів твердого сичужного сиру «Український» на всіх основних етапах його виробництва – від сирого молока до готового продукту – із застосуванням методу MALDI-TOF MS та визначення чутливості виділених мікроорганізмів до антибіотиків.

Встановлено збереження стійкості умовно-патогенних бактерій до антибіотиків після термічної обробки (бактофугування та пастеризація) і в готовому продукті, що свідчить про їх потенційний ризик для безпечності молочних продуктів.

Виявлено наявність повторної контамінації продукту стійкими до антибіотиків мікроорганізмами за рахунок технологічного обладнання, що підкреслює необхідність вдосконалення санітарно-гігієнічного контролю і періодичного мікробіологічного моніторингу на підприємствах молочної промисловості.

Вперше проведено оцінку динаміки стійкості мікроорганізмів до антибіотиків на різних технологічних етапах виробництва сиру, що дозволяє визначити критичні контрольні точки і розробити практичні рекомендації щодо зниження ризику переносу стійкої до антибактеріальних засобів мікрофлори у готові молочні продукти.

Оцінка структури та змісту роботи. Дисертація складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків і пропозицій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації викладено на 163 сторінках, робота ілюстрована 26 таблицями і 3 рисунками. Список використаної літератури нараховує 206 джерел, з них 200 – латиницею.

Анотація (с. 2–10). Викладення анотації узагальнює інформацію про отримані результати випробувань та відповідає результатам експериментальних досліджень

дисертації. Перелічено список опублікованих праць за темою дисертації, описано участь здобувача до кожної публікації (с. 11–14).

Вступ (с. 19–24). Здобувачка у цьому розділі обґрунтовано подала актуальність теми дисертації, зв'язок роботи з науковими програмами, мету і завдання, методи дослідження, новизну та практичне значення одержаних результатів, особистий внесок здобувачки, апробацію результатів дослідження дисертації на науково-практичних конференціях різного рівня, структуру й обсяг роботи. Вступна частина інформативно наповнена, написана лаконічно, достатньо резюмована.

Розділ 1. Огляд літератури (с. 25–42) складається з п'ятих підрозділів та підрозділом щодо заключення з огляду літератури, у яких здобувачка аналізує дані літератури щодо стану окресленої проблеми, зокрема здобувачка виокремила нез'ясовані питання щодо ролі мікрофлори молока в системі оцінки мікробіологічної безпечності; умов використання антибіотиків у молочному скотарстві та вплив їх на формування антибіотикорезистентної мікрофлори; про клінічно значимі мікроорганізми, що здатні до формування та передачі антибіотикорезистентності; про механізми передачі стійкості до антибіотиків між мікроорганізмами у харчових екосистемах; про мікрофлору молока та антибіотикорезистентність у контексті технологічних процесів. Текст розділу написано доступно, закінчується узагальненням до розділу, що підкреслює вибір теми дисертаційного дослідження, поставлену мету і завдання для її виконання.

Розділ 2. Матеріали та методи досліджень (с. 43–51). У розділі здобувачкою обґрунтовано вибір напрямку досліджень, загальну схему досліджень, описано методики, що були застосовані для вирішення окреслених завдань, дослідження виконувалися на кафедрі гігієни тварин і харчових продуктів імені професора А. К. Скороходька факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України. Зразки збірного сирого молока відбирали на ТОВ «Гайсинський молокозавод», який розташований у м. Гайсин Вінницької області. Молоко-сировина надходила з п'яти молочних ферм. Технологічні потужності підприємства дозволяють щомісяця виробляти 300 тонн твердих і 180 тонн м'яких сирів, 540 тонн вершкового масла та спреїв, а також 360 тонн сухих молочних продуктів. На потужності впроваджена система управління безпечністю харчових продуктів відповідно до вимог міжнародного стандарту ISO 22000.

Методики випробувань, які подані у дисертації є класичними і при їх застосуванні можна отримати об'єктивні результати, так і застосовуються новітні, зокрема мас-спектрометричні (MALDI-TOF MS ідентифікація). Також використано мікробіологічні методи (виділення та культивування мікроорганізмів), метод диско-дифузійного тесту для визначення чутливості до антибактеріальних препаратів, статистичні методи обробки результатів. Застосування цих методів дало можливість на глибокому фундаментальному та аналітичному рівні розкрити суть отриманих результатів. Отже, матеріали та методи досліджень є достатніми для досягнення мети роботи.

Розділ 3. Результати досліджень (с. 52–97) складається з трьох підрозділів.

У першому підрозділі «**Видовий склад мікрофлори, ізолюваної на різних етапах виробництва**», який включає вісім окремих підрозділів дисертанткою детально проведено кількісний і якісний склад мікробіоти та отримано наступні результати. Домінуючі бактерії на початкових етапах (сире молоко до бактофугування): *E. coli* (100 %), *Streptococcus uberis*, *S. aureus*, *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus faecalis*. Значна частина мікрофлори має фекальне походження або є збудниками маститу. Бактерії, що виживають після пастеризації: термостійкі та спорові *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*), а також

окремі грампозитивні коки – *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus gallolyticus*, *Kurthia gibsonii*. У розсолі для засолювання сиру виявлено *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* як до, так і після пастеризації. Деякі бактерії виявляються лише після пастеризації, зокрема, *Enterobacter xiangfangensis*, що свідчить про можливе постпастеризаційне обсіменіння. Збереження та поява мікроорганізмів у розсолі підкреслює необхідність контролю безпечності та якості не лише молока, а й усіх допоміжних середовищ під час виробництва сиру. Бактерії, що виявляються у кінцевому продукті (готовий сир): *Klebsiella pneumoniae* (100 %), *Acinetobacter baumannii*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium flavesens*, *Staphylococcus hominis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Enterobacter asburiae*, ймовірно, через повторну контамінацію або циркуляцію у виробничому середовищі. Потенційні ризики для споживачів: наявність кишкової мікрофлори (*E. coli*), збудників маститу (*S. aureus*, *Streptococcus uberis*), клінічно значущих опортуністичних патогенів (*K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*), а також спорових термостійких *Bacillus* може призвести до харчових інфекцій, інтоксикацій і ризику бактеріальної контамінації готового продукту.

У другому підрозділі «**Динаміка стійкості до антибактеріальних препаратів окремих видів виділених бактерій на етапах виробництва твердого сичужного сиру**» автором виявлено, що *E. coli* у розсолі до пастеризації мала лише помірну резистентність до доксицикліну. До інших антибактеріальних препаратів вона була чутлива. Після пастеризації *E. coli* у розсолі залишалася чутливою до ципрофлоксацину, гентаміцину, амікацину та фосфоміцину.

K. pneumoniae, виділена з розсолу до пастеризації, була чутлива до всіх антибактеріальних препаратів, за винятком фосфоміцину. Бактерія, виділена з розсолу після пастеризації, також була стійкою до фосфоміцину та додатково до ампіциліну, але чутлива до інших тестованих антибіотиків. Подібна картина виявлена і у готовому продукті. *A. baumannii* була чутливою до випробовуваних антибактеріальних препаратів таких груп: фторхінолони, тетрациклінові антибіотики, аміноглікозиди та триметоприм. З групи цефалоспоринів бактерія була чутлива до цефалексину та цефепіму, але стійка до цефотаксиму. Бактерія демонструвала помірну чутливість до амікацину та фосфоміцину.

У третьому підрозділі «**Аналіз ризиків виробництва твердого сичужного сиру «Український»**» показано, що найбільший рівень мікробіологічного ризику пов'язаний із присутністю *E. coli*, яка розглядається як індикатор санітарного стану виробництва та можливого фекального забруднення. Середній рівень ризику пов'язаний із присутністю умовно-патогенних бактерій, таких як *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* та *Enterococcus faecalis*. Низький рівень ризику характерний для технологічної мікрофлори, яка не становить значної небезпеки для здоров'я споживачів. Дисертантка стверджує, що мікробіологічні ризики під час виробництва твердих сичужних сирів можуть формуватися на різних етапах технологічного процесу. Основними джерелами контамінації є сире молоко, технологічне обладнання, виробниче середовище та допоміжні матеріали, зокрема розсіл для засолювання сиру. Також підкреслено необхідність постійного мікробіологічного моніторингу молока-сировини, проміжних продуктів та допоміжних середовищ, а також дотримання санітарно-гігієнічних вимог на всіх етапах виробництва. Впровадження ефективної системи менеджменту безпечності харчових продуктів на основі процедур, заснованих на принципах НАССР, дозволить знизити ризик контамінації сиру небажаною мікрофлорою та забезпечить безпечність готового продукту.

Результати, які висвітлені у розділі 3 здобувачкою повністю розкривають мету роботи та окреслюють її ключові положення. Оцінюючи цей розділ у цілому, слід зазначити,

що результати дослідження комплексні, систематизовані, узагальнені в таблицях і рисунках, логічно описані, закінчуються проміжними висновками.

Четвертий розділ «Аналіз та обговорення результатів досліджень» (с. 98–126). Здобувачка узагальнила усі отримані результати досліджень та порівняла їх із даними літературних джерел інших науковців, та зробила при цьому власні аргументовані висновки. Матеріал розділу добре опрацьований та в узагальненому вигляді вказує на те, що здобувачка досягла поставленої мети та вирішила встановлені завдання.

Висновки (с. 127–129). За отриманими результатами дисертації зроблено 12 висновків, які повністю відповідають суті результатів наукових випробувань.

Пропозиції виробництву (с. 130) сформовані двома пунктами, які спрямовані на підвищення мікробіологічної безпечності молока сирого та твердих сирів

Список використаних джерел. Список використаних джерел містить 206 найменувань. Представлена література відповідає напряду дослідженням дисертації та значна частина першоджерел, використаних у дисертації, опублікована протягом останнього десятиріччя.

Практичне значення результатів одержаних досліджень. Вперше проведено комплексну оцінку мікробіоти твердого сичужного сиру «Український» на всіх основних етапах виробництва – від сирого молока до готового продукту – із застосуванням технології MALDI-TOF MS та визначенням антибіотикочутливості виділених штамів. Встановлено, що у готовому продукті зберігаються до 15 % стійких до антибіотиків умовно-патогенних бактерій, що дозволяє оцінювати потенційні ризики їх поширення через харчові продукти.

Проведені дослідження показали, що регулярний контроль за санітарним станом обладнання та проведення мікробіологічних скринінгів на етапах пастеризації молока, пресування та дозрівання сиру зменшує повторну контамінацію сирів резистентними штамми на 40–50 %. Виявлено, що технологічне обладнання є основним джерелом повторного обсіменіння мікроорганізмами, тому їх періодичне видалення та дезінфекція дозволяють поліпшити безпечність готового продукту.

Отримані результати можуть бути використані для розроблення нормативних рекомендацій щодо контролю мікробіологічної безпечності твердих сичужних сирів на молокопереробних підприємствах, зокрема щодо моніторингу антибіотикорезистентності мікроорганізмів та оцінки ефективності санітарної обробки обладнання. Це сприятиме зниженню ризику поширення потенційно небезпечних бактерій через харчові продукти та підвищенню безпечності сирів для споживача.

Враховуючи сказане, можна зробити висновок, що рецензована робота є актуальною в практичному аспекті для фахівців ветеринарної медицини та операторів ринку – виробників сирів.

Повнота викладення результатів дисертації в опублікованих наукових працях. За темою дисертації опубліковано 8 наукових праць з яких 2 статті у періодичних наукових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних Web of Science Core Collection та/або Scopus, стаття у науковому виданні, включеному до Переліку наукових фахових видань України, 5 тез наукових доповідей.

Особистий внесок здобувачки. Здобувачка організувала і безпосередньо провела експериментальні дослідження щодо оцінки санітарної безпечності твердих сичужних сирів, провела мікробіологічний аналіз на наявність санітарно-показових та умовно-патогенних мікроорганізмів, таких як *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* та інших клінічно значущих бактерій. Виконано мікробіологічні дослідження з використанням технології MALDI TOF MS на різних етапах виробництва сиру, проведено статистичну обробку та аналіз

ризиків. Формулювання висновків і розроблення науково обґрунтованих рекомендацій для виробництва, а також підготовка матеріалів для публікацій у наукових виданнях здійснено спільно з науковим керівником.

Дискусійні, критичні зауваження та запитання до дисертантки. У процесі рецензування дисертації Мартиненко Ольги Анатоліївни виникли запитання до дисертантки, зокрема:

1. Чому саме тверді сичужні сири були обрані предметом дослідження?
2. Які методи ідентифікації мікрофлори були використані під час дослідження та чому саме їх обрано?
3. Які фактори технологічного процесу найбільше впливають на формування мікрофлори твердого сиру?
4. Які потенційні ризики для харчової безпеки пов'язані зі стійкістю мікроорганізмів до антибіотиків у молоці та сири?
5. Які поживні середовища використовувалися для культивування мікроорганізмів?
6. Як результати дослідження можуть бути використані для вдосконалення технології виробництва твердих сирів?
7. Які сучасні методи контролю стійкості мікроорганізмів до антибіотиків використовуються у харчовій мікробіології?
8. Які мікроорганізми найчастіше проявляли резистентність до антибактеріальних препаратів?

У дисертації трапляються деякі граматичні, технічні та стилістичні помилки та невдалі вислови.

Слід зауважити, що вказані недоліки та дискусійні питання не знижують цінності одержаних результатів та методичного рівня виконання дисертації.

Висновок. Дисертація на тему: «Оцінка інтенсивності передачі мікрофлори молока до антибіотиків у процесі його переробки» є завершеною науково-дослідною роботою, яка за оформленням, актуальністю, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» 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 № 44 від 12 січня 2022 року, а її авторка Мартиненко Ольга Анатоліївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» галузі знань 21 «Ветеринарна медицина».

Офіційний опонент завідувач кафедри харчової біотехнології і хімії Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя, доктор ветеринарних наук, професор МИКОЛА КУХТИН