

## РЕЦЕНЗІЯ

доцента кафедри гігієни тварин і харчових продуктів імені професора А. К. Скороходька Національного університету біоресурсів і природокористування України, кандидата ветеринарних наук, старшого дослідника **МІДИК Світлани Вікторівни** на дисертацію **МАРТИНЕНКО Ольги Анатоліївни** на тему: «Оцінка інтенсивності передачі стійкості мікрофлори молока до антибіотиків у процесі його переробки», подану на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» галузі знань 21 «Ветеринарна медицина»

**Актуальність теми дисертаційного дослідження.** Забезпечення мікробіологічної безпечності молочної продукції, як невід'ємного елемента масового споживання, є стратегічним завданням державної політики України та фундаментальним аспектом глобальної концепції «Єдине здоров'я» (One Health). Зважаючи на високу популярність твердих сичужних сирів серед населення, ветеринарно-санітарний контроль технологічних ланцюгів їхнього виробництва потребує постійного вдосконалення.

Особливу загрозу для охорони здоров'я становить стрімке поширення антибіотикорезистентності серед патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів у харчовому середовищі. Сировина та готова продукція можуть слугувати резервуаром для клінічно значущих бактерій родів *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* та *Acinetobacter baumannii*. Зазначені ізоляти мають високий потенціал до формування полірезистентності та персистенції у вигляді стійких біоплівки на контактних поверхнях обладнання. Формування таких штамів зумовлене як інтенсивним застосуванням протимікробних препаратів у тваринництві, так і біологічною адаптацією бактерій до дезінфектантів в умовах переробних підприємств.

Експериментально доведено, що традиційні критичні технологічні операції (пастеризація, бактофугування та санітарна обробка) не завжди забезпечують повне знешкодження стійких генотипів. Водночас чинний виробничий контроль на підприємствах молочної промисловості переважно орієнтований на регламентовані санітарно-показові групи мікроорганізмів (БГКП, МАФМ). Така селективність моніторингу не відображає реальних ризиків циркуляції патогенів.

Незважаючи на значну кількість наукових праць, присвячених загальній мікробіології сирів, закономірності збереження, трансформації та міграції антибіотикостійких бактерій на етапах виробництва і тривалого дозрівання твердих сирів залишаються фрагментарними. Це зумовлює високу актуальність дисертаційного дослідження Мартиненко Ольги Анатоліївни, спрямованого на розширення спектра мікробіологічного моніторингу та наукове обґрунтування нових підходів до управління ветеринарно-санітарними ризиками в молочній промисловості.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконувалася в рамках науково-дослідної роботи кафедри гігієни тварин і харчових продуктів імені професора А. К. Скороходька Національного університету біоресурсів і природокористування України «Санітарно-гігієнічні аспекти забезпечення безпечності харчових продуктів тваринного походження» (номер державної реєстрації 0116U001299).

**Мета дисертаційного дослідження** стосувалася встановлення видового складу мікрофлори на всіх етапах виробництва твердого сичужного сиру «Український» – від сирого коров'ячого молока до готового продукту – із використанням технології MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry),

визначення антибіотикочутливості мікроорганізмів та оцінки потенційних ризиків для безпечності готового продукту.

**Структура і зміст дисертації.** Дисертація складається з анотації, вступу, чотирьох розділів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел та додатків. Дисертація містить 26 таблиць і 3 рисунки. До списку використаних джерел входить 206 найменувань. Загальний обсяг роботи становить 163 сторінки.

У **вступі** висвітлено усі традиційні структурні питання, зокрема, інформація про актуальність дисертаційного дослідження, зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, сформульовано мету та основні завдання. Крім того, авторка акцентує увагу, що поширення резистентних штамів мікроорганізмів відбувається як через застосування ветеринарних препаратів на фермах, так і внаслідок біологічної адаптації бактерій до санітарної обробки на переробних підприємствах. Оскільки традиційні методи контролю обмежуються лише базовими санітарно-показовими групами (БГКП, МАФАМ), це не гарантує захисту від транзиту небезпечних ізолятів. Через брак системних досліджень динаміки та трансформації антибіотикостійкої мікрофлори під час дозрівання твердих сирів, представлена дисертація є надзвичайно актуальною.

У першому розділі **«Огляд літератури»** здобувачкою проаналізовано сучасні дані наукової літератури щодо ролі мікрофлори молока в системі оцінки мікробіологічної безпечності; проведено системний теоретичний аналіз мікрофлори молока та ветеринарно-санітарних ризиків її контамінації, висвітлено передумови й молекулярно-генетичні механізми формування антибіотикорезистентності, а також детально обґрунтовано закономірності виживання, біологічні характеристики та особливості персистенції клінічно значущих бактерій у вигляді біоплівки під впливом технологічних процесів молочної промисловості. Цей розділ вдало завершується пунктом «Висновки до розділу 1».

Другий розділ **«Матеріали і методи»** інформує про особливості відбору зразків та проведення досліджень. У цьому розділі також надається детальна інформація про етапи виконання досліджень, відбір і підготовку зразків молока; детально описано реактиви та витратні матеріали. Детально розписано методики проведення досліджень такі як метод мікробіологічного скринінгу, метод секторних посівів та диско-дифузійний метод. В кінці розділу зазначено методологію статистичної обробки одержаних результатів.

У третьому розділі **«Результати дослідження»** представлено видовий склад мікрофлори, ізольованої на різних етапах виробництва сиру (молока-сировини до і після бактофугування та пастеризації); розсолу і готового продукту – твердого сичужного сиру «Український». Встановлено стійкість окремих клінічно значущих мікроорганізмів до антибіотиків на різних етапах технологічного процесу виробництва сиру, що дозволило проаналізувати динаміку формування мікрофлори та її стійкості до антибактеріальних засобів – від сирого молока до готового продукту – та оцінити потенційні мікробіологічні ризики.

Четвертий розділ **«Узагальнення результатів досліджень та їх аналіз»** присвячено всебічному аналізу отриманих результатів у порівнянні та з посиланням на дані літератури. У цьому розділі представлено наукове пояснення та порівняння з літературними даними результатів щодо виявлення та ідентифікації мікробіологічного складу молока-сировини, яка характеризується високим різноманіттям та їх вплив на сировину і готовий продукт. Також описані потенційно патогенні та технічно значущі мікроорганізми. Розділ 4 складається із 7 підрозділів, після кожного з них проведено узагальнення матеріалу та наведені відповідні висновки.

Результати дисертаційного дослідження узагальнено у вигляді 12 лаконічних і обґрунтованих висновків, які витікають із мети та завдань роботи. Крім того, наукова робота містить практичні пропозиції для виробників.

**Значення одержаних результатів для науки й практики та рекомендації щодо їх можливого використання.** Рецензована робота має вагоме фундаментальне та прикладне значення, оскільки вперше за допомогою високоточної мас-спектрометрії MALDI-TOF MS проведено виділення та ідентифікація наявних мікроорганізмів твердого сичужного сиру «Український» на всіх етапах його виробництва – від сирого молока до готового продукту. Доведено факт персистенції термостабільних та мультирезистентних бактерій після бактофугування і пастеризації сировини, а також у виявленні вторинного обсіменіння продукту резистентними штамами з поверхонь обладнання. Практична цінність отриманих результатів підтверджується кількісними даними, згідно з якими регулярний мікробіологічний скринінг критичних етапів виробництва та оптимізація дезінфекції дозволяють знизити повторну контамінацію сирів на 40–50 %. Здобуті авторкою дані є підґрунтям для розроблення нових галузевих нормативних рекомендацій щодо моніторингу антибіотикорезистентності та оцінки ефективності санітарних обробок на молокопереробних підприємствах. 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.

**Повнота викладення матеріалів досліджень в публікаціях, захищених за темою дисертації.** Результати проведених досліджень повністю відображені у 8 наукових працях, 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.

**Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності.** Кваліфікаційна наукова робота є самостійним дослідженням, що містить аргументовані висновки та рекомендації, підготовлені авторкою для публічного захисту. Усі використані ідеї, результати та фрагменти текстів інших авторів супроводжуються відповідними посиланнями на першоджерела. У роботі відсутнє неправомірне запозичення чужих наукових напрацювань без належного цитування, що свідчить про дотримання принципів академічної доброчесності. Таким чином, у дисертаційному дослідженні Мартиненко Ольги Анатоліївни не виявлено порушень академічної доброчесності.

**Питання для дискусійного обговорення та недоліки дисертації щодо її змісту та оформлення.** У цілому позитивно оцінюючи роботу, можна відзначити такі зауваження та дискусійні питання:

1. У дисертації авторка зазначає, що *Acinetobacter baumannii* після етапу дозрівання сиру «частково відновлювала чутливість до амікацину та фосфоміцину». Це цікаве спостереження. Хотілося б почути трактування авторки: чи пов'язано це з фізіологічним стресом клітин під дією низького рН та високої концентрації солі в сирі? Чи можливо, що це пов'язано зі специфікою диско-дифузійного методу для цього виду на даному етапі?

2. З тексту анотації: «*E. coli* виявляли у високій концентрації навіть після пастеризації розсолу...». Відомо, що *Escherichia coli* є мезофільною бактерією, яка повністю гине за класичних режимів пастеризації. Які саме температурно-часові режими пастеризації розсолу застосовували на підприємстві під час експерименту? Чи дійсно виявлена *E. coli* є термотолерантним мутантом, чи такий результат вказує на грубе порушення роботи

пастеризаційного обладнання або миттєву реконтамінацію розсолу відразу після виходу з теплообмінника?

3. У дисертації авторка зазначає: «Для кожного виду досліджували по 15 ізолятів у трьох повторностях, загалом 180 ізолятів». Поясніть, будь ласка, математичну схему формування вибірки для диско-дифузійного методу (ДДМ). Яка точна кількість індивідуальних видів бактерій пройшла оцінку антибіотикочутливості, і як саме розподілилися ці 180 ізолятів між ними?

4. З тексту роботи: «Особливу небезпеку становлять мікроорганізми, здатні утворювати біоплівки... Рекомендації щодо ... запобігання утворенню біоплівок». У своїй роботі Ви заявляєте про небезпеку біоплівок на обладнанні та даєте рекомендації щодо боротьби з ними. Проте серед методів дослідження (розділ 2) не зазначені методи їх вивчення. На основі яких безпосередньо Ваших експериментальних даних базуються висновки про утворення біоплівок виділеними штамами *Klebsiella* чи *Acinetobacter*?

5. У тексті дисертації заявлено, що «...після пастеризації ізоляти *E. coli* залишалися чутливими переважно до ципрофлоксацину». Чи виявили Ви статистично значущу кореляцію між наявністю мультирезистентності у штамів *E. coli* та їхньою термостабільністю? Чи можна стверджувати, що бактерії, які мають гени резистентності до кількох класів антибіотиків, одночасно мають вищу резистентність до пастеризації за рахунок, наприклад, стресових білків?

6. Чи є науково доведена інформація, що виявлені мікроорганізми якимось чином впливають на смакові якості сиру?

7. Які переваги та недоліки традиційних мікробіологічних методів дослідження?

8. По тексту рідко, але зустрічаються, незначні стилістичні та технічні помилки.

9. У списку літератури дублюються джерела під № 29 і 30, 44 і 48, 128 і 129.

Водночас акцентовані у питаннях дискусійні моменти дисертаційного дослідження не впливають на наукову та практичну цінність одержаних авторкою результатів і не знижують високої позитивної оцінки наукової роботи.

**Загальний висновок.** Дисертація є завершеною, самостійно підготовленою кваліфікаційною науковою працею, в якій отримано нові науково обґрунтовані та практично цінні результати, що вирішують важливе наукове завдання. Актуальність обраної теми дисертації, ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, новизна та повнота викладення в опублікованих наукових працях повністю відповідають вимогам Міністерства освіти і науки України. Таким чином, дисертація на тему: «Оцінка інтенсивності передачі стійкості мікрофлори молока до антибіотиків у процесі його переробки» відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», 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 автор Мартиненко Ольга Анатоліївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» галузі знань 21 «Ветеринарна медицина».

**Рецензент доцент кафедри гігієни тварин і харчових продуктів імені професора А. К. Скороходька Національного університету біоресурсів і природокористування України, кандидат ветеринарних наук, старший дослідник Світлана МІДИК**