

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

МАРТИНЕНКО ОЛЬГА АНАТОЛІВНА

УДК 637.1:604.4:615.33

ДИСЕРТАЦІЯ

**Оцінка інтенсивності передачі стійкості мікрофлори молока до
антибіотиків у процесі його переробки**

212 – «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза»

Подається на здобуття наукового ступеня доктор філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело _____ О.А. Мартиненко

Науковий керівник:
Якубчак Ольга Миколаївна,
доктор ветеринарних наук, професор

Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

Мартиненко О.А. Оцінка інтенсивності передачі стійкості мікрофлори молока до антибіотиків у процесі його переробки – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2025.

У сучасному молочному виробництві гарантування безпечності молочних продуктів є пріоритетним завданням. Виготовлення 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 HACCP.

Метою дослідження було встановити видовий склад мікрофлори на всіх етапах виробництва твердого сичужного сиру «Український» – від сирого молока до готового продукту – з використанням технології MALDI-TOF MS та оцінити антибіотикочутливість мікроорганізмів для визначення потенційних ризиків.

Мікробіологічні дослідження виконували методом накопичення та інокуляції на диференційно-діагностичних середовищах для аеробних і анаеробних мікроорганізмів із подальшою видовою ідентифікацією MALDI-

TOF MS. Відбір проб проводили на семи етапах технологічного процесу: сире молоко, молоко до та після бактофугування з нормалізацією, пастеризована суміш, суміш перед коагуляцією, сир після пресування та після дозрівання. Дослідження виконували у трьох повторностях; загалом проаналізовано 405 зразків.

На першому етапі сире молоко визначено як основне джерело первинної мікробної контамінації. Виявлено різні бактерії, зокрема, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis* та *Enterococcus faecium*. Ймовірність їх появи під час технологічного процесу була оцінена як висока (>66 % зразків) для *E. coli* та *S. aureus*, середня (33–50 %) – для *E. faecalis*, *E. cloacae* та *K. pneumoniae*, низька (17–33 %) – для інших представників умовно патогенної мікрофлори.

Після бактофугування та пастеризації частина мікроорганізмів елімінується, проте деякі залишаються або потрапляють до продукту повторно під час вторинної контамінації. Наприклад *E. coli* зберігалася у значній кількості після бактофугування, що підкреслює необхідність контролю ефективності технологічних операцій. На етапі нормалізації та формування сирної маси можливе повторне інфікування через контакт із обладнанням, персоналом та допоміжними матеріалами.

Розсіл для засолювання сирів також може бути джерелом контамінації. Дослідження показали наявність *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* та ентерококів у розсолі. *E. coli* виявлялася у високій концентрації навіть після пастеризації розсолу, що підкреслює важливість санітарно-гігієнічного контролю ємностей та обробки розсолу.

Упродовж дослідження виділено та ідентифіковано 43 види мікроорганізмів на різних етапах виробництва. Кількісний та видовий склад мікрофлори змінювався залежно від технологічного етапу. Окремі мікроорганізми, такі як *E. coli* та *Acinetobacter baumannii*, присутні у сирому молоці, зберігалися до кінцевого продукту. У готовому твердому сирі ізольовано

18 видів мікроорганізмів, серед яких *E. coli*, *K. pneumoniae* та *A. baumannii*, що становить потенційний ризик для безпечності продукту.

Антибіотикочутливість ізольованих культур визначали диско-дифузійним методом. Для кожного виду досліджували по 15 ізолятів у трьох повторностях, загалом 180 ізолятів. *E. coli* проявляла мультирезистентність до фторхінолонів, пеніцилінів, цефалоспоринів, тетрациклінів, аміноглікозидів, триметоприму та фосфоміцину. На різних етапах виробництва зберігалася стійкість до гентаміцину та амікацину, помірна стійкість – до доксицикліну; після пастеризації ізоляти залишались чутливими переважно до ципрофлоксацину.

Klebsiella pneumoniae з розсолу та готового сиру була стійкою до ампіциліну та фосфоміцину. *Acinetobacter baumannii* із сирого молока та кінцевого продукту стійка до цефотаксиму, після дозрівання частково відновлювала чутливість до амікацину та фосфоміцину.

Для оцінки рівня ризику використано матрицю ймовірності та складності наслідків, що дозволило класифікувати рівень ризику як низький, середній, високий або критичний. Найвищий ризик виявлено на початковому етапі виробництва – у сирому молоці; на подальших стадіях ризику знижуються завдяки термічній обробці та санітарно-гігієнічним заходам, але не усуваються повністю.

Оцінка ризиків дозволила виділити критичні контрольні точки: пастеризація (виживання термостійких бактерій, порушення температурних режимів), пресування та формування сирної маси (вторинна контамінація обладнанням або розсолом), дозрівання (можливий розвиток умовно-патогенних бактерій).

Виявлення умовно-патогенних бактерій, таких як *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. faecalis* підтверджує, що вторинна контамінація може відбуватися через контакт із обладнанням та допоміжними матеріалами. Це підкреслює необхідність регулярного мікробіологічного моніторингу та високих санітарних стандартів.

Результати дослідження дозволяють сформулювати рекомендації щодо зниження мікробіологічних ризиків: посилення контролю якості сирого молока, дотримання режимів пастеризації, підтримка належного санітарного стану обладнання та форм для пресування, контроль розсолу для засолювання, запобігання утворенню біоплівок.

Регулярний мікробіологічний моніторинг на всіх етапах виробництва дозволяє своєчасно виявляти ризики та запобігати потраплянню небезпечних мікроорганізмів у продукт. Отримані дані допомагають уточнити критичні контрольні точки у системі НАССР та оптимізувати програми виробничого контролю на підприємствах молочної промисловості.

Практичне значення дослідження полягає у визначенні джерел мікробіологічної контамінації та формуванні рекомендацій для підвищення безпечності молочних продуктів. Встановлено, що сире молоко є основним джерелом первинної контамінації, а етапи пресування, засолювання та дозрівання – потенційними точками вторинного інфікування. Розсіл також виступає додатковим фактором перенесення мікроорганізмів у сирну масу.

Таким чином, результати дослідження підтверджують необхідність комплексного підходу до забезпечення мікробіологічної безпечності твердих сирів: контроль якості молока-сировини, дотримання термічних режимів, запобігання вторинній контамінації, регулярний моніторинг мікрофлори та оптимізація НАССР.

Отримані дані можуть бути використані для удосконалення систем управління безпечністю харчових продуктів, підвищення ефективності санітарної обробки обладнання, контролю розсолу та оптимізації мікробіологічного моніторингу. Це дозволяє знизити ризик контамінації та забезпечити належну безпечність і якість готових продуктів.

Результати демонструють циркуляцію потенційно патогенних та стійких до антибіотиків мікроорганізмів у процесі виробництва сиру «Український», що підкреслює необхідність удосконалення гігієнічних вимог, ретельного

контролю та впровадження системного моніторингу стійкості мікроорганізмів до антибіотиків.

Ключові слова: молоко, твердий сир, мікроорганізми, антибіотики, стійкість мікроорганізмів, MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

Martynenko O.A. Assessment of the intensity of milk microflora transfer and antibiotic resistance during its processing – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for obtaining the educational-scientific degree of Doctor of Philosophy in the specialty 212 “Veterinary Hygiene, Sanitation, and Expertise.” National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2025.

In modern dairy production, ensuring product safety is a top priority. The production of hard rennet cheeses involves microbiological risks at different stages of the technological process. Milk, as the main raw material, is a favorable environment for a wide range of microorganisms. Even when technological operations such as pasteurization, bactofugation, and standardization are applied, it is impossible to completely eliminate microbiological risks.

The main sources of contamination in hard cheese production are raw milk, equipment, production environment, personnel, auxiliary ingredients, and starter cultures. Microorganisms capable of forming biofilms on equipment surfaces pose particular danger, complicating sanitation procedures. Effective control of product safety requires a systemic approach based on HACCP principles.

The aim of the study was to determine the species composition of microflora at all stages of hard rennet cheese “Ukrainian” production – from raw milk to the final product – using MALDI-TOF MS technology and to assess the antibiotic susceptibility of microorganisms to identify potential risks.

Microbiological studies were performed by accumulation and inoculation on differential diagnostic media for aerobic and anaerobic microorganisms, followed by species identification using MALDI-TOF MS. Samples were collected at seven stages of the technological process: raw milk, milk before and after bactofugation and standardization, pasteurized mixture, mixture prepared for coagulation, pressed cheese, and ripened cheese. Studies were conducted in triplicate, with a total of 405 samples analyzed.

At the first stage, raw milk was identified as the main source of primary microbial contamination. Various bacteria were detected, including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium*. The probability of their occurrence in the technological process was high (>66% of samples) for *E. coli* and *S. aureus*, medium (33–50%) for *E. faecalis*, *E. cloacae*, and *K. pneumoniae*, and low (17–33%) for other representatives of opportunistic microflora.

After bactofugation and pasteurization, part of the microorganisms were eliminated, but some remained or recontaminated the product. For example, *E. coli* persisted in high numbers even after bactofugation, highlighting the need to control the effectiveness of technological operations. During standardization and curd formation, recontamination is possible through contact with equipment, personnel, or auxiliary materials.

The brine used for cheese salting can also be a source of contamination. The study revealed the presence of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, and enterococci in the brine. *E. coli* was found in high concentrations even after brine pasteurization, emphasizing the importance of hygienic control of brine storage and handling vessels.

During the study, 43 species of microorganisms were isolated and identified at different production stages. The quantitative and species composition of microflora varied depending on the technological stage. Certain microorganisms, such as *E. coli* and *Acinetobacter baumannii*, present in raw milk, persisted until the final product. In the finished hard cheese, 18 species were isolated, including *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *A. baumannii*, which pose a potential safety risk.

Antibiotic susceptibility of the isolated cultures was determined using the disk diffusion method. For each species, 15 isolates were studied in triplicate, totaling 180 isolates. *E. coli* exhibited multidrug resistance to fluoroquinolones, penicillins, cephalosporins, tetracyclines, aminoglycosides, trimethoprim, and fosfomycin. At different production stages, resistance to gentamicin and amikacin persisted, with

moderate resistance to doxycycline; after pasteurization, isolates remained mostly sensitive to ciprofloxacin.

Klebsiella pneumoniae isolated from brine and finished cheese was resistant to ampicillin and fosfomycin. *Acinetobacter baumannii* from raw milk and the final product was resistant to cefotaxime, with partial recovery of sensitivity to amikacin and fosfomycin after ripening.

To assess the level of microbiological risk, a probability and severity matrix was used, allowing classification as low, medium, high, or critical. The highest risk was observed at the initial stage—raw milk. At subsequent stages, risks decreased due to thermal processing and sanitary measures but were not completely eliminated.

Risk assessment allowed identification of critical control points: pasteurization (survival of thermotolerant bacteria, temperature deviations), pressing and curd formation (secondary contamination from equipment or brine), ripening (possible development of opportunistic bacteria).

Detection of opportunistic bacteria such as *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, and *E. faecalis* confirms that secondary contamination can occur through contact with equipment and auxiliary materials. This highlights the need for regular microbiological monitoring and adherence to high sanitary standards.

The study results provide recommendations to reduce microbiological risks: strict control of raw milk quality, adherence to pasteurization regimes, maintenance of equipment and mold sanitation, brine monitoring, and prevention of biofilm formation.

Regular microbiological monitoring at all production stages allows timely detection of risks and prevents contamination of the product with hazardous microorganisms. The data help refine critical control points in HACCP and optimize production monitoring programs in dairy enterprises.

The practical significance of the study lies in identifying the main sources of microbial contamination and formulating recommendations to improve product safety. Raw milk is the primary source of contamination, while pressing, salting, and

ripening stages are potential points for secondary contamination. Brine also acts as an additional vector for microorganisms.

Thus, the results confirm the need for a comprehensive approach to ensuring the microbiological safety of hard cheeses: raw material quality control, adherence to thermal regimes, prevention of secondary contamination, regular microflora monitoring, and HACCP optimization.

The findings can be used to improve food safety management systems, enhance equipment sanitation, control brine, and optimize microbiological monitoring. This reduces contamination risk and ensures high quality and safety of the finished product.

The results indicate the circulation of potentially pathogenic and antibiotic-resistant microorganisms during production of hard cheese “Ukrainian,” emphasizing the need to improve hygienic requirements, maintain strict sanitary control, and implement systematic monitoring of microbial antibiotic resistance.

Keywords: milk, hard cheese, microorganisms, antibiotics, resistance of microorganisms, MALDI-TOF MS.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових виданнях інших держав, включених до міжнародної наукометричної бази даних Scopus:

1. Iakubchak, O., **Martynenko, O.**, Taran, T., Pylypchuk, O., Naumenko, T., Tverezovska, N., Menchynska, A., & Stetsyuk, I. (2024). Analysis of the hard rennet cheese microbiota at different stages of the technological process. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 18, 899–918. <https://doi.org/10.5219/2011> (Iakubchak, O. розроблено програму і наукову концепцію дослідження, організовано проведення експериментів. Martynenko O. виконано науковий експеримент, виконано ідентифікацію мікрофлори та її аналіз на різних етапах технологічного процесу, проаналізовано отримані результати та визначено їх наукову новизну й актуальність. Taran T. підготовлено матеріали для публікації. Pylypchuk O. Підготовлені матеріали для оформлення ілюстрацій. Tverezovska N. здійснено статистичну обробку результатів. Naumenko T. проведено контроль якості зразків та їх підготовку для досліджень. Menchynska A. виконано лабораторний відбір та аналіз проб сиру. Stetsyuk I. підготовлено обговорення та висновки до статті).

2. Olha Iakubchak, **Olha Martynenko**, Tetiana Taran, Alina Menchynska, Mykola Nikolaenko, Oleksandr Savchenko, Yevheniia Marchyshyna, Alina Omelian (2025). Susceptibility of microflora to antibacterial drugs at different stages of hard rennet cheese production. *Scifood*, 19(1), 520-536. <https://doi.org/10.5219/scifood.58> (Iakubchak O. M. розроблено програму та концепцію дослідження, організовано проведення експериментів. Martynenko O. A. виконано науковий експеримент, виконано лабораторний аналіз мікроорганізмів на чутливість до антибактеріальних засобів, проаналізовано результати та визначено їх новизну й актуальність. Taran T. B. здійснено відбір та підготовку зразків сиру для аналізу мікрофлори. Menchynska A. проведено статистичну обробку результатів дослідження. Nikolaenko M. підготовлено і оформлено таблиці. Savchenko O. підготовлено і оформлено ілюстрації. Marchyshyna Y. виконано

контроль якості досліджуваних зразків. *Omelian A. підготовлено обговорення та висновки до статті).*

Статті у наукових фахових виданнях України, які цитуються в міжнародних наукометричних базах:

1. Якубчак О. М., Мартиненко О. А., Таран Т. В. Мікробіологічний скринінг виробництва твердого сичужного сиру «Український» за використання технології MALDI-TOF. *Таврійський науковий вісник*. 2025. № 145. Ч. 2. С. 288–294. DOI: <https://doi.org/10.32782/2226-0099.2025.145.2.32> (Якубчак О. М. розроблено програму та концепцію дослідження, організовано проведення експериментів. Мартиненко О. А. виконано науковий експеримент, проаналізовано отримані результати та визначено їх новизну й актуальність, виконано відбір та підготовку зразків сиру для мікробіологічного аналізу, проведено лабораторні дослідження. Таран Т. В. підготовлено результати для публікації).

Тези наукових доповідей

1. Якубчак О. М., Мартиненко О. А. Стійкість мікрофлори молока до антибіотиків у процесі виготовлення молочних продуктів. Продовольчі системи України: Повоєнне відновлення та забезпечення сталого розвитку: матеріали Міжнар. науково-практичного форуму, 15-16 травня 2024 р. Харків: ДБТУ, 2024. С. 54-57. (Якубчак О. М. розроблено програму та наукову концепцію дослідження, здійснено наукове керівництво, проаналізовано результати та визначено стійкість мікрофлори молока до антибіотиків у процесі виготовлення молочних продуктів. Мартиненко О. А. проведено науковий експеримент, проаналізовано результати, зроблено аналіз літературних джерел, підготовлено тези доповіді).

2. Мартиненко О. А., Якубчак О. М. Циркуляція мікроорганізмів, стійких до антибактеріальних засобів, під час виробництва молочних продуктів та ризик їх передачі до кінцевого продукту. Актуальні питання ветеринарної медицини: реалії та перспективи: збірник тез доповідей Міжнар. наук.-практ. конф.

науковців, викладачів та аспірантів, 22 травня 2024 р.; Держ. біотехнологічний ун-т. Харків, 2024. С. 216-219. *(Якубчак О. М. розроблено програму дослідження, здійснено наукове консультування та аналіз результатів, визначено ризики передачі мікроорганізмів до кінцевого продукту. Мартиненко О. А. виконано науковий експеримент, проаналізовано результати, проведено аналіз літературних джерел та підготовлено тези доповіді).*

3. Якубчак О. М., **Мартиненко О. А.** Циркуляція мікроорганізмів у процесі виробництва молочних продуктів та їх чутливість до антибіотиків. Збірник матеріалів за підсумками науково-практичної конференції «Актуальні питання сьогодення та післявоєнного відновлення сільського господарства й екології: експертно-аналітичні складові формування продовольчої стратегії України» з нагоди 20-річчя УЛЯБП АПК НУБіП України, 2 жовтня 2023 р.; К.: НУБіП України, 2023. 179 с. *(Якубчак О. М. розроблено концепцію дослідження, визначено мікроорганізми, що циркулюють у процесі виробництва, та встановлено їх чутливість до антибіотиків. Мартиненко О. А. виконано науковий експеримент, проведено аналіз та інтерпретацію результатів, проаналізовано результати, проведено аналіз літературних джерел та підготовлено тези доповіді).*

4. Якубчак О. М., **Мартиненко О. А.** Ризик передачі антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів, які циркулюють у харчовому ланцюгу молочних продуктів. Матеріали Міжнародної конференції «Єдине здоров'я: соціальний вимір», 3 грудня 2024. – К.: НУБіП України, 2024 . – 73 с. *(Якубчак О. М. розроблено програму дослідження, та визначено ризик передачі антибіотикорезистентних штамів. Мартиненко О. А. проведено аналіз результатів, проведено аналіз літературних джерел та підготовлено тези доповіді).*

5. Якубчак О. М., **Мартиненко О. А.** Оцінка впливу технологічних процесів на штами мікроорганізмів, що циркулюють у процесі виробництва молочних продуктів. Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в

умовах євроінтеграції : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., м. Одеса, 14–15 верес. 2023 р. Одеса, 2023. 200 с. *(Якубчак О. М. розроблено концепцію дослідження, та визначено вплив технологічних процесів на штами мікроорганізмів. Мартиненко О. А. виконано науковий експеримент, здійснено аналіз отриманих результатів, проведено аналіз літератури та підготовлено тези доповіді).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	25
1.1. Мікрофлора молока в системі оцінки мікробіологічної безпечності.	25
1.2. Неналежне використання антибіотиків у молочному скотарстві та вплив на формування антибіотикорезистентної мікрофлори	28
1.3. Клінічно значимі мікроорганізми, що здатні до формування та передачі антибіотикорезистентності.....	32
1.4. Механізми передачі стійкості до антибіотиків між мікроорганізмами у харчових екосистемах.....	34
1.5. Мікрофлора молока та антибіотикорезистентність у контексті технологічних процесів.....	37
1.5.1. Вплив технологічних процесів на мікробіологічний склад молока.	38
1.5.2. Біоплівки як фактор виживання та передачі антибіотикорезистентності.....	38
1.5.3. Основні мікроорганізми молока та їх характеристики.....	38
1.5.4. Антибіотикорезистентність у молочній промисловості.....	39
1.6. Заключення з огляду літератури.....	40
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	43
2.1. Відбір зразків та схема проведення досліджень	43
2.2. Реактиви, матеріали та обладнання.....	44
2.3. Приготування розчинів реактивів	45
2.4. Методи мікробіологічних досліджень.....	46
2.4.1. Метод мікробіологічного скринінгу молока	46
2.4.2. Метод секторних посівів	48
2.4.3. Метод постановки чутливості до антибіотиків диско-дифузійним методом (ДДМ)	49
2.4.4. Побудова матриці ризиків	49

2.4.5. Метод статистичної обробки результатів досліджень.....	51
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	52
3.1. Видовий склад мікрофлори, ізольованої на різних етапах виробництва	52
3.1.1. Видовий склад мікрофлори молока-сировини	52
3.1.2. Мікрофлора молока-сировини після бактофугування	54
3.1.3. Мікрофлора нормалізованої за вмістом жиру молочної суміші.....	57
3.1.4. Видовий склад мікрофлори у пастеризованому молоці	59
3.1.5. Бактерії, виділені із суміші сиру після пресування	63
3.1.6. Бактерії, виділені із розсолу для засолювання сиру.....	65
3.1.7. Видовий склад мікроорганізмів твердого сичужного сиру «Український»	66
3.1.8. Динаміка видового складу мікроорганізмів на всіх етапах виробництва сиру	68
3.2. Динаміка стійкості до антибактеріальних препаратів окремих видів виділених бактерій на етапах виробництва твердого сичужного сиру	73
3.2.1. Стійкість <i>E.coli</i> до антибіотиків	73
3.2.2. Чутливість до антибактеріальних препаратів <i>K. Pneumoniae</i>	79
3.2.3. Чутливість до антибіотиків <i>A. Baumannii</i>	82
3.3. Аналіз ризиків виробництва твердого сичужного сиру «Український».....	84
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	98
4.1. Аналіз загального мікробіологічного скринінгу твердого сичужного сиру «Український».....	98
4.2. <i>E. coli</i> як індикатор санітарного стану та фактор безпечності	99
4.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> , як клінічно значущий мікроорганізм у молочних продуктах	105

4.4. <i>Acinetobacter</i> spp. як індикатор мікробіологічної безпечності та потенційні патогени.....	108
4.5. <i>Staphylococcus</i> spp. та споріднені мікроорганізми як потенційні патогени та індикатори безпечності	110
4.6. <i>Citrobacter</i> spp. як умовно-патогенні мікроорганізми у молочних продуктах.....	113
4.7. Інші умовно-патогенні та технологічно значущі мікроорганізми ...	116
ВИСНОВКИ.....	127
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	130
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	131
ДОДАТКИ.....	160

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ

НАССР – система аналізу небезпек і критичних контрольних точок

ЄС – Європейський Союз

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

КУО – колонієутворюючі одиниці

ДСТУ – національний стандарт України

МАФАМ – мезофільні аеробні та факультативно-анаеробні мікроорганізми

ESCAPE – аббревіатура ESKAPE використовується для позначення клінічно значущих високорезистентних мікроорганізмів, до яких належать *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) та *Enterobacter spp.*

АМР – антимікробні засоби

All Retail – сукупність усіх каналів роздрібної торгівлі

ESBL – бета-лактамази розширеного спектру дії

БГКП – бактерії групи кишкових паличок

MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) – матрично-активований лазерний десорбційний / іонізаційний часопролітний мас-спектрометр

ВСТУП

Актуальність теми. Забезпечення безпечності харчових продуктів є одним із пріоритетних напрямів державної політики України та важливою складовою концепції «Єдине здоров'я» [195]. Молоко і молочні продукти, зокрема тверді сичужні сири, належать до продуктів масового споживання та мають високу біологічну цінність. Молочна група традиційно входить до базового споживчого кошика українців. За даними досліджень ринку (All Retail, галузеві аналітичні огляди), понад 90% українців регулярно купують молочні продукти, а найбільш популярними залишаються молоко, сметана, масло та твердий сир [196].

Сире молоко може бути джерелом умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів, здатних зберігатися на різних етапах технологічного процесу. Особливої уваги потребують бактерії родів *E. coli*, *K. pneumoniae* та *A. baumannii*, які мають виражений потенціал до формування стійкості до антибіотиків, здатності утворювати біоплівки на технологічному обладнанні та є клінічно значимі для здоров'я людини [54].

Поширення стійких штамів мікроорганізмів до антибактеріальних засобів у харчових продуктах тваринного походження становить суттєву загрозу для здоров'я населення. Формування стійкості може відбуватися як на рівні фермерських господарств унаслідок використання антимікробних препаратів, так і в умовах переробного підприємства через недосконалість санітарної обробки обладнання [197].

Пастеризація, очищення та санітарна обробка на підприємствах з виробництва й переробки молочних продуктів впроваджуються з метою

знищення або значного зменшення кількості патогенних і бактерій псування, однак це відбувається не завжди [54].

Ще однією актуальною проблемою є те, що контроль на підприємствах молочної промисловості здебільшого обмежується санітарно-показовими мікроорганізмами, такими як БГКП та МАФАМ. Проте їх відсутність не гарантує безпечності продукту, адже клінічно значущі бактерії, зокрема *Acinetobacter spp.*, *E. coli* та *K. pneumoniae*, можуть залишатися у молочних продуктах, обсемянити контактні поверхні та набувати стійкості до антибіотиків [197]. Це робить актуальним розробку нових методів контролю та розширення спектру мікроорганізмів, які підлягають моніторингу, для підвищення безпечності молочних продуктів.

Попри значної наявності досліджень щодо мікрофлори сирів, питання збереження антибіотикостійких бактерій на різних етапах виробництва твердих сичужних сирів та їх трансформації під час дозрівання залишаються недостатньо вивченими, що зумовлює актуальність даної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами. Дисертаційна робота 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», № держреєстрації 0116U001299 (2016–2027 pp.).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційного дослідження – встановити видовий склад 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.

Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішення таких завдань:

- провести мікробіологічні дослідження на різних етапах виробництва твердого сичужного сиру (сире молоко, молоко після бактофугування, пастеризації, сирна маса після пресування та сир після дозрівання);
- ідентифікувати ізольовані мікроорганізми із застосуванням сучасного методу (MALDI-TOF MS);
- визначити чутливість окремих штамів виділених мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів різних фармакологічних груп;
- оцінити зміни антибіотикочутливості бактерій у процесі пастеризації та дозрівання сиру;
- провести оцінку ризиків та сформулювати рекомендації щодо зниження мікробіологічних ризиків для виробництва.

Об’єкт дослідження. Інтенсивність передачі стійкості мікрофлори до антибіотиків на різних етапах виробництва твердого сичужного сиру «Український».

Предмет дослідження. Молоко-сировина до бактофуги, молоко-сировина після бактофуги, суміш нормалізована, пастеризована суміш, суміш, підготовлена до зсідання з сировиготовлювача, сир «Український» після пресування, твердий сир «Український» після дозрівання, а також оцінка потенційних ризиків для безпечності готового продукту.

Методи досліджень. Мікробіологічні (виділення та культивування мікроорганізмів), мас-спектрометричні (MALDI-TOF MS ідентифікація), метод диско-дифузійного тесту для визначення чутливості до антибактеріальних препаратів, статистичні методи обробки результатів.

Наукова новизна 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 удосконалення 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.

Практичне значення отриманих результатів. 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 стійкими до антибіотиків мікроорганізмами 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 розробки нормативно-правових актів щодо контролю мікробіологічної безпечності твердих сичужних сирів на молокопереробних підприємствах, зокрема щодо моніторингу антибіотикочутливості мікроорганізмів та оцінки ефективності санітарної обробки обладнання. Це сприятиме зниженню ризику поширення потенційно небезпечних бактерій через харчові продукти та підвищенню безпечності сирів для споживача.

Особистий внесок здобувача. Здобувачка організувала та безпосередньо провела експериментальні дослідження щодо оцінки санітарної безпечності твердих сичужних сирів, здійснила мікробіологічний аналіз на наявність санітарно-показових і 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 розробка науково обґрунтованих рекомендацій для виробництва, а також підготовка матеріалів для публікацій у фахових наукових виданнях здійснені спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дослідження дисертації. Апробація результатів дисертаційного дослідження була представлена на конференціях. Основні положення дисертаційного дослідження презентовано на: Міжнародній науковій конференції «Єдине здоров'я», присвяченій 105-річчю заснування факультету ветеринарної медицини 18–19 березня 2025 року, м.Київ.; Всеукраїнському семінарі для фахівців молокопереробних підприємств «Сучасні технології, контроль якості та безпечності молочної продукції. Новини харчового законодавства» 11–12 березня 2025 року; Міжнародному науково-практичному форумі, 15–16 травня 2024 р. Харків: ДБТУ, 2024.; Міжнародній науково-практичній конференції науковців, викладачів та аспірантів, 22 травня 2024 р.; Державний біотехнологічний університет. Харків, 2024.; Науково-практичній конференції «Актуальні питання сьогодення та післявоєнного

відновлення сільського господарства й екології: експертно-аналітичні складові формування продовольчої стратегії України» з нагоди 20-річчя УЛЯБП АПК НУБіП України, 2 жовтня 2023 р.; К.: НУБіП України, 2023.; Міжнародній конференції «Єдине здоров'я: соціальний вимір», що відбулася 03 грудня 2024 року у рамках реалізації проекту Європейського Союзу Еразмус+ напряму модуль Жана Монне – “Інтеграція політики та засад Єдиного Здоров'я ЄС в Україні" (101048229 – EU4OH – ERASMUS-JMO-2021-HEI-TCH-RSCH). Київ, НУБіП України, 2024; Міжнародній науково-практичній конференції, м. Одеса, 14–15 вересня 2023 року, Одеса, 2023; Науково-практичному вебінарі «Актуальні проблеми ветеринарної науки і практики», НУБіП України, Київ, 28 березня 2024 року; Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції «Єдине здоров'я: реалії та перспективи», Поліський національний університет, м. Житомир, листопад 2024 року.

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 8 наукових праць з яких 1 стаття у фаховому виданні України включеному до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті – у зарубіжних виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних та 5 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Мікрофлора молока в системі оцінки мікробіологічної безпеки

Молоко та молочні продукти посідають важливе місце в харчуванні людини, оскільки є цінним джерелом повноцінних білків, лактози, молочного жиру та біологічно активних сполук. Водночас його збалансований хімічний склад і фізико-хімічні властивості створюють оптимальні умови для росту й розвитку більшості мікроорганізмів, що зумовлює високу мікробіологічну чутливість молока [1, 2, 3].

Переважну частку мікробіоти молока становлять мезофільні аеробні мікроорганізми, здатні до росту за наявності кисню. Кількісний вміст цієї групи бактерій використовується як мікробіологічний показник якості харчових продуктів, що характеризує ефективність температурної обробки, а також дотримання санітарно-гігієнічних вимог під час переробки, транспортування та зберігання молока. Виявлення підвищеного рівня мезофільних аеробних мікроорганізмів може також свідчити про можливі джерела мікробної контамінації на різних етапах технологічного процесу [4].

У молочній галузі мікробіологічна безпека сирого молока є ключовою передумовою формування технології виробництва продуктів належної якості [2]. Сире молоко, що надходить на молокопереробні підприємства, може містити різноманітні мікроорганізми, серед яких особливу увагу приділяють умовно-патогенним і патогенним бактеріям, здатним становити потенційну небезпеку для здоров'я людини та тварин [5, 2].

Умовно патогенні мікроорганізми, зокрема *S. aureus*, мають здатність активно розмножуватися в молочних продуктах, негативно впливати на їхні органолептичні властивості та продукувати токсичні сполуки [4]. Патогенні

мікроорганізми – збудники інфекційних захворювань – можуть упродовж тривалого часу зберігати життєздатність у молоці та молочних продуктах і становити потенційну загрозу для безпеки споживачів [6].

Протягом останніх десяти років у світі відзначається суттєве зростання частоти виявлення *Klebsiella spp.* у зразках молока. У низці країн представники цього роду посідають друге місце після *E. coli* серед грам негативних бактерій, ізольованих із вимені молочних корів [10].

Мікроорганізми, присутні в молоці, можуть бути причиною розвитку різних бактеріальних інфекцій у людини [7]. Найбільшу епідеміологічну небезпеку становлять патогенні та умовно патогенні бактерії, зокрема *Acinetobacter spp.*, *E. coli*, *Klebsiella spp.* та інші представники цієї групи [8, 3].

Klebsiella spp., зокрема *K. pneumoniae*, є поширеними представниками роду *Klebsiella* та важливими патогенами у молочній галузі та медицині людини. У великої рогатої худоби вони здатні викликати мастит, передаватися через контакт дійок вимені з гноєм, підстилковими матеріалами та сільськогосподарським інвентарем, уражати епітеліальні клітини молочної залози та персистувати у тканинах вимені, що негативно впливає на безпечність та якість молока, продуктивність корів та виживання новонароджених телят [8, 9]. *K. pneumoniae* є зоонозним патогеном і може спричиняти у людей пневмонії, абсцеси печінки, інфекції сечовивідних шляхів, токсемію, септицемію та інші клінічні прояви; у Сполучених Штатах Америки на частку *K. pneumoniae* припадає від 3 % до 8 % усіх нозокоміальних інфекцій [11]. Зростання антибіотикорезистентності, особливо серед штамів, що продукують β -лактамази розширеного спектру (ESBL) та/або карбапенемази, становить серйозну глобальну проблему охорони здоров'я. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) відносить *Klebsiella spp.* до патогенів, що є носіями численних генів антибіотикорезистентності та потребують особливого контролю [9, 11]. *Klebsiella spp.*, зокрема *K. pneumoniae*, є поширеними представниками роду *Klebsiella* та важливими патогенами у молочній галузі та медицині людини. У

великої рогатої худоби вони здатні викликати мастит, передаватися через контакт дійок вимені з гноєм, підстилковими матеріалами та сільськогосподарським інвентарем, уражати епітеліальні клітини молочної залози та персистувати у тканинах вимені, що негативно впливає на безпечність та якість молока, продуктивність корів та виживання новонароджених телят [8, 9]. *K. pneumoniae* є зоонозним патогеном і може спричиняти у людей пневмонії, абсцеси печінки, інфекції сечовивідних шляхів, токсемію, септицемію та інші клінічні прояви; у Сполучених Штатах Америки на частку *K. pneumoniae* припадає від 3 % до 8 % усіх нозокоміальних інфекцій [11]. Зростання антибіотикорезистентності, особливо серед штамів, що продукують β -лактамази розширеного спектру (ESBL) та/або карбапенемази, становить серйозну глобальну проблему охорони здоров'я. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) відносить *Klebsiella spp.* до патогенів, що є носіями численних генів антибіотикорезистентності та потребують особливого контролю [9, 11].

Бактерії роду *Acinetobacter* можуть потрапляти до молока через контамінацію, що виникає внаслідок залишків води в доїльному обладнанні, недостатнього очищення молокопроводів та охолоджувачів, забруднення вимені та дійок, неправильного транспортування й зберігання молока, а також неадекватного санітарного оброблення молочного обладнання. Більшість представників роду *Acinetobacter* є умовно патогенними комменсалами з обмеженою вірулентністю та клінічно незначущими. Проте останнім часом серйозність інфекцій, спричинених *Acinetobacter*, зросла через широке використання механічних дихальних пристроїв, венозних катетерів та антибіотиків, що викликає значне занепокоєння для охорони громадського здоров'я. *A. baumannii* – умовно патогенний мікроорганізм, здатний спричиняти різноманітні внутрішньолікарняні інфекції. Дослідження на тваринних моделях та клінічні спостереження підтверджують високий рівень його вірулентності. Цей патоген має особливе значення через поширення мультирезистентних

(МЛР) штамів та їхню асоціацію з численними нозокоміальними та позалікарняними інфекціями [3].

E. coli є важливим патогеном у великої рогатої худоби, здатним спричиняти субклінічний та клінічний мастит, що негативно впливає на безпечність і якість молока та здоров'я тварин. Цей мікроорганізм може передавати антимікробну резистентність людині через споживання сирого молока або непастеризованих молочних продуктів. Протягом останніх років поширення резистентних штамів *E. coli* зростає, що викликає серйозне занепокоєння щодо потенційного ризику для здоров'я людей і тварин. Систематичне застосування антимікробних препаратів для лікування та профілактики маститу сприяє формуванню та підтриманню резистентних штамів через генетичні мутації та горизонтальне перенесення генів, що підкреслює необхідність контролю та відповідального використання антибіотиків у молочній галузі [45].

У сирому молоці можуть бути присутні різноманітні мікроорганізми, які потенційно становлять ризик для здоров'я людини та тварин [2]. Тому під час молокопереробки молоко-сировину піддають впливу різних технологічних заходів, таких як бактофугування та пастеризація, щоб знизити мікробіологічні ризики. В рамках цього дослідження було проведено мікробіологічний скринінг молока за допомогою технології MALDI-TOF MS на всіх етапах виробництва – від сировини до готового молочного продукту – з метою виявлення та аналізу мікроорганізмів, що проходять увесь технологічний ланцюг і є клінічно значущими для здоров'я людей і тварин.

1.2. Неналежне використання антибіотиків у молочному скотарстві та їх вплив на формування антибіотикорезистентної мікрофлори

У молочному скотарстві лікування маститу є найпоширенішою причиною застосування антимікробних препаратів. Надмірне або неправильне

використання антибіотиків у сільському господарстві пов'язують із розвитком та поширенням стійкості мікроорганізмів до антимікробних засобів (АМР) [12].

Антибіотики у молочній промисловості застосовуються переважно для лікування маститу, респіраторних захворювань, кульгавості та кишкових інфекцій. Частина цих препаратів має критичне значення для лікування інфекцій у людей, тому прогнозується, що їх подальше використання у молочному скотарстві може мати небезпечні наслідки [12].

Молочна промисловість є фундаментальною складовою світового сільського господарства, що забезпечує виробництво молока та молочних продуктів, які мають високу харчову цінність та важливе соціально-економічне значення у глобальному масштабі [13]. На цей сектор припадає приблизно 15 % загального обсягу сільськогосподарського виробництва, причому лише коров'яче молоко складає близько 81 % світового виробництва [14, 15]. Молочні продукти споживають понад шість мільярдів людей, і вони є невід'ємною частиною глобальної продовольчої системи; за прогнозами, середнє споживання на душу населення до 2030 року зростатиме приблизно на 1 % щорічно [14, 16].

Разом із тим, молочний сектор стикається з низкою проблем, серед яких мастит великої рогатої худоби, що є найпоширенішим інфекційним захворюванням молочної залози. Це захворювання спричиняє запалення, біль та зниження продуктивності молока, що має серйозні наслідки як для благополуччя тварин, так і для економічної ефективності ферм [18, 19]. Крім того, мастит є критичною проблемою у контексті благополуччя тварин, оскільки уражені корови відчують біль, лихоманку, зниження апетиту та соціальну ізоляцію, що загрожує їхньому фізіологічному та поведінковому благополуччю [17]. Тому оцінка маститу та використання антибіотиків у рамках концепції «Єдине здоров'я – Один добробут» є важливою для комплексного розуміння їх багатовимірного впливу [8].

Антибіотики залишаються основним інструментом профілактики та лікування маститу, що забезпечують здоров'я стада та підтримку

продуктивності. Водночас їх нераціональне застосування може призводити до небажаних наслідків, таких як наявність залишків антибіотиків у молоці та формування стійкості до антимікробних препаратів (АМР) [20, 21]. Дійсно, антибіотики є найпоширенішими залишками ветеринарних препаратів у харчових продуктах: їхня зареєстрована присутність коливається від менш ніж 1 % у Європі, де більшість залишків не перевищує встановлені законодавством максимальні ліміти (МДЛ), до понад 90 % у деяких африканських регіонах, де частіше виявляється перевищення цих лімітів [16].

Основні небезпечні фактори включають появу антибіотикорезистентних бактерій та негативний вплив на здоров'я споживачів. Резистентні штами можуть поширюватися через продукти харчування, зокрема молочні, ускладнюючи лікування інфекцій у людини [19, 23]. Ферми з високою щільністю поголів'я додатково сприяють розвитку резистентності, оскільки гени та бактерії, стійкі до антибіотиків, накопичуються у гної, ґрунті та воді [24, 25]. Споживання продуктів із субінгібуючими концентраціями залишків антибіотиків, як сирих, так і термічно оброблених, може створювати селективний тиск на мікробіоту людини, сприяючи персистенції резистентних мікроорганізмів [26]. Такий вплив посилює горизонтальний перенос генів, зокрема плазмідно-опосередковану кон'югацію, що сприяє поширенню генів резистентності [27, 28, 29]. Крім того, наявність залишків антибіотиків може негативно впливати на імунну систему, створюючи підвищений ризик для вразливих груп населення, таких як немовлята та особи з ослабленим імунітетом. Зростання усвідомлення потенціалу низьких концентрацій залишків для селекції резистентних бактерій підкреслює їхню роль у передачі патогенів та загрозу глобальній кризі антибіотикорезистентності, що актуалізує необхідність узгоджених заходів контролю [30, 31].

Отже, використання антибіотиків у лікуванні маститу та наявність їх залишків у молоці залишаються одними з найважливіших проблем сучасного молочного скотарства.

Клінічний мастит характеризується запаленням вимені та тканин молочної залози, яке може виникати внаслідок травм, хімічного подразнення або, найчастіше, інфекцій, спричинених мікроорганізмами, такими як бактерії, грибки, віруси та водорості [36]. Серед цих збудників домінуючу роль відіграють бактеріальні внутрішньомолочні інфекції. Бактеріальні збудники, що викликають мастит, зазвичай класифікують на заразні та екологічні. Основні заразні збудники – *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* та *Mycoplasma bovis* – передаються переважно під час процесу доїння [33, 42]. Навпаки, збудники з навколишнього середовища, серед яких *E. coli*, *Streptococcus uberis*, *Klebsiella spp.* та коагулазонегативні стафілококи, походять із підстилки, ґрунту та гною [42, 43]. Велика різноманітність, адаптивність та патогенна складність цих мікроорганізмів створюють значні виклики для профілактики та ефективного лікування маститу. Слід також відзначити наслідки маститу для громадського здоров'я, оскільки молоко від інфікованого вимені може становити ризик для людини через наявність патогенних мікроорганізмів та їхніх токсинів. Зокрема мастит, спричинений *S. aureus*, може призводити до забруднення молока та молочних продуктів ентеротоксинами [49]. За даними досліджень близько 62 % ізольованих збудників маститу проявляють резистентність щонайменше до одного антибіотика, а частина з них є зоонозними [50]. Крім того, через ризик зоонозної передачі молоко від уражених корів непридатне для споживання або реалізації, що додатково спричиняє значні економічні збитки [51].

Антибіотики вже давно вважаються першою лінією захисту від бактеріальних інфекцій у молочній худобі, особливо у випадку маститу [18].

Антибіотики, такі як бета-лактами (пеніцилін G) та макроліди (еритроміцин), зазвичай застосовуються для лікування маститу великої рогатої худоби [2, 80]. Тим не менш, неселективне використання антибактеріальних препаратів без тестування на чутливість збудників *in vitro* є однією із основних причин невдач у лікуванні маститу [81].

1.3. Клінічно значимі мікроорганізми, що здатні до формування та передачі антибіотикорезистентності

У сучасній науці термін «супербактерії» використовують для позначення мікроорганізмів, стійких до антимікробних препаратів. Аббревіатура ESKAPE загально визнана для позначення клінічно значущих високорезистентних мікроорганізмів. До цієї групи належать *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* та *Enterobacter* spp. [22, 24].

За сучасними оцінками такі збудники як карбапенем резистентна *K. pneumoniae* (CRKP), карбапенем резистентні ентеробактерії (CRE), метицилін резистентний *S. aureus* (MRSA), ESBL-продукуючі ентеробактерії, ванкоміцин резистентні ентерококи (VRE), множинорезистентні штами *P. aeruginosa* та *Acinetobacter* є найбільш поширеними супербактеріями. Ці мікроорганізми є ключовими чинниками підвищеної захворюваності та смертності у всьому світі. Значна кількість людей гине через неефективність традиційних антимікробних терапій та брак препаратів нового покоління або альтернативних підходів, здатних подолати супербактерії [22].

З огляду на високу клінічну значущість та здатність швидко набувати стійкості до антимікробних препаратів, збудники групи ESKAPE були віднесені Всесвітньою організацією охорони здоров'я до переліку пріоритетних патогенів [24] та належать до найбільш поширених опортуністичних мікроорганізмів, асоційованих із розвитком внутрішньолікарняних (нозокоміальних) інфекцій [30].

Антимікробна резистентність розглядається як, так звана, «тиха пандемія», яка, за прогнозами, може призвести більш ніж до 40 мільйонів летальних випадків у світі до 2050 року [25]. За оцінками ВООЗ, у 2019 році антимікробна резистентність була безпосередньою причиною близько 1,27 млн летальних випадків та асоціювалася загалом із 4,95 млн випадків смертей у глобальному масштабі [26].

З урахуванням показників захворюваності, рівня стійкості до антимікробних препаратів та обмеженої кількості ефективних терапевтичних засобів *A. baumannii* і представники родини Enterobacteriaceae були віднесені до патогенів критичного пріоритету. Водночас *E. faecium*, *P. aeruginosa* та *S. aureus* класифікуються як патогени високого пріоритету [27].

Нераціональне застосування антибіотиків у медицині та тваринництві, несистемне використання дезінфекційних засобів, процеси глобалізації, особливості лікарняного середовища, а також супутні інфекції в період пандемії COVID-19 істотно сприяють поширенню стійкості до антимікробних препаратів. Унаслідок цього патогени групи ESKAPE зберігають провідну роль у структурі внутрішньолікарняних інфекцій навіть у період пандемії [28].

Ці мікроорганізми характеризуються низкою спільних властивостей, зокрема, високою здатністю до адаптації та тривалої персистенції в умовах сучасних закладів охорони здоров'я, а також наявністю комплексу вроджених і набутих механізмів резистентності. Саме ці чинники зумовили їх провідну роль у формуванні та поширенні інфекцій, стійких до антимікробних препаратів [29]. Окрім цього, результати нещодавніх досліджень свідчать, що грамнегативні представники групи ESKAPE здатні швидко набувати стійкості навіть до нових антибіотиків, які ще не впроваджені у клінічну практику: зокрема, близько 120 поколінь (приблизно 60 діб) лабораторної еволюції є достатніми для формування резистентності у бактеріальних штамів [30].

У світі очікується, що кількість випадків стійкості до антимікробних препаратів на рік зросте вдесятеро до 2050 року. Загальні оціночні витрати на контроль стійкості до п'яти патогенів (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* та *P. aeruginosa*) становили 0,5 мільярда доларів та 2,9 мільярда доларів у Таїланді та Сполучених Штатах, відповідно [31].

1.4. Механізми передачі стійкості до антибіотиків між мікроорганізмами у харчових екосистемах

Окрім неконтрольованого або неправильного призначення антибіотиків, розвиток стійкості до них може бути зумовлений також конкурентною боротьбою за виживання всередині бактеріальних консорціумів.

У процесі еволюції бактерії сформували кілька основних типів стійкості до антимікробних препаратів: природну (внутрішню), набуту та адаптивну.

Природна (внутрішня) резистентність є невід'ємною властивістю окремих бактеріальних видів і зумовлена їхніми структурними та функціональними особливостями, закодованими на хромосомному рівні. Вона включає наявність природних генів резистентності, низьку проникність клітинних оболонок, а також активні системи виведення антибіотиків. Наприклад *P. aeruginosa* характеризується високою внутрішньою стійкістю до багатьох класів антибіотиків завдяки обмеженій проникності зовнішньої мембрани та активності ефлюксних систем [32, 34].

Набута резистентність формується у бактерій, які спочатку були чутливими до антибіотиків, але згодом набули здатності виживати під їх дією. Це може відбуватися внаслідок мутацій або горизонтального переносу генів. Особливу небезпеку становить горизонтальний перенос генетичного матеріалу між бактеріями, що реалізується через кон'югацію, трансформацію та трансдукцію і забезпечує швидке поширення генів резистентності між різними видами [34, 35]. Спалахи внутрішньолікарняних інфекцій, спричинені *A. baumannii* та *P. aeruginosa*, демонструють здатність цих мікроорганізмів поєднувати природну і набуту резистентність, що значно ускладнює лікування [32, 33]. Подібні процеси виявляються у харчових екосистемах, зокрема на молокопереробних підприємствах, де стійкі бактерії можуть передавати гени іншим мікроорганізмам на технологічних лініях. Бактерії, що уже набули стійкості та надійшли з молоком-сировиною, можуть передавати гени

бактеріям, що вже циркулюють на технологічних лініях та здатні проходити до кінцевого продукту, а відповідно потрапляти у харчовий ланцюг людини.

Адаптивна резистентність виникає у відповідь на вплив факторів навколишнього середовища і проявляється через динамічні клітинні реакції на антибіотичний стрес. До таких механізмів належать зміни проникності клітинних оболонок, активація ефлюксних систем, метаболічна перебудова та формування біоплівки, що забезпечують бактеріям підвищену виживаність у несприятливих умовах [34].

Загальні механізми бактеріальної стійкості наступні.

1. Ферментативна інактивація антибіотиків – β -лактамази, аміноглікозид-модифікуючі ферменти, хлорамфенікол-ацетилтрансферази. Особливу загрозу становлять β -лактамази розширеного спектру (ESBL) та карбапенемази (KPC, NDM, OXA) [41, 42].

2. Модифікація мішеней дії антибіотиків – зміни PBP, рРНК, ДНК-гірази, топоізомерази IV (наприклад, MRSA, мутації *gyrA* і *parC*) [43].

3. Обмежене проникнення – зміни поринових білків та ліпідного складу мембран, які зменшують надходження ліків у клітину [47, 48].

4. Активне виведення антибіотиків (ефлюкс) – ефлюксні помпи, що видаляють антибіотики та інші токсини, формуючи множинну лікарську стійкість [36, 37].

5. Формування біоплівки – тривимірні мікробні спільноти, що обмежують проникнення ліків та сприяють горизонтальному переносу генів [38–40].

6. Горизонтальний перенос генів через мобільні елементи – плазміді, транспозони, інтегрони, які забезпечують швидкий обмін резистентними детермінантами між бактеріями [53].

Формування біоплівки є одним із основних механізмів передачі резистентності у харчових екосистемах. Бактерії, що перебувають у складі біоплівки, додатково характеризуються зміненим метаболічним станом і

активною міжклітинною комунікацією (кворум-сенсингом), що підвищує толерантність до антимікробних препаратів. Поєднання всіх цих механізмів, а також здатність до горизонтального переносу генів, забезпечує швидке поширення антибіотикорезистентності як серед патогенних, так і непатогенних мікроорганізмів у харчових екосистемах.

Джерела передачі антибіотикорезистентності у харчових екосистемах. У харчових екосистемах резистентні бактерії можуть передаватися через:

- сирі продукти тваринного походження (м'ясо, молоко, яйця), обсеменене патогенами;
- контамінацію обладнання та технологічних поверхонь;
- воду для обробки продуктів;
- персонал харчових підприємств, який контактує з продуктами та обладнанням.

Особливу роль у поширенні антибіотикорезистентності відіграють мобільні генетичні елементи, такі як плазмідни, транспозони та інтегри, які забезпечують горизонтальний перенос генів стійкості між різними бактеріальними видами [53].

Формування біоплівки є важливою стратегією виживання бактерій, що дозволяє їм протистояти дії антибіотиків та імунним захисним реакціям організму-хазяїна. Біоплівки становлять собою складні тривимірні мікробні спільноти, занурені в самопродуковану позаклітинну полімерну речовину (EPS) [38]. Матриця EPS виступає як фізичний бар'єр, що обмежує проникнення антибіотиків, нейтралізує антимікробні агенти та сприяє горизонтальному переносу генів резистентності між бактеріальними клітинами. Бактерії, що входять до складу біоплівки, демонструють значно вищу стійкість до антибіотиків, порівняно з планктонними (вільно плаваючими) клітинами.

Це пояснюється кількома наступними механізмами.

Обмежене проникнення антибіотиків та деззасобів: щільна матриця біоплівки сповільнює дифузію ліків і знижує їхню ефективність.

Змінені метаболічні стани: бактерії у внутрішніх шарах біоплівки перебувають у стані низької метаболічної активності або спокою. Такі персистуючі клітини мають високу толерантність до антибіотиків, спрямованих на активно ростучі клітини [39].

Регуляція кворум-сенсингу: формування біоплівки контролюється міжклітинним сигнальним механізмом, який підвищує стійкість до стресу та толерантність до лікарських засобів.

Дослідження біоплівок *S. aureus* та *P. aeruginosa* показали, що вплив сублетальних концентрацій антибіотиків може викликати адаптивну реакцію, посилюючи захисні механізми біоплівки [40]. Крім того, біоплівки часто асоціюються з хронічними інфекціями у людей, такими як муковісцидоз, катетер-асоційовані інфекції кровотоку та імплант-асоційовані інфекції, що робить їх серйозною клінічною проблемою. А на харчових підприємствах саме біоплівка є основним фактором передачі антибіотикорезистентних штамів.

1.5. Мікрофлора молока та антибіотикорезистентність у контексті технологічних процесів

Молочні продукти є багатим поживним середовищем, що сприяє активному росту мікроорганізмів як патогенних, так і технологічно небажаних (психротрофні та споротвірні форми). Недостатній контроль за такими бактеріями може значно погіршувати безпечність та якість продукту [49].

Мікроорганізми можуть потрапляти у виробниче середовище через одяг, взуття та руки персоналу, а також із сировини тваринного походження, фекалій великої рогатої худоби та ґрунту [50, 51]. Особливо високий ризик виникає за тісного функціонального зв'язку між фермою і молокопереробним підрозділом та відсутності належного зонування і санітарного контролю.

1.5.1. Вплив технологічних процесів на мікробіологічний склад молока. Індикаторні мікроорганізми можна виявити на всіх стадіях переробки молока. Пастеризація значно зменшує чисельність аеробної мікрофлори та коліформних бактерій, проте в готових продуктах часто виявляється повторне підвищення рівня мікробного обсіменіння через перехресне контамінування [51].

Після пастеризації психротрофні бактерії, такі як *Pseudomonas*, *Acinetobacter* та представники родини *Enterobacteriaceae*, можуть залишатися домінуючими у молочних продуктах [51]. Наявність таких мікроорганізмів у продуктах підвищує ризик передачі антибіотикорезистентних генів споживачеві.

1.5.2. Біоплівки як фактор виживання та передачі антибіотикорезистентності. Біоплівки – це складні тривимірні спільноти мікроорганізмів, занурені в позаклітинну полімерну речовину (EPS), що утворюються на твердих поверхнях обладнання. Вони підвищують стійкість бактерій до хімічних речовин, коливань величини рН, висихання та дезінфекційних засобів, забезпечуючи тривале виживання у виробничому середовищі [38–40].

Біоплівки сприяють:

- обмеженню проникнення антибіотиків та деззасобів;
- формуванню персистуючих клітин у стані низької метаболічної активності;
- горизонтальному переносу генів антибіотикорезистентності;
- міжклітинній комунікації (кворум-сенсингу) [39, 40].

У молочній промисловості біоплівки є серйозною проблемою через ризик постобробного забруднення, скорочення терміну зберігання продуктів та потенційну передачу патогенів споживачу.

1.5.3. Основні мікроорганізми молока та їх характеристики. Грампозитивні бактерії. *Bacillus cereus* – споротвірна бактерія, здатна рости за

4–50 °C, формує біоплівки на поверхнях з нержавіючої сталі та виробляє токсини, що викликають харчові отруєння [55–57]. Спори витримують суворі умови, що підвищує виживаність та стійкість.

Staphylococcus aureus – нерухома, неспоротвірна, факультативно анаеробна бактерія, продукує термостійкі ентеротоксини. Вона може колонізувати шкіру та слизові оболонки персоналу і добре розмножується в продуктах із високим вмістом солі або цукру [65, 66].

Грамнегативні бактерії. *E. coli* – паличкоподібна бактерія, частина нормальної мікробіоти людини, деякі штами патогенні (ентеротоксигенні, ентеропатогенні, ентероінвазивні, вероцитотоксичні). Серотип O157:H7 – небезпечний збудник ентерогеморагічних інфекцій і гемолітико-уремічного синдрому (ГУС) [58, 59]. *E. coli* формує біоплівки на різних харчових та виробничих поверхнях.

Pseudomonas spp. – рухомі психротрофні бактерії, що псують продукти, здатні утворювати багатовидові біоплівки, підвищуючи стійкість інших патогенів. У продуктах типова *P. fluorescens* може спричиняти синє забарвлення через піоціанін [62–64].

Молочнокислі бактерії. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* – ключові учасники ферментації та дозрівання сирів.

Enterococcus faecium та *E. faecalis* – можуть бути резервуаром генів антибіотикорезистентності, що викликає занепокоєння щодо безпечності продукту [70, 72–73].

1.5.4. Антибіотикорезистентність у молочній промисловості. Метагеномні дослідження показують, що сирі та пастеризовані молочні продукти містять антибіотикорезистентні гени (ARGs), при цьому сире молоко має їх значно більше [74].

Дані досліджень:

Lactococcus, *Lactobacillus*, *Streptococcus* – висока стійкість до сульфаніланамідних препаратів (100 %), аміноглікозидів (91,7 %) та тетрацикліну (31 %) [83].

Enterococcus із сирів – стійкість до ванкоміцину (87,5 %), еритроміцину (75 %), тетрацикліну (50 %) та пеніциліну (37,5 %) [84].

Множинно-резистентні *E. coli* виявлені у сирі Minas із сирого молока [85].

Staphylococcus aureus – 52 % штамів із множинною лікарською стійкістю, включно з пеніциліном, цефокситином, оксациліном, гентаміцином, ципрофлоксацином та хлорамфеніколом; присутній ген *tesA* [86].

Ці дані підтверджують, що виробниче середовище молочних потужностей може бути резервуаром антибіотикорезистентних та потенційно патогенних штамів, що становить загрозу безпечності продукту для споживачів.

1.6. Заключення з огляду літератури

Аналіз сучасних літературних джерел свідчить, що молоко та молочні продукти є важливою складовою раціону людини, проте водночас становлять складну мікробіологічну екосистему, у якій можуть циркулювати не тільки корисні, але й умовно патогенні та патогенні мікроорганізми. Сприятливий поживний склад молока, недотримання санітарно-гігієнічних вимог на етапах доїння, зберігання та переробки, а також недотримання технологічних режимів переробки створюють передумови для контамінації молока-сировини та готових продуктів бактеріями, зокрема, клінічно значущими та стійкими до антибіотиків.

Літературні дані переконливо демонструють, що неналежне та надмірне застосування антибіотиків у молочному скотарстві, зокрема під час лікування маститу, є одним із ключових чинників формування та поширення антибіотикорезистентної мікрофлори. Залишкові концентрації антимікробних препаратів у молоці створюють селективний тиск, який сприяє збереженню та

персистенції резистентних штамів, а також активізує горизонтальний перенос генів резистентності між мікроорганізмами. У цьому контексті особливу небезпеку становлять представники групи ESKAPE, а також такі збудники, як *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus* та *Enterococcus spp.*, які поєднують високу адаптивність, вірулентність і здатність до множинної лікарської стійкості.

Важливу роль у підтриманні та поширенні антибіотикорезистентності відіграють механізми горизонтального переносу генів, зокрема кон'югація, трансформація та трансдукція, а також формування біоплівки. Біоплівки, що утворюються на обладнанні молокопереробних потужностей і в умовах зберігання сирого молока, забезпечують мікроорганізмам підвищену толерантність до антимікробних препаратів, дезінфекційних засобів і фізико-хімічних чинників, значно ускладнюючи їх елімінацію. Особливої уваги потребують психротрофні, грамнегативні та споротвірні бактерії, зокрема представники роду *Bacillus*, які здатні зберігатися після термічної обробки та брати участь у повторному обсіменінні продукту.

Технологічні процеси переробки молока, зокрема пастеризація, суттєво знижують мікробне навантаження, проте не гарантують повної елімінації антибіотикорезистентних бактерій. Літературні дані свідчать про можливість повторної контамінації молочних продуктів на етапах після пастеризації, що пов'язано з людським фактором, обладнанням та умовами виробничого середовища. Особливо це актуально для виробництва ферментованих молочних продуктів і сирів, де задіяні складні мікробні консорціуми, а сироварні можуть виступати резервуарами генів антимікробної резистентності.

Узагальнення літературних даних дозволяє зробити висновок, що питання стійкості мікрофлори молока до антибіотиків є багатофакторним та охоплює всі ланки ланцюга «молоко — харчовий продукт — людина». Попри значну кількість досліджень залишається недостатньо вивченим питання циркуляції клінічно значущих та резистентних мікроорганізмів на різних етапах

технологічного процесу переробки молока, а також їх здатності зберігатися та передаватися у готових молочних продуктах.

У зв'язку з цим обґрунтованою є необхідність проведення власних досліджень, спрямованих на комплексний мікробіологічний скринінг молока та молочних продуктів на різних стадіях виробництва з використанням сучасних методів ідентифікації, зокрема MALDI-TOF MS. Особливу увагу доцільно приділити виявленню клінічно значущих мікроорганізмів, оцінці їх профілю антибіотикорезистентності та здатності до персистенції в умовах молокопереробних підприємств. Отримані результати можуть стати науковим підґрунтям для вдосконалення системи мікробіологічного контролю, зниження ризиків поширення стійкості мікроорганізмів до антибіотиків та поліпшення забезпечення безпечності молочних продуктів для споживачів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Відбір зразків та схема проведення досліджень

Зразки збірного сирого молока відбирали на ТОВ «Гайсинський молокозавод», 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 спредів, а також 360 тонн сухих молочних продуктів. На потужності впроваджена система управління безпечністю харчових продуктів відповідно до вимог міжнародного стандарту ISO 22000.

Зразки відбирали на різних технологічних етапах виробництва: молоко-сировина до бактофуги, молоко-сировина після бактофуги, суміш нормалізовану з танку, пастеризовану суміш, суміш, підготовлену до зсідання з сировиготовлювача, сир «Український» після пресування, твердий сир «Український» після дозрівання. На кожному етапі виробництва відбирали по 15 зразків для мікробіологічних досліджень. Дослідження проводили у трьох повторях. Всього на 7 етапах виробництва твердих сичужних сирів було відібрано 405 зразків з метою дослідження мікрофлори. Також було досліджено воду (10 зразків) та розсіл до та після пастеризації (по 10 зразків кожний).

Для відбору проб молока на ТОВ «Гайсинський молокозавод» використовували стерильні одноразові пластикові контейнери, об'ємом 100 см³. Місце відбору проб обпалювали полум'ям, першу порцію молока зливали в окрему ємність, після чого відбирали зразки для дослідження у стерильний одноразовий контейнер, який щільно закривали.

Одразу після відбору всі зразки поміщали в контейнер із температурою 2°C та впродовж 2,5 год доставляли до ТОВ «Експертний центр діагностики та

лабораторного супроводу «Біолайтс» (м. Тернопіль), акредитованого відповідно до стандарту ISO/IEC 17025.

2.2. Реактиви, матеріали та обладнання

Під час проведення досліджень використовували поживні середовища, реактиви та матеріали:

- кров'яний агар (Blood Agar, BA), BioMérieux, Франція;
 - буферна пептонна вода (Buffered Peptone Water, BPW), HiMedia, Індія;
 - агар Бейрда–Паркера (Baird Parker Agar, BPA), HiMedia, Індія;
 - агар Ендо (Endo Agar), Farmactiv, Україна;
 - агар для *Pseudomonas* (Pseudomonas Agar), HiMedia, Індія;
 - агар для *Enterococcus*, Farmactiv, Україна;
 - агар для *Bacillus cereus*, HiMedia, Індія;
 - вісмут-сульфітний агар (Bismuth Sulfite Agar, BSA), HiMedia, Індія;
 - агар XLD (Xylose-Lysine Deoxycholate Agar), HiMedia, Індія;
 - пакети для створення анаеробних умов, BioMérieux, Франція;
 - матриця для мас-спектрометрії HCCA (арт. 255344), Bruker, Німеччина;
 - бактеріальний калібратор (арт. 255343), Bruker, Німеччина;
 - пептонно-сольовий розчин (PSS), Україна;
 - диски, змочені антибіотиками: Ципрофлоксацин, Ампіцилін, Амоксицилін/Клавуланат, Цефалексин, Цефотаксим, Цефепім, Доксициклін, Гентаміцин, Амікацин, Кліндаміцин, Ванкоміцин, Еритроміцин, Триметоприм/Сульфаметоксазол, Фосфоміцин. Виробник Sanimed, Україна.
- Крім того, для досліджень використовували наступні матеріали:
- бактеріологічні петлі з платини/іридію або нікелю/хрому, діаметром 3 мм, Україна;
 - мірні склянки, Simax, Чехія;

- мірні колби, Duran, Німеччина;
- пробірки P2 16×150 мм, Склоприлад, Україна;
- чшки Петрі, діаметром 90 мм, Vorwarts Diagnostic, Україна;
- стерильні пластикові пастерівські піпетки, Labexpert, Китай;
- стерильні скляні флакони 500 мл, Simax, Чехія;
- стерильні наконечники з фільтром для дозаторів Eppendorf (0,1–10 мкл), Eppendorf, Німеччина;
- металеві чипи для MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics, Німеччина;
- лінійка, 20см. Країна-виробник Україна.
- Дослідження проводили на наступному обладнанні:
- мас-спектрометр MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics, Німеччина;
- автоклав для вологої стерилізації (120–134 °С, вертикальний автоклав 5050 ELV D-line), Tuttnauer, Ізраїль;
- сухожарова шафа (160 °С, ED115), Binder, Німеччина;
- термостат (30 і 37 ±1 °С, Binder BD 115), Binder, Німеччина;
- лабораторний рН-метр з точністю ±0,1, Mettler Toledo, Швейцарія;
- дозатор змінного об'єму 0,1–2,5 мкл, Eppendorf, Німеччина;
- стерилізатор бактеріологічних петель, SteriMaks, Німеччина;
- вортекс-міксер, Biosan, Латвія;
- біокулярний мікроскоп Leica DM500 LED, Leica, Німеччина;
- холодильник і морозильна камера, Liebherr, Швейцарія;
- диспенсор для дисків з антибіотиками. Виробник Sanimed, Україна.

2.3. Приготування розчинів та реактивів

Підготовка проб для ідентифікації мікроорганізмів та приготування робочих розчинів реактивів.

Для приготування 1 см³ основного розчинника (OS) в мікропробірку Еппендорф 1,5 см³ вносили: 475 мкл ультрарисної деіонізованої води; 500 мкл

ацетонітрилу (ACN); 25 мкл 100% трифтороцтової кислоти (TFA). Суміш ретельно перемішували.

Приготування матриці (Bruker IVD HCCA Matrix). Додавали 250 (± 5) мкл OS до пробірки, що містить 2,5 мг IVD HCCA матриці (або аналогу) (в пропорції 1:100, кінцева концентрація 10 мг матриці/см³) і щільно закривали пробірку. Суміш ретельно перемішували на вортексі, доки кристали повністю не розчинилися. Готовий розчин зберігали за кімнатної температури (20–25) °C у місці, захищеному від світла до одного тижня (пробірки, де випав осад у вигляді кристалу для використання не придатні).

Приготування робочого розчину бактеріального стандарту Bruker (BTS, кат № 255343). Вносили 50 мкл основного розчинника (OS) до пробірки BTS і розчиняли піпетуванням близько 20 разів за кімнатної температури. Піпетували повільно (близько одного разу на 2 секунди), не виймаючи наконечника з розчину під час процедури. Витримували 5 хв за кімнатної температури і повторювали процедуру як зазначено вище. За потреби відцентрифугували за 13 000 rpm протягом 2 хв за кімнатної температури.

Кожного разу перед початком роботи з новим чіпом для контролю відповідності та інтенсивності піків проводили калібрування приладу 100 % концентрації бактеріальним тестовим стандартом (BTS) згідно робочої інструкції.

2.4. Методи мікробіологічних досліджень

2.4.1. Метод мікробіологічного скринінгу молока. Мікробіологічний скринінг молока проводили методом MALDI-TOF MS ПБ.БЛС 7.2–08.15 [87]. Принцип методу: виявлення наявних мікроорганізмів у будь-яких групах харчових продуктів, кормів і води шляхом накопичення та висіву на диференційні середовища для аеробних і анаеробних мікроорганізмів з ідентифікацією на MALDI-TOF MS. Для підрахунку мікроорганізмів

використовували метод секторних посівів відповідно ПВ.БЛС 7.2-09/08. Дослідження біологічних рідин здійснювали мікробіологічним методом (напівкількісний метод) [88].

Ідентифікацію мікроорганізмів проводили згідно РІ.БЛС 7.2-09.13 Робоча інструкція «Робота з MALDI-TOF MS Bruker Biotyper» [89]. Виділення патогенних/умовно патогенних бактерій проводили з ідентифікацією на MALDI-TOF MS [90], що відповідає стандарту ДСТУ ISO 16140:2006 [91].

Приготування середовищ проводили згідно інструкції від виробника.

Перед початком роботи готували всі необхідні реагенти та розчини. Досліджувані зразки були у рідкому стані (молоко до та після бактофугування, нормалізована та пастеризована суміші) або у напівтвердому стані (сирна маса із сироварного котла та сир після пресування).

Розведення готували у пептонно-сольовому розчині (PSS) у співвідношенні 10 г продукту на 90 см³ розчинника. Отримане розведення використовували для прямого висіву зразків на чашки з кров'яним агаром методом секторного посіву з подальшою інкубацією в аеробних та анаеробних умовах за температури 37 ± 1 °C впродовж 24 ± 1 год.

Рідкі зразки безпосередньо висівали на поверхню кров'яного агару (методом секторного посіву) та інкубували в аеробних і анаеробних умовах за температури 37 ± 1 °C протягом 24 ± 1 год. Для накопичення незначної кількості мікрофлори до 10 г рідкого або твердого зразка додавали до 90 см³ буферного пептонного розчину (BPW) та інкубували за температури 37 ± 1 °C впродовж 24 ± 1 год.

Після етапу накопичення зразки повторно висівали на диференційно-діагностичні поживні середовища методом секторного посіву (Baird-Parker Agar, XLD Endo Agar, Pseudomonas Agar, Enterococcus Agar, Bacillus cereus Agar) та інкубували впродовж 24 ± 1 або 48 ± 1 год за температури 37 ± 1 або 30 ± 1 °C залежно від вимог до відповідного середовища.

2.4.2. Метод секторних посівів. Перед посівом зразок ретельно перемішували. Чашку з агаром умовно ділили на 4 сектори. Платиновою петлею, діаметром 2 мм, місткістю 0,005 мл, робили посів проби (30–40 штрихів) на сектор А чашки Петрі з кров'яним агаром. Після цього петлю пропалювали і робили 4 штрихові посіви з сектора А в сектор І і аналогічним чином – з сектора І в ІІ і з ІІ в ІІІ. Чашки інкубували за температури 37 ± 1 °С 18–24 години, після чого підраховували число колоній, що вирости в різних секторах згідно табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Визначення ступеня бактеріального обсіменіння за кількістю виділених колоній

А	Кількість КУО на секторах			Кількість КУО в 1 см ³ продукту
	І	ІІ	ІІІ	
1–6	-	-	-	до 1000
8–20	-	-	-	3000
20–30	-	-	-	5000
30–60	-	-	-	10 000
70–80	-	-	-	50 000
100–150	5–10	-	-	100 000
-	20–30	-	-	500 000
-	40–60	-	-	1 млн (10^9)
-	100–140	10–20	-	5 млн (5×10^9)
-	-	30–40	-	10 млн (10^{10})
-	-	60–80	поодинокі колонії	100 млн (10^{11})

2.4.3. Метод постановки чутливості до антибіотиків диско-дифузійним методом (ДДМ). Метод постановки чутливості до антибіотиків диско-дифузійним методом проводили згідно РІ.БЛС 7.2-09/05 [92].

Приготування інокулюма. Для приготування інокулюму 0,5 за стандартом МакФарланда (McFarland, MF) відбирали 3–5 однакових, чітко ізольованих колоній, які вирости на поживних середовищах після 16–24 год інкубації за температури 36 ± 1 °C (близько $1,5 \times 10^8$ КУО/мл).

Перед інокуляцією чашки з агаром доводили до кімнатної температури. Стерильний ватний тампон промислового виготовлення занурювали у підготовлену суспензію мікроорганізмів, після чого надлишок інокулюму віджимали об стінки пробірки. Засів здійснювали штриховими рухами у трьох напрямках із поворотом чашки Петрі на 60°.

Диски з антибіотиками наносили на поверхню поживного середовища з інокулюмом за допомогою автоматичного диспенсера. Після накладання дисків чашки витримували у термостаті впродовж 15 хв, а потім інкубували за температури 36 ± 1 °C протягом 18–24 год.

Після завершення інкубації чашки оглядали, а діаметри зон затримки росту вимірювали з точністю до 1 мм за допомогою лінійки; при цьому за орієнтир брали зону повного пригнічення видимого росту. За результатами дослідження мікроорганізми відносили до однієї з категорій чутливості: S (чутливий), M (помірно чутливий) або R (резистентний). Інтерпретацію діаметрів зон затримки росту проводили відповідно до критеріїв EUCAST [93].

2.4.4. Побудова матриці ризиків. Для аналізу ризику контамінації мікроорганізмами застосовано категоризацію за трьома рівнями: низький, середній та високий.

Методологічний підхід до побудови матриці ризиків (5×5) ґрунтується на принципах аналізу небезпечних факторів, визначених у міжнародних та європейських нормативних документах, зокрема Codex Alimentarius Commission (CAC/RCP 1-196, 2020) та Європейському регламенті з гігієни

харчових продуктів Regulation (EC) № 852/2004. Зазначені документи встановлюють необхідність ідентифікації, оцінювання та контролю небезпечних факторів на всіх етапах харчового ланцюга, що є основою для формування ефективного HACCP-плану.

Розрахунок інтегрального показника ризику визначали за формулою:

$$\text{Risk Score} = L \times S,$$

де, L – це ймовірність виникнення небезпечного фактора (Likelihood, 1–5), S – це складність наслідків (Severity, 1–5)

Діапазон значень: від 1 до 25. Цей підхід відповідає визначенню ризику згідно Article 3 Regulation (EC) № 178/2002.

Класифікація ризиків наведена у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Класифікація ризиків

Score	Рівень ризику	Категорія контролю
1–7	низький	PRP (базові програми)
8–15	середній	посилені PRP/OPRP
16–25	високий/критичний	ССР (критична точка контролю)

Така градація узгоджується з 1-м принципом системи HACCP (ДСТУ ISO 22000: 2019, 2019) за Codex Alimentarius Commission (CAC/RCP 1-196, 2020), де вказано на необхідність оцінювати ризики за ймовірністю та складністю для подальшого визначення критичних точок контролю (ССР).

Дослідження проводили з виконання вимог до безпечності харчових продуктів, встановлених у документах: ISO 22000:2018 «Системи управління безпечністю харчових продуктів. Вимоги до будь-яких організацій харчового ланцюга»; ДСТУ ISO/TS 22002-1:2019 «Програми-передумов для безпеки харчових продуктів» [dstu_iso_ts_22002-1_2019_0.pdf](#) ([isu.net.ua](#)); ДСТУ-Н CAC/RCP 1:2012 «Продукти харчові. Настанови щодо загальних принципів гігієни (CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003, IDT)».

2.4.5. Методи статистичної обробки результатів досліджень.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми ANOVA, при цьому дані в таблицях подавали у вигляді $M \pm m$ (середнє значення $\pm$ стандартне відхилення). Різницю між групами вважали статистично достовірною за $P < 0,05$ з урахуванням поправки Бонферроні.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Видовий склад мікрофлори, ізольованої на різних етапах виробництва

3.1.1. Видовий склад мікрофлори молока-сировини. На першому етапі технологічного процесу виробництва твердого сичужного сиру «Український» під час дослідження зразків збірного сирого молока до бактофугації було ізольовано 18 видів мікроорганізмів, що наведені у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Види бактерій, виділені із молока-сировини на першому етапі технологічного процесу – до бактофугування, $M \pm m$, $n = 45$

Види ідентифікованих мікроорганізмів	% зразків із виділеними бактеріями	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³
1	2	3
<i>Escherichia coli</i>	100	$2,5 \pm 0,2 \times 10^4$
<i>Kurthia gibsonii</i>	33	$1 \pm 0,1 \times 10^1$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Lactococcus lactis</i>	17	$1 \pm 0,04 \times 10^1$
<i>Enterobacter bugandensis</i>	33	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Hafnia alvei</i>	17	$1 \pm 0,001 \times 10^1$
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	17	$1 \pm 0,03 \times 10^1$
<i>Lactococcus garvieae</i>	66	$1 \pm 0,04 \times 10^1$
<i>Citrobacter freundii</i>	17	$1 \pm 0,02 \times 10^2$
<i>Staphylococcus aureus</i>	66	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Streptococcus uberis</i>	66	$1 \pm 0,02 \times 10^1$

Продовження таблиці 3.1

1	2	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	50	$1 \pm 0,001 \times 10^1$
<i>Citrobacter braakii</i>	17	$1 \pm 0,05 \times 10^1$
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	17	$1 \pm 0,001 \times 10^1$
<i>Enterobacter cloacae</i>	33	$1 \pm 0,03 \times 10^1$
<i>Enterococcus faecium</i>	17	$1 \pm 0,002 \times 10^1$
<i>Enterobacter ludwigii</i>	33	$1 \pm 0,004 \times 10^1$

Результати отриманих досліджень засвідчили, що грамнегативну бактерію *E. coli* було виділено у всіх зразках сирого молока, що свідчить про її значну домінантність серед іншої мікрофлори. Окрім *E.coli* у 66% випадків у молоці-сировині були виділені *Streptococcus uberis* та *S. aureus*, які є збудниками маститу у корів.

Значна частина мікрофлори, ідентифікованої у молоці, мала фекальне походження. *E. faecalis* було виявлено у 50% зразків, а *Enterobacter cloacae* та *Enterobacter bugandensis* – у 33% зразків.

Також були виділені інші бактерії: *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Lactococcus garvieae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter kobei*, *Citrobacter braakii*, *Macrococcus caseolyticus*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter ludwigii*. Серед них клінічно значущою для людини є *Citrobacter braakii*, оскільки цей мікроорганізм класифікується як мікрофлора ран (особливо вмістимого ран) [97] та *Acinetobacter baumannii*, яка є збудником інфекцій дихальних шляхів, крові, черевної порожнини, сечовидільної системи, травматичних інфекцій, інфекцій центральної нервової системи, шкіри та супроводжується ризиком складних ускладнень. Ця бактерія стійка до антибіотиків та дезінфектантів, тому часто стає нозокоміальною флорою [98, 99]. *Acinetobacter nosocomialis* та *Acinetobacter baumannii*, виділені у 17 % зразків сирого молока на першому етапі – до бактофугування.

3.1.2. Мікрофлора молока-сировини після бактофугування. Другий технологічний етап – бактофугування. На цьому технологічному етапі було виділено та ідентифіковано 13 видів мікроорганізмів, які наведені у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Бактерії, виділені у сирому молоці на другому етапі технологічного процесу – після бактофугування, $M \pm m$, $n = 45$

Види ідентифікованих мікроорганізмів	% зразків із виділеними бактеріями	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³
<i>Escherichia coli</i>	100	$1,6 \pm 0,1 \times 10^3$
<i>Kurthia gibsonii</i>	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Lactococcus lactis</i>	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Enterobacter bugandensis</i>	17	$1 \pm 0,03 \times 10^1$
<i>Citrobacter freundii</i>	17	$1 \pm 0,001 \times 10^1$
<i>Staphylococcus aureus</i>	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Enterococcus faecalis</i>	66	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Enterobacter cloacae</i>	50	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Enterococcus faecium</i>	50	$1 \pm 0,01 \times 10^2$
<i>Enterobacter ludwigii</i>	50	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Chryseobacterium bovis</i>	17	$1 \pm 0,001 \times 10^1$

На першому етапі дослідження було виявлено кілька бактерій, зокрема, *Acinetobacter baumannii*, *Hafnia alvei*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus uberis*, *Enterobacter kobei*, *Citrobacter braakii*, *Macroccoccus caseolyticus*, однак їх не було зафіксовано після бактофугування. Однак деякі бактерії, які не були виявлені на першому етапі, були виділені після

бактофугування, такі як *Staphylococcus chromogenes* та *Streptococcus gallolyticus* – у 17% зразків.

У 100% зразків молока, відібраних після бактофугування, була ізольована грамнегативна бактерія *E. coli*. Також було виділено збудника маститу корів у 33% проб – *S. aureus* – та бактерії фекального походження, зокрема *Enterobacter cloacae*, у 50% зразків молока, а *Enterococcus faecalis* – у 66% зразків.

Streptococcus gallolyticus (колишня назва *Streptococcus bovis*) був виявлений у 15% зразків. Цей опортуністичний патоген іноді може потрапляти у кров людини та викликати різні захворювання.

Chryseobacterium bovis, виділені у 17% зразків у молоці після бактофугування.

У цілому виділення 13 видів мікроорганізмів після бактофугування без істотного зменшення їх кількості може свідчити про недостатню ефективність санітарної обробки технологічного обладнання або про наявність біоплівки [103].

У табл. 3.3. наведено порівняння виділених мікроорганізмів до та після бактофугування, де простежується, які бактерії, котрі були відсутні після бактофугування, хоча виявлялися на першому етапі: *Acinetobacter baumannii*, *Hafnia alvei*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus uberis*, *Enterobacter kobei*, *Citrobacter braakii*, *Macroccoccus caseolyticus*.

Встановлено, що кількість *Enterococcus faecalis* та *Enterococcus faecium* у молоці після бактофугування збільшилася, відповідно, з 50% до 66% та з 17% до 50%, що може свідчити про або їх накопичення у технологічному процесі або додаткову контамінацію.

Таблиця 3.3

Бактерії, виділені до та після бактофугування, $M \pm m$, n= 45

Види ідентифікованих мікроорганізмів	% зразків із виділеними бактеріями	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³	% зразків із виділеними бактеріями	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³
	Перед бактофугуванням		Після бактофугування	
1	2	3	4	5
<i>Escherichia coli</i>	100	$2,5 \pm 0,2 \times 10^4$	100	$1,6 \pm 0,1 \times 10^3$
<i>Kurthia gibsonii</i>	33	$1 \pm 0,1 \times 10^1$	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Lactococcus lactis</i>	17	$1 \pm 0,04 \times 10^1$	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Enterobacter bugandensis</i>	33	$1 \pm 0,02 \times 10^1$	17	$1 \pm 0,03 \times 10^1$
<i>Citrobacter freundii</i>	17	$1 \pm 0,001 \times 10^1$	17	$1 \pm 0,001 \times 10^1$
<i>Staphylococcus aureus</i>	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Enterococcus faecalis</i>	50	$1 \pm 0,001 \times 10^1$	66	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Enterobacter cloacae</i>	33	$1 \pm 0,03 \times 10^1$	50	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Enterococcus faecium</i>	17	$1 \pm 0,002 \times 10^1$	50	$1 \pm 0,01 \times 10^2$
<i>Enterobacter ludwigii</i>	33	$1 \pm 0,004 \times 10^1$	50	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	-	-	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	-	-	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Chryseobacterium bovis</i>	-	-	17	$1 \pm 0,001 \times 10^1$
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	17	$1 \pm 0,03 \times 10^1$	-	-

Продовження таблиці 3.3

1	2	3	4	5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	17	$1 \pm 0,001 \times 10^1$	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i>	66	$1 \pm 0,04 \times 10^1$	-	-
<i>Streptococcus uberis</i>	66	$1 \pm 0,02 \times 10^1$	-	-
<i>Citrobacter braakii</i>	17	$1 \pm 0,05 \times 10^1$	-	-
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	17	$1 \pm 0,001 \times 10^1$	-	-

Хоча *Lactococcus lactis* не є умовно-патогенними мікроорганізмами, а навпаки, компонентами закваски, наявність та підвищення до 33% у молоці після бактофугування свідчить про циркуляцію даних мікроорганізмів під час технологічних процесів молокопереробної потужності або можливе накопичення.

Загалом після бактофугування було виділено 13 видів мікроорганізмів, з них 3 види – *Staphylococcus chromogenes* *Streptococcus gallolyticus* *Chryseobacterium bovis*, які не були виділені на першому етапі.

3.1.3. Мікрофлора нормалізованої за вмістом жиру молочної суміші.

Наступним етапом було вивчення зразків молочної суміші, нормалізованої за вмістом жиру. Результати дослідження показали, що на цьому етапі виробництва було повторно виділено 18 видів мікроорганізмів, що наведені у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

**Бактерії, виділені зі зразків молочної суміші, нормалізованої за
вмістом жиру, $M \pm m$, $n=45$**

Види ідентифікованих мікроорганізмів	% зразків із виділеними бактеріями	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³
<i>Escherichia coli</i>	66	$1 \pm 0,1 \times 10^4$
<i>Kurthia gibsonii</i>	50	$1 \pm 0,1 \times 10^1$
<i>Enterobacter bugandensis</i>	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Hafnia alvei</i>	33	$1 \pm 0,04 \times 10^1$
<i>Lactococcus garvieae</i>	33	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Citrobacter freundii</i>	50	$1,4 \pm 0,7 \times 10^4$
<i>Enterococcus faecalis</i>	66	$3,4 \pm 0,4 \times 10^2$
<i>Citrobacter braakii</i>	66	$1 \pm 0,3 \times 10^3$
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	50	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Enterobacter cloacae</i>	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Enterobacter ludwigii</i>	17	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Moraxella osloensis</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Buttiauxella gaviniae</i>	17	$1 \pm 0,001 \times 10^1$
<i>Aeromonas media</i>	17	$1 \pm 0,03 \times 10^1$
<i>Citrobacter koseri</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Lelliottia amnigena</i>	33	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Streptococcus parauberis</i>	17	$1 \pm 0,002 \times 10^1$
<i>Citrobacter gillenii</i>	17	$1 \pm 0,02 \times 10^4$

На цьому етапі дослідження грамнегативна бактерія *E. coli* була виділена у 66 % зразків молочної суміші, нормалізованої за жирністю, що на 34 % нижче, порівняно із попереднім етапом. *Streptococcus uberis*, який виділявся із сирого молока після бактофугування та у нормалізованій суміші, не був виявлений. *S. aureus*, який траплявся у сирому молоці та після бактофугування, також не

був виявлений у нормалізованій суміші. У 66 % нормалізованих зразків було виявлено *Enterococcus faecalis*, що аналогічно кількості попереднього етапу. Кількість *Enterobacter cloacae* та *Enterobacter ludwigii* також зменшилася, що, ймовірно, пояснюється пригніченням одних видів бактерій іншими.

Ми також відзначили появу мікроорганізмів, які не були виділені на попередніх двох етапах, а саме: *Lelliottia amnigena*, *Streptococcus parauberis* та *Citrobacter gillenii*, *Citrobacter koseri*, *Moraxella osloensis*, *Buttiauxella gaviniae*, *Aeromonas media*. Це може бути пов'язано як із наявністю біоплівки і збільшенням кількості деяких видів бактерій та зменшенням інших, так і з пригніченням певних бактерій, залежно від їхньої чисельності або з потраплянням цих бактерій із мийної води чи інших потенційних джерел у молокопереробному цеху.

Особливу увагу слід приділити *Lelliottia amnigena* – грамнегативній факультативно анаеробній бактерії [104]. *Lelliottia amnigena* виділена у 33% зразках нормалізованої суміші.

Streptococcus parauberis був виділений у 17% зразків нормалізованого молока та не виявлявся на попередніх етапах.

3.1.4. Видовий склад мікрофлори у пастеризованому молоці. На наступному, третьому етапі, ми досліджували пастеризовану суміш. Види мікроорганізмів були виявлені у пастеризованому молоці та наведені у табл. 3.5.

Як свідчать результати досліджень, наведені в табл. 3.5, знову було виявлено *E. coli* у 17% досліджених зразків, але в значно меншій кількості ($1 \pm 0,01 \times 10^3$). *Streptococcus gallolyticus* було виділено та ідентифіковано також у 17% зразків. Це грампозитивний умовно-патогенний мікроорганізм, який може спричиняти бактеріємію та ендокардит у людей. Після пастеризації також було виявлено появу різних видів бактерій родини *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*), які раніше не фіксувалися у зразках, взятих на попередніх етапах технологічного процесу.

Таблиця 3.5

Бактерії, виділені зі зразків пастеризованого молока, $M \pm m$, $n = 45$

Види ідентифікованих мікроорганізмів	% зразків із виділеними бактеріями	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³
<i>Escherichia coli</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^3$
<i>Kurthia gibsonii</i>	17	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Hafnia alvei</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Enterococcus faecalis</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	17	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Acinetobacter pittii</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Bacillus cereus</i>	33	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Bacillus subtilis</i>	33	$1 \pm 0,001 \times 10^1$
<i>Bacillus licheniformis</i>	66	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Bacillus megaterium</i>	17	$1 \pm 0,002 \times 10^1$

Kurthia gibsonii витримала пастеризацію та була виявлена у 17 % зразків. Ця бактерія виділялась на всіх стадіях, на яких проводилися дослідження. Ймовірно цей мікроорганізм потрапив у технологічний процес разом із сировиною.

Acinetobacter pittii виділений у 17% зразків та не був виявлений на попередніх етапах. Це може свідчити про можливу внутрішню контамінацію та циркуляцію бактерій у середині технологічного обладнання молокопереробного підприємства.

Зміни у видовому складі та кількісних показниках виділених бактерій із молока під впливом пастеризації наведені в табл. 3.6.

Таблиця 3.6

Бактерії, виділені до та після пастеризації, $M \pm m$, $n = 45$

Види ідентифікованих мікроорганізмів	% зразків із виділеними бактеріями	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³	% зразків із виділеними бактеріями	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³
	До пастеризації		Після пастеризації	
1	2	3	4	5
<i>Escherichia coli</i>	66	$1 \pm 0,1 \times 10^4$	17	$1 \pm 0,01 \times 10^3$
<i>Kurthia gibsonii</i>	50	$1 \pm 0,1 \times 10^1$	17	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Enterobacter bugandensis</i>	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	33	$1 \pm 0,04 \times 10^1$	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Lactococcus garvieae</i>	33	$1 \pm 0,02 \times 10^1$	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	50	$1,4 \pm 0,7 \times 10^4$	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	66	$3,4 \pm 0,4 \times 10^2$	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Citrobacter braakii</i>	66	$1 \pm 0,3 \times 10^3$	-	-
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	50	$1 \pm 0,01 \times 10^1$	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$	-	-
<i>Enterobacter ludwigii</i>	17	$1 \pm 0,02 \times 10^1$	-	-
<i>Moraxella osloensis</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$	-	-

Продовження таблиці 3.6

1	2	3	4	5
<i>Buttiauxella gaviniae</i>	17	$1 \pm 0,001 \times 10^1$	-	-
<i>Aeromonas media</i>	17	$1 \pm 0,03 \times 10^1$	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$	-	-
<i>Lelliottia amnigena</i>	33	$1 \pm 0,02 \times 10^1$	-	-
<i>Streptococcus parauberis</i>	17	$1 \pm 0,002 \times 10^1$	-	-
<i>Citrobacter gillenii</i>	17	$1 \pm 0,02 \times 10^4$	-	-
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	-	-	17	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Acinetobacter pittii</i>	-	-	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	33	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	33	$1 \pm 0,001 \times 10^1$
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	66	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	17	$1 \pm 0,002 \times 10^1$

Наведені в табл. 3.6. дані свідчать про суттєві зміни у видовому складі та кількісних показниках мікроорганізмів молока під впливом пастеризації. До пастеризації мікробіота була представлена широким спектром грамнегативних та грампозитивних бактерій, зокрема представниками родин *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Moraxellaceae* та молочнокислими бактеріями. Частота виявлення окремих видів сягала 66 % зразків, а кількість мікроорганізмів – до $1,4 \times 10^4$ КУО/см³ (*Citrobacter freundii*, *E. coli*).

Після пастеризації виявлено різке зниження як різноманіття, так і рівня контамінації мікроорганізмами. Більшість грамнегативних неспоротвірних бактерій, зокрема *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas* та *Lelliottia*, не

виявлялися, що свідчить про їх чутливість до теплової обробки. Частота виявлення *E. coli* знизилася з 66 % до 17 %, а її кількість – на один порядок.

Разом із тим, після пастеризації в молоці зберігалася теплостійка мікрофлора, представлена переважно спороутвірними бактеріями роду *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*), які виявлялися у 17–66 % зразків за рівня контамінації близько 10^1 КУО/см³. Крім того, після пастеризації були ідентифіковані окремі грампозитивні коки (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus gallolyticus*), що вказує на їх підвищену стійкість до температурної обробки.

Таким чином, пастеризація ефективно знижує загальну мікробну контамінацію та елімінує більшість психротрофних і санітарно-показових мікроорганізмів, однак не забезпечує повного усунення термодурної мікрофлори, що має важливе значення для подальших етапів переробки молока та формування мікробіологічної якості молочних продуктів.

3.1.5. Бактерії, виділені із суміші сиру після пресування. На наступному, четвертому етапі, було досліджено суміш сиру після пресування, результати якої наведено у табл. 3.7.

Таблиця 3.7

Бактерії, виділені із зразків суміші сиру після пресування, $M \pm m$, n= 45

Види ідентифікованих мікроорганізмів	% зразків із виділеними бактеріями	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³
1	2	3
<i>Escherichia coli</i>	83	$7,4 \pm 0,01 \times 10^3$
<i>Kurthia gibsonii</i>	17	$1 \pm 0,1 \times 10^1$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	50	$1 \pm 0,01 \times 10^1$

Продовження таблиці 3.7

1	2	3
<i>Lactococcus lactis</i>	66	$6 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Enterococcus faecalis</i>	50	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Citrobacter braakii</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Enterobacter cloacae</i>	33	$5,05 \pm 0,01 \times 10^2$
<i>Enterococcus faecium</i>	50	$1,3 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Bacillus cereus</i>	33	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	$1 \pm 0,01 \times 10^3$
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Pseudomonas putida</i>	17	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Enterobacter hormaechei</i>	17	$1 \pm 0,1 \times 10^1$
<i>Klebsiella variicola</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$

Після пресування сиру *K. pneumoniae* була виділена у 100% зразків суміші. *E. coli* та різні форми ентерококів (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) виявлялися у більшості зразків (83%). У половині досліджених зразків було виявлено *Acinetobacter baumannii* та різні види ентеробактерій (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter xiangfangensis*).

На відміну від попередніх етапів, у суміші після пресування сиру були виявлені *K. pneumoniae*, різні варіанти *Klebsiella*, *Enterobacter xiangfangensis*, *Pseudomonas putida* та *Enterobacter hormaechei*, що може свідчити про внутрішнє обсіменіння під час виробництва сиру. Особливу увагу слід приділити *K. pneumoniae*, оскільки це зоонозний патоген, який викликає різноманітні інфекційні захворювання у людей та тварин.

Виявлення цього патогену на передостанньому етапі виробництва сиру в усіх зразках свідчить про можливе потрапляння *K. pneumoniae* у кінцевий продукт.

3.1.6. Бактерії, виділені із розсолу для засолювання сиру. Оскільки мікроорганізми можуть також потрапляти у молоко на всіх технологічних етапах через воду, було досліджено 15 зразків води, що використовувалася під час виробництва – мікроорганізми не виявлені.

Також досліджувалася присутність мікроорганізмів у розсолі для засолювання сиру до та після пастеризації – ізольовано 7 типів мікроорганізмів, що наведено в табл. 3.8.

Таблиця 3.8

Мікроорганізми, виділені із зразків розсолу для засолювання сиру,

$M \pm m, n=45$

Види ідентифікованих мікроорганізмів	Кількість мікроорганізмів у розсолі до пастеризації, КУО/см ³	Кількість мікроорганізмів у розсолі після пастеризації, КУО/см ³
<i>Escherichia coli</i>	$2 \pm 0,01 \times 10^5$	$2 \pm 0,02 \times 10^5$
<i>Lactococcus garvieae</i>	$1 \pm 0,01 \times 10^1$	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	$1 \pm 0,01 \times 10^1$	$1 \pm 0,001 \times 10^1$
<i>Enterobacter cloacae</i>	$1 \pm 0,02 \times 10^3$	$2 \pm 0,03 \times 10^3$
<i>Enterococcus faecium</i>	$1 \pm 0,001 \times 10^1$	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$1 \pm 0,02 \times 10^3$	$1 \pm 0,01 \times 10^3$
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	-	$1 \pm 0,001 \times 10^1$

E. coli – найчисельніший мікроорганізм у розсолі з кількістю 2×10^5 КУО/см³ як до, так і після пастеризації. Це свідчить про те, що пастеризація не змогла значно знизити рівень *E. coli* у розсолі, що може бути пов'язано з повторним обсіменінням або високою стійкістю бактерій у цьому середовищі.

K. pneumoniae та *Enterobacter cloacae* присутні у розсолі в кількості 10^3 КУО/см³ до і після пастеризації. *K. pneumoniae* ми виявляли раніше у зразках сиру після пресування. Кількість *Enterobacter cloacae* навіть трохи зросла після

пастеризації (2×10^3 КУО/см³), що може свідчити про спорову або термостійку форму бактерій або про контамінацію під час процесу.

Enterococcus faecalis присутній в кількості 10^1 КУО/см³ до і після пастеризації.

Lactococcus garvieae та *Enterococcus faecium* були виявлені лише до пастеризації і не виявлені після неї, що свідчить про їх термолабільність.

Enterobacter xiangfangensis виявлено лише після пастеризації у невеликій кількості (1×10^3 КУО/см³), можливо, через постпастеризаційне обсіменіння.

3.1.7. Видовий склад мікроорганізмів твердого сичужного сиру «Український». У твердому сироваточному сири після дозрівання ізольовано 18 видів мікроорганізмів, які наведені у табл. 3.9.

Таблиця 3.9

Бактерії, виділені із зразків твердого сиру «Український» після 30-денного дозрівання, $M \pm m$, $n = 45$

Види ідентифікованих мікроорганізмів	% зразків із виділеними бактеріями	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³
1	2	3
<i>Escherichia coli</i>	83	$5,6 \pm 0,01 \times 10^2$
<i>Kurthia gibsonii</i>	33	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	50	$1 \pm 0,002 \times 10^1$
<i>Lactococcus lactis</i>	66	$1,28 \pm 0,02 \times 10^2$
<i>Enterococcus faecalis</i>	66	$1 \pm 0,002 \times 10^1$
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	33	$1 \pm 0,002 \times 10^1$
<i>Enterobacter cloacae</i>	33	$5 \pm 0,06 \times 10^2$
<i>Enterococcus faecium</i>	50	$1,33 \pm 0,001 \times 10^1$

Продовження таблиці 3.9

1	2	3
<i>Bacillus cereus</i>	50	$1 \pm 0,002 \times 10^1$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	$1 \pm 0,05 \times 10^3$
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	17	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Pseudomonas putida</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Micrococcus luteus</i>	17	$1 \pm 0,03 \times 10^1$
<i>Corynebacterium flavescens</i>	17	$1 \pm 0,02 \times 10^1$
<i>Staphylococcus hominis</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$
<i>Enterobacter asburiae</i>	17	$1 \pm 0,01 \times 10^1$

За результатами досліджень у сирі виявлено *E. coli* – 10^2 КУО у 83% зразків. Цей мікроорганізм простежується впродовж всього технологічного ланцюга – від сировини до готового продукту.

K. pneumoniae була ідентифікована у зразках сиру після пресування та у готовому сирі у 100 % випадків, хоча на попередніх етапах ця бактерія не виявлялась. Найімовірніше розсіл був контамінований бактеріями на фінальних етапах виробництва. Загалом у готовому продукті – українському твердому сирі було виділено 18 видів мікроорганізмів, включно з *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, що становить особливу небезпеку для безпечності споживання сиру.

На фінальному етапі також було виділено бактерії, яких не було на попередніх етапах обробки молока, такі як *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium flavescens*, *Staphylococcus hominis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Enterobacter asburiae*, *Corynebacterium flavescens*. Ймовірно вони потрапили як частина стартових культур, доданих під час виробництва сиру. *Lysinibacillus sphaericus* зазвичай трапляється в ґрунті та може бути патогеном для комах; рідко спричиняє інфекційні хвороби у людей [162].

Молоко-сировина для виробництва сиру містила 18 видів мікроорганізмів, включно з бактеріями кишкової групи – *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii*, *Citrobacter braakii*, *Enterobacter kobei* – та патогенами маститу великої рогатої худоби – *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus uberis*, що свідчить про недостатню санітарну якість сирого молока. Особливу увагу слід приділити умовно-патогенним мікроорганізмам, які можуть спричиняти різноманітні інфекції: *Lactococcus garvieae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter bugandensis*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterococcus faecalis*.

Enterococcus faecalis ізолювали на всіх етапах технологічного процесу, крім суміші для зсідання, а *Enterococcus faecium* – на початку процесу (до та після бактофугування) і в кінці (після пресування та дозрівання сиру).

Streptococcus gallolyticus виділили після бактофугування та після пастеризації, на інших стадіях він не був зафіксований.

Після пастеризації з'явилися бактерії родини *Bacillus* (*B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*), яких не виявляли на попередніх етапах.

Виявлено також *Acinetobacter pittii* з родини *Moraxellaceae* лише на етапі пастеризації.

3.1.8. Динаміка видового складу мікроорганізмів на всіх етапах виробництва сиру. У табл. 3.10. представлено динаміку мікробного складу на всіх етапах технологічного процесу виробництва українського твердого сичужного сиру – від сирого молока до готового продукту. Отримані результати свідчать про високу різноманітність мікрофлори, а також про неповне усунення та повторну контамінацію окремими мікроорганізмами на різних стадіях переробки.

На початковому етапі (сире молоко) було виявлено широкий спектр мікроорганізмів, зокрема, кишкову мікрофлору (*E. coli* – 100%), умовно-патогенні ентеробактерії (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Hafnia*), збудників маститу (*S.*

aureus, *Streptococcus uberis*), а також опортуністичні патогени (*Acinetobacter baumannii*, *A. nosocomialis*).

Таблиця 3.10

Частка бактерій, виділених на етапах виробництва твердого сичужного сиру «Український», $M \pm m$, $n = 45$

Види ідентифікованих мікроорганізмів	Сире молоко	Після бакто-фугування	Норма-лізова-на суміш	Після пасте-ризації	Сир після пресування	Сир після дозрівання
	% зразків із виділеними бактеріями					
1	2	3	4	5	6	7
<i>Escherichia coli</i>	100	100	66	17	83	83
<i>Kurthia gibsonii</i>	33	33	50	17	17	17
<i>Acinetobacter baumannii</i>	17	-	-	-	50	33
<i>Lactococcus lactis</i>	17	50	-	-	66	66
<i>Enterobacter bugandensis</i>	33	17	33	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	17	33	17	-	-	-
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	17			-	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i>	66		33	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	17	17	50	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	66	50	-	-	-	-
<i>Streptococcus uberis</i>	33	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter kobei</i>	17	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	50	66	66	17	50	50
<i>Citrobacter braakii</i>	17	-	66	-	-	-
<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	17	-	50	-	33	33
<i>Enterobacter cloacae</i>	33	50	33	-	33	33
<i>Enterococcus faecium</i>	17	50		-	50	17

Продовження таблиці 3.10

1	2	3	4	5	6	7
<i>Enterobacter ludwigii</i>	33	50	17	-	-	-
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	-	17	-	-	-	-
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	-	17	-	100	-	-
<i>Chryseobacterium bovis</i>	-	17	-	-	-	-
<i>Moraxella osloensis</i>	-	-	17	-	-	-
<i>Buttiauxella gaviniae</i>	-	-	17	-	-	-
<i>Aeromonas media</i>	-	-	17	-	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	-	-	17	-	-	-
<i>Lelliottia amnigena</i>	-	-	33	-	-	-
<i>Streptococcus parauberis</i>	-	-	17	-	-	-
<i>Citrobacter gillenii</i>	-	-	17	-	-	-
<i>Acinetobacter pittii</i>	-	-	-	17	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	33	33	50
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	33	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	66	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	17	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	100	100
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	-	-	-	-	17	17
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	17	17
<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	-	-	-	17	-
<i>Klebsiella variicola</i>	-	-	-	-	17	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	17
<i>Corynebacterium flavescens</i>	-	-	-	-	-	17
<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	-	-	-	17
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	-	-	-	-	-	17
<i>Enterobacter asburiae</i>	-	-	-	-	-	17

На етапі нормалізованої молочної суміші відзначено збереження кишкової та ентерококової мікрофлори, зокрема, *E. coli* (66%), *Enterococcus faecalis* (66%) та *Macroccoccus caseolyticus* (50%).

Пастеризація суттєво знизилася мікробне навантаження, однак не забезпечила повного знищення мікроорганізмів. Після пастеризації було виявлено *E. coli*, *Enterococcus faecalis* та *Streptococcus gallolyticus* (100%), а також споротвірні бактерії роду *Bacillus* (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*), що підтверджує їх термостійкість та здатність до виживання після теплової обробки.

На стадії суміші сиру після пресування виявлено різке зростання частоти виявлення *K. pneumoniae* (100%), а також поява *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas putida* та *Enterobacter xiangfangensis*.

У готовому продукті після 30-денного дозрівання ізольовано найбільшу кількість видів мікроорганізмів, включно з клінічно значущими (*K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Enterococcus spp.*), а також мікрофлорою, характерною для дозрівання та виробничого середовища (*Micrococcus luteus*, *Corynebacterium flavescens*, *Staphylococcus hominis*, *Lysinibacillus sphaericus*). Особливо небезпечним є 100% виявлення *K. pneumoniae* у готовому сирі, що свідчить про ризики для безпечності продукту.

Таким чином, результати таблиці 3.10. демонструють, що:

- технологічний процес не забезпечує повного усунення потенційно небезпечних мікроорганізмів;
- має місце циркуляція та повторна контамінація мікрофлори на різних етапах виробництва;
- виявлено виживання термостійких і спорових форм бактерій, а також клінічно значущих опортуністичних патогенів.

Це підтверджує необхідність комплексного мікробіологічного контролю не лише молока-сировини, а й усього технологічного ланцюга, включно з обладнанням, розсолами та виробничим середовищем.

Отже, можемо зробити наступні висновки.

- 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 flavescens*, *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.

3.2. Динаміка стійкості до антибактеріальних препаратів окремих видів виділених бактерій на етапах виробництва твердого сичужного сиру

3.2.1. Стійкість *E. coli* до антибіотиків. На підставі результатів наших попередніх досліджень встановлено, що найпоширенішими представниками родини *Enterobacteriaceae*, виявленими на всіх етапах виробництва твердого сичужного сиру, була *E. coli*. У зв'язку з цим було проведено подальші дослідження з метою визначення чутливості ізолятів *E. coli* до антибактеріальних препаратів, виділених на різних стадіях технологічного процесу.

Чутливість цих бактерій до антибактеріальних препаратів порівнювали до бактофугування та у нормалізованій суміші, що наведено на рис. 3.1 і у табл. 3.11.

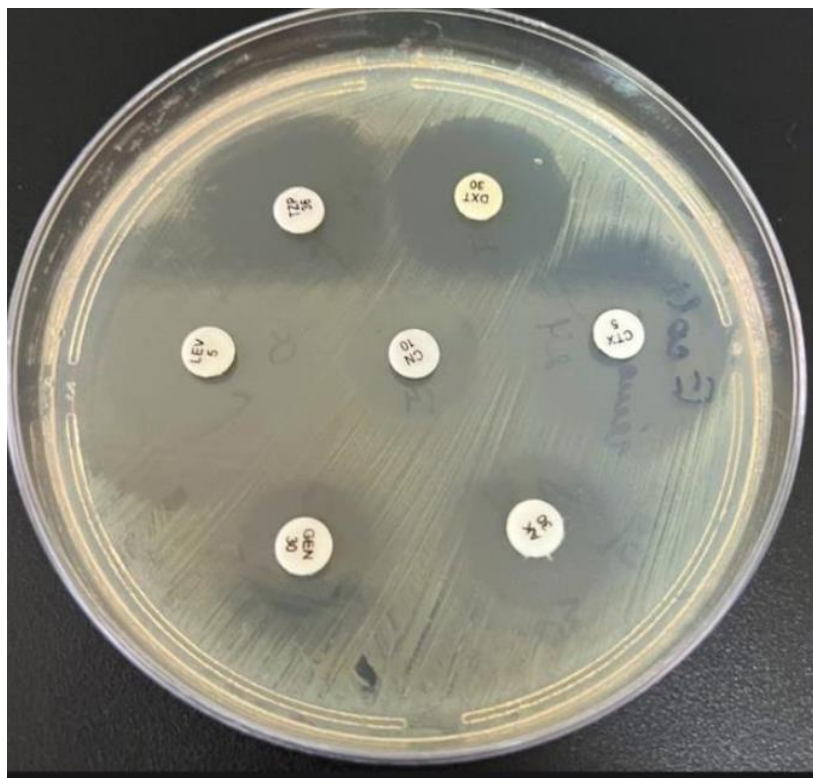


Рис. 3.1. Визначення чутливості *E. coli* до антибактеріальних препаратів диско-дифузійним методом.

Чутливість цих бактерій до антибактеріальних препаратів порівнювали до бактофугування та у нормалізованій суміші, що наведено у табл.і 3.11.

Таблиця 3.11

Визначення чутливості *E. coli* до антибактеріальних препаратів, ізольованої із молока до бактофугування та з нормалізованої молочної суміші, $M \pm m$, $n = 45$

Назва антибіотика	Нормативи, мм* (діаметр зони затримки росту)			Молоко до бактофугування, мм (діаметр зони інгібування росту)	Нормалізова на молочна суміш, мм (діаметр зони затримки росту)
	S	M	R		
1	2	3	4	5	6
Фторхінолони					
Ципрофлоксацин	≥ 25	22-24	< 22	$< 6^{**}$	30,11 $\pm 0,49^{****}$
Пеніциліни					
Ампіцилін	≥ 14	-	-	$< 6^{**}$	20,33 $\pm 0,47^{****}$
Амоксицилін/ клавуланат	≥ 19	-	-	$14,36 \pm 0,21^{**}$	21,00 $\pm 0,82^{****}$
Цефалоспорины					
Цефалексин	≥ 14	-	< 14	$10,23 \pm 0,18^{**}$	23,33 $\pm 0,58^{****}$
Цефотаксим	≥ 20	-	< 17	$10,57 \pm 0,12^{**}$	21,83 $\pm 0,37^{****}$

Продовження таблиці 3.11

1	2	3	4	5	6
Цефепім	≥ 27	-	< 24	$15,13 \pm 0,13^{**}$	$29,5 \pm 0,50^{****}$
Тетрацикліни					
Доксициклін	≥ 19	17-18	< 17	$8,23 \pm 0,38^{**}$	$18,33 \pm 0,47^{***}$
Аміноглікозиди					
Гентаміцин	≥ 17	-	< 17	$8,61 \pm 0,62^{**}$	$15,07 \pm 0,04^{**}$
Амікацин	≥ 18	-	< 18	$16,23 \pm 0,18^{**}$	$16,11 \pm 0,15^{**}$
Інші					
Триметоприм/ сульфаметоксазол	≥ 14	11-13	< 11	$< 6^{**}$	$17,17 \pm 0,56^{****}$
Фосфоміцин	≥ 21	-	< 21	$< 6^{**}$	$29,52 \pm 0,19^{****}$

Примітка: S – чутливий; M – помірно чутливий; R – резистентний. * Відповідно до критеріїв EUCAST. ** – резистентний; *** – помірно чутливий; **** – чутливий.

E. coli, яку ми ізолювали на наступному етапі виробництва сиру з нормалізованої суміші, вже була чутлива до більшості антибактеріальних препаратів згідно з інтерпретацією EUCAST. Винятком була помірна чутливість до доксицикліну, а резистентність до гентаміцину та амікацину зберігалася. Однак для гентаміцину зона пригнічення росту змінилася з $8,61 \pm 0,62^{**}$ мм до $15,07 \pm 0,04^{**}$ мм, що свідчить про збільшення зони пригнічення росту в 1,8 раза. Отримані дані вказують на вплив технологічних процесів на чутливість бактерій до антибактеріальних препаратів. Можливо така відновлена чутливість пояснюється тим, що *E. coli*, яка залишилася після бактофугації, вже мала інші

властивості або набір бактерій, що перебував поруч із нею до бактофугації, спричинив крос-реакцію і, таким чином, *E. coli* після бактофугації була вже чутлива до більшості протестованих антибактеріальних препаратів.

Далі ми порівняли чутливість до антибактеріальних препаратів *E. coli*, виділеної на етапі після пастеризації молока та з готового сиру, що наведено в табл. 3.12.

Таблиця 3.12

**Визначення чутливості *E. coli* до антибактеріальних препаратів,
виділеної із нормалізованої молочної суміші після пастеризації та з
готового сиру, $M \pm m$, $n = 45$**

Назва антибіотика	Нормативи, мм* (діаметр зони затримки росту)			Молоко після пастеризації, мм (діаметр зони інгібування росту)	Готовий сир, мм (діаметр зони затримки росту)
	S	M	R		
1	2	3	4	5	6
Фторхінолони					
Ципрофлоксацин	≥ 25	22-24	< 22	$28,12 \pm 0,43^{****}$	$31,36 \pm 0,23^{****}$
Пеніциліни					
Ампіцилін	≥ 14	-	-	$< 6^{**}$	$18,33 \pm 0,14^{****}$
Амоксицилін/ клавуланат	≥ 19	-	-	$< 6^{**}$	$21,15 \pm 0,09^{****}$
Цефалоспорини					
Цефалексин	≥ 14	-	< 14	$< 6^{**}$	$23,33 \pm 0,58^{****}$
Цефотаксим	≥ 20	-	< 17	$< 6^{**}$	$25,16 \pm 0,23^{****}$
Цефепім	≥ 27	-	< 24	$< 6^{**}$	$30,13 \pm 0,17^{****}$
Тетрацикліни					
Доксициклін	≥ 19	17-18	< 17	$< 6^{**}$	$17,66 \pm 0,58^{***}$

Продовження таблиці 3.12

1	2	3	4	5	6
Аміноглікозиди					
Гентаміцин	≥ 17	-	< 17	$9,32 \pm 0,21^{**}$	$16,09 \pm 0,21^{**}$
Амікацин	≥ 18	-	< 18	$12,13 \pm 0,23^{**}$	$15,11 \pm 0,24^{**}$
Інші					
Триметоприм/сульфаметоксазол	≥ 14	11-13	< 11	$< 6^{**}$	$23,17 \pm 0,56^{****}$
Фосфоміцин	≥ 21	-	< 21	$< 6^{**}$	$28,22 \pm 0,49^{****}$

Примітка: S – чутливий; M – помірно чутливий; R – резистентний.

*Відповідно до критеріїв EUCAST. ** – резистентний; *** – помірно чутливий; **** – чутливий.

Згідно із отриманими результатами визначення чутливості *E. coli*, виділеної із нормалізованої суміші молока після пастеризації, було встановлено, що бактерія є резистентною до ампіциліну, амоксициліну, цефалексину, цефотаксиму, цефепіму, доксицикліну, гентаміцину, амікацину, триметоприму, фосфоміцину так само, як і під час дослідження сирого молока. Однак *E. coli* в цьому експерименті виявилася чутливою до ципрофлоксацину, на відміну від *E. coli*, виділеної із сирого молока. Таку повторну зміну чутливості бактерій на наступному етапі виробництва можна пояснити наявністю біоплівки на обладнанні, що використовується для пастеризації молока.

Оскільки розсіл, який використовувався для засолювання сиру до та після пастеризації, також містив *E. coli* та *K. pneumoniae*, причому остання є найбільш значущою щодо безпечності сиру серед виявлених бактерій [184], ці бактерії також були досліджені на чутливість до антибактеріальних препаратів.

Таблиця 3.13

Визначення чутливості до антибактеріальних препаратів *E. coli*, виділеної з розсолу, який використовувався для виробництва твердого сичужного сиру до та після пастеризації, $M \pm m$, $n = 45$

Назва антибіотика	Нормативи, мм* (діаметр зони затримки росту)			Розсіл до пастеризації, мм (діаметр зони інгібування росту)	Розсіл після пастеризації, мм (діаметр зони затримки росту)
	S	M	R		
1	2	3	4	5	6
Фторхінолони					
Ципрофлоксацин	≥ 25	22–24	< 22	$32,14 \pm 0,21^{****}$	$28,25 \pm 0,11^{****}$
Пеніциліни					
Ампіцилін	≥ 14	-	-	$24,63 \pm 0,41^{****}$	$< 6^{**}$
Амоксицилін/ клавуланат	≥ 19	-	-	$24,72 \pm 0,52^{****}$	$< 6^{**}$
Цефалоспорины					
Цефалексин	≥ 14	-	< 14	$23,77 \pm 0,56^{****}$	$< 6^{**}$
Цефотаксим	≥ 20	-	< 17	$30,32 \pm 0,47^{****}$	$< 6^{**}$
Цефепім	≥ 27	-	< 24	$30,93 \pm 0,83^{****}$	$< 6^{**}$
Тетрацикліни					
Доксициклін	≥ 19	17-18	< 17	$18,21 \pm 0,91^{***}$	$< 6^{**}$
Аміноглікозиди					
Гентаміцин	≥ 17	-	< 17	$20,42 \pm 0,13^{**}$	$25,07 \pm 0,23^{**}$
Амікацин	≥ 18	-	< 18	$22,31 \pm 0,17^{**}$	$21,14 \pm 0,20^{**}$

Продовження таблиці 3.13

1	2	3	4	5	6
Інші					
Триметоприм/ сульфаметоксазол	≥ 14	11-13	< 11	$22,18 \pm 0,21^{****}$	$< 6^{**}$
Фосфоміцин	≥ 21	-	< 21	$32,11 \pm 0,25^{****}$	$20,11 \pm 0,35^{****}$

Примітка: S – чутливий; M – помірно чутливий; R – резистентний.

*Відповідно до критеріїв EUCAST. ** – резистентний; *** – помірно чутливий; **** – чутливий.

Дані, наведені в таблиці 3.13. свідчать про те, 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. Водночас вона була не чутливою до більшості інших антибактеріальних препаратів, таких як ампіцилін, амоксицилін, цефалексин, цефотаксим, цефепім, доксициклін та триметоприм, що, ймовірно, пов'язано з наявністю біоплівки на обладнанні для пастеризації [185].

3.2.2. Чутливість до антибактеріальних препаратів *K. pneumoniae*.

Визначення чутливості до антибактеріальних препаратів для *K. pneumoniae* представлено на рис. 3.2 та в табл. 3.14.

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. Досліджень щодо присутності *K. pneumoniae* на різних етапах виробництва сиру в літературі не описано, однак є дані про виділення цього патогену з готових сирів [186].

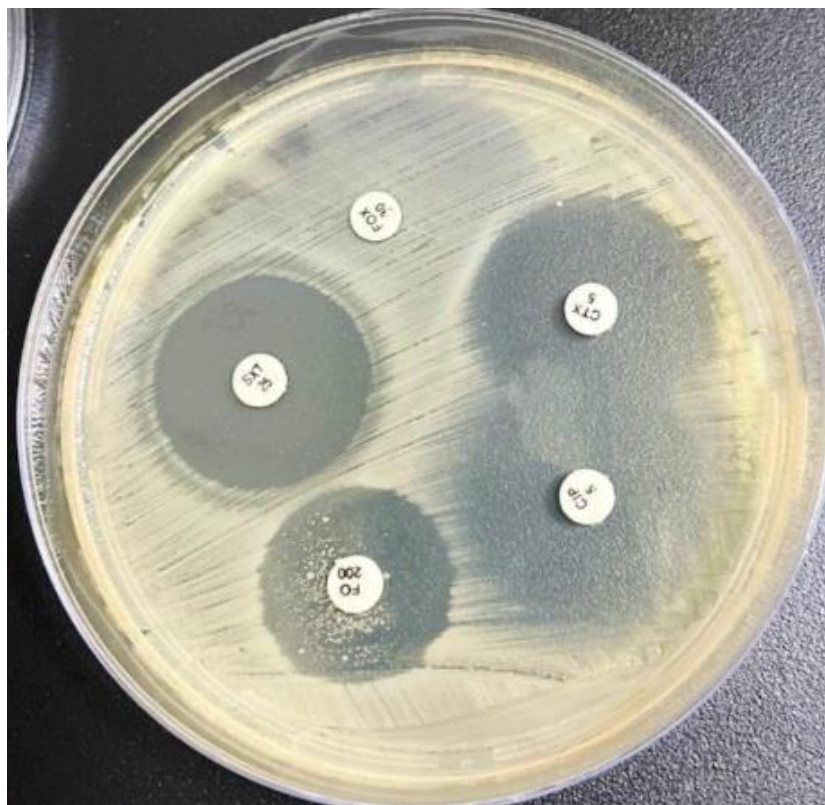


Рис. 3.2. Визначення чутливості *K. pneumoniae* до антибактеріальних препаратів диско-дифузійним методом.

Таблиця 3.14

Визначення чутливості *K. pneumoniae* до антибактеріальних препаратів, виділеної з розсолу та готового сиру, $M \pm m$, $n = 45$

Назва антибіотика	Нормативи, мм* (діаметр зони затримки росту)			Розсіл, мм (діаметр зони інгібування росту)	Готовий продукт, мм (діаметр зони затримки росту)
	S	M	R		
1	2	3	4	5	6
Фторхінолони					
Ципрофлоксацин	≥ 25	22-24	< 22	$28,07 \pm 0,32^{****}$	$30,23 \pm 0,19^{****}$ $27,42 \pm 0,26^{****}$

Продовження таблиці 3.14

1	2	3	4	5	6
Пеніциліни					
Ампіцилін	≥ 14	-	-	$19,85 \pm 0,41^{****}$	$12,23 \pm 0,11^{**}$ $10,23 \pm 0,25^{**}$
Амоксицилін/ клавуланат	≥ 19	-	-	$24,67 \pm 0,22^{****}$	$24,13 \pm 0,03^{****}$ $21,27 \pm 0,12^{****}$
Цефалоспорины					
Цефалексин	≥ 14	-	< 14	$25,02 \pm 0,12^{****}$	$23,81 \pm 0,27^{****}$ $20,33 \pm 0,16^{****}$
Цефотаксим	≥ 20	-	< 17	$28,21 \pm 0,34^{****}$	$29,62 \pm 0,23^{****}$ $27,32 \pm 0,19^{****}$
Цефепім	≥ 27	-	< 24	$30,24 \pm 0,24^{****}$	$30,12 \pm 0,22^{****}$ $29,31 \pm 0,44^{****}$
Тетрацикліни					
Доксициклін	≥ 19	17-18	< 17	$24,14 \pm 0,75^{****}$	$24,14 \pm 0,75^{****}$ $22,26 \pm 0,82^{****}$
Аміноглікозиди					
Гентаміцин	≥ 17	-	< 17	$18,27 \pm 0,08^{****}$	$19,22 \pm 0,16^{****}$ $21,09 \pm 0,04^{****}$
Амікацин	≥ 18	-	< 18	$18,86 \pm 0,33^{****}$	$18,76 \pm 0,76^{****}$ $19,44 \pm 0,31^{****}$
Інші					
Триметоприм/ сульфаметоксазол	≥ 14	11-13	< 11	$25,28 \pm 0,15^{****}$	$27,32 \pm 0,27^{****}$ $19,22 \pm 0,16^{****}$
Фосфоміцин	≥ 21	-	< 21	$17,24 \pm 0,19^{**}$	$18,35 \pm 0,48^{**}$ $16,28 \pm 0,56^{**}$

Примітка: S – чутливий; M – помірно чутливий; R – резистентний.

*Відповідно до критеріїв EUCAST. ** – резистентний; *** – помірно чутливий;

**** – чутливий.

3.2.3. Чутливість до антибіотиків *A. baumannii*. Дані щодо чутливості *A. baumannii* до антибіотиків, виділеної з сирого молока та готового твердого сичужного сиру, наведені у таблиці 3.15. та на рисунку 3.3.



Рис. 3.3. Визначення чутливості *A. baumannii* до антибактеріальних препаратів диско-дифузійним методом.

Таблиця 3.15

Визначення чутливості до антибактеріальних препаратів *A. baumannii*, виділеної з молока до бактофугації та у готовому сирі,

$M \pm m$, $n = 45$

Назва антибіотика	Нормативи, мм* (діаметр зони затримки росту)			Молоко до бактофугування, мм (діаметр зони інгібування росту)	Готовий сир, мм (діаметр зони затримки росту)
	S	M	R		
1	2	3	4	5	6
Фторхінолони					
Ципрофлоксацин	≥ 25	22-24	< 22	$26,15 \pm 0,24^{****}$	$26,23 \pm 0,21^{****}$

Продовження таблиці 3.15

1	2	3	4	5	6
Пеніциліни					
Ampicillin	≥ 14	-	-	$19,33 \pm 0,21^{****}$	$18,56 \pm 0,32^{****}$
Amoxicillin/ Clavulanate	≥ 19	-	-	$24,36 \pm 0,11^{****}$	$25,16 \pm 0,18^{****}$
Цефалоспорини					
Цефалексин	≥ 14	-	<14	$24,32 \pm 0,42^{****}$	$25,31 \pm 0,34^{****}$
Цефотаксим	≥ 20	-	<17	$15,02 \pm 0,12^{**}$	$16,21 \pm 0,34^{**}$
Цефепім	≥ 27	-	<24	$21,32 \pm 0,12^{****}$	$25,11 \pm 0,45^{****}$
Тетрацикліни					
Доксициклін	≥ 19	17-18	<17	$23,22 \pm 0,67^{****}$	$26,31 \pm 0,56^{****}$
Аміноглікозиди					
Гентаміцин	≥ 17	-	<17	$18,16 \pm 0,09^{****}$	$20,13 \pm 0,18^{****}$
Амікацин	≥ 18	-	<18	$18,71 \pm 0,36^{***}$	$20,17 \pm 0,81^{****}$
Інші					
Триметоприм/ сульфаметоксазол	≥ 14	13-11	<11	$20,64 \pm 0,12^{****}$	$25,22 \pm 0,38^{****}$
Фосфоміцин	≥ 21	-	<21	$21,78 \pm 0,64^{***}$	$24,27 \pm 0,17^{****}$

Примітка: S – чутливий; M – помірно чутливий; R – резистентний.

*Відповідно до критеріїв EUCAST. ** – резистентний; *** – помірно чутливий; **** – чутливий.

На основі отриманих даних *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.

Серед даних інших дослідників встановлено, що багатостійка до антибіотиків *A. baumannii* була виявлена як у сирому, так і у пастеризованому молоці [173].

3.3. Аналіз ризиків виробництва твердого сичужного сиру «Український»

Виробництво молочних продуктів, зокрема твердих сичужних сирів, пов'язане із потенційними мікробіологічними ризиками, які можуть виникати на різних етапах технологічного процесу. Молоко є сприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів, тому навіть за умов належної технологічної обробки повністю усунути мікробіологічні ризики неможливо.

Основними джерелами мікробіологічної контамінації у процесі виробництва сирів є:

- сире молоко як первинна сировина;
- технологічне обладнання;
- виробниче середовище;
- персонал підприємства;
- допоміжні інгредієнти та закваски.

У виробничих умовах можливе формування біоплівки на поверхнях обладнання, що ускладнює санітарну обробку та сприяє персистенції мікроорганізмів у виробничому середовищі.

З метою оцінки потенційних небезпечних факторів у процесі виробництва твердого сичужного сиру було проведено аналіз ризиків. Аналіз передбачав ідентифікацію біологічних небезпечних факторів на кожному етапі технологічного процесу та визначення заходів їх контролю.

Мікробіологічні небезпечні фактори можуть виникати на різних стадіях виробництва сиру, зокрема:

сире молоко – первинна контамінація мікроорганізмами з вимені, навколишнього середовища або обладнання для доїння;

термічна обробка молока – недостатня пастеризація може призвести до збереження патогенних бактерій;

формування сирного згустку – можливе вторинне інфікування через обладнання або контакт з персоналом;

пресування та формування сирної маси – ризик контамінації через форми, тканини або робочі поверхні;

дозрівання сиру – мікроорганізми можуть зберігатися або розмножуватися у процесі дозрівання.

Крім патогенних бактерій у сирі можуть розвиватися мікроорганізми, що викликають технологічні вади. Наприклад, *Clostridium tyrobutyricum* спричиняє так званий «пізній газоутворювальний дефект» (late blowing), який призводить до утворення тріщин та порушення структури сиру.

Фактори, що впливають на рівень ризику:

- санітарно-гігієнічний стан виробництва;
- якість сирого молока;
- ефективність пастеризації;
- використання закваскових культур;
- температурні режими дозрівання;
- рівень мікробного обсіменіння обладнання.

Дослідження показують, що порушення гігієни та недостатня санітарна обробка обладнання значно підвищують імовірність контамінації сирів патогенними мікроорганізмами.

У зв'язку з цим регулярний контроль сировини, проміжних продуктів та готових продуктів дозволяє своєчасно виявляти ризики та запобігати потраплянню небезпечних мікроорганізмів у харчовий ланцюг.

У табл. 3.16 представлено матрицю оцінки мікробіологічних ризиків, яка використовується для систематичного аналізу потенційних загроз безпечності продукту на різних етапах технологічного процесу.

- Вертикальна вісь показує ймовірність виникнення ризику: низька, середня або висока.
- Горизонтальна вісь відображає ступінь впливу ризику на безпечність сиру: від незначного до дуже високого.
- Клітинки матриці визначають рівень ризику (низький, середній, високий, критичний) як комбінацію ймовірності та серйозності наслідків.

Таблиця 3.16

Матриця оцінки мікробіологічних ризиків у виробництві твердого сичужного сиру

Ймовірність виникнення ризику	Незначний вплив	Помірний вплив	Значний вплив	Дуже високий
Низька	Низький ризик	Низький ризик	Середній ризик	Середній ризик
Середня	Низький ризик	Середній ризик	Середній ризик	Високий ризик
Висока	Середній ризик	Середній ризик	Високий ризик	Критичний ризик

Проведена оцінка ризиків показала, що найбільшу небезпеку становить початковий етап технологічного процесу – сире молоко, яке є основним джерелом мікробної контамінації. Саме на цьому етапі можуть бути присутні умовно-патогенні та патогенні мікроорганізми, які за певних умов здатні зберігатися впродовж подальших технологічних стадій. Отримані результати свідчать про необхідність суворого контролю молока-сировини та дотримання санітарно-гігієнічних вимог під час виробництва сиру.

Табл. 3.17. відображає оцінку мікробіологічних ризиків на різних етапах технологічного процесу виробництва твердого сичужного сиру.

Наведені дані дозволяють визначити найбільш критичні етапи процесу та патогени, що становлять найбільшу загрозу, і є основою для впровадження превентивних заходів під час виробництва продукту.

Вплив оцінювався наступним чином: бактерії, що не мають патогенного значення для людини та будь-яким чином не впливають на харчові продукти, оцінюються як ті, що мають незначний вплив; бактерії, що мають або клінічне значення (умовно-патогенні), або вплив на харчовий продукт, як ті що викликають їх псування – відносили до помірному впливу; бактерії, що мають і клінічне значення для людини (умовно-патогенні), а також можуть створювати вплив на харчовий продукт, як ті що викликають їх псування – відносили до значного впливу; бактерії, що відносяться до патогенних для людей та тварин – відносили до критичного впливу.

Відповідно даним табл. 3.10 (розділ «Результати досліджень»), бактерії, що були виявлені у 66–100% зразків були оцінені як висока ймовірність; бактерії, що були виявлені у 33–65% зразків – оцінювались як середня ймовірність; бактерії, що були виявлені у 17%–32% зразків були оцінені як низька ймовірність.

Таблиця 3.17

Оцінка мікробіологічних ризиків на різних етапах виробництва сиру

Етап технологічного процесу	Потенційний мікроорганізм	Ймовірність	Наслідки	Рівень ризику
1	2	3	4	5
Сире молоко	<i>Escherichia coli</i>	Висока	Значний	Високий
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Висока	Значний	Високий

Продовження таблиці 3.17

1	2	3	4	5
Сире молоко	<i>Enterococcus faecalis</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Низька	Значний	Середній
	<i>Enterobacter bugandensis</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Streptococcus uberis</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Kurthia gibsonii</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Lactococcus garvieae</i>	Висока	Помірний	Середній
Молоко після бактофугування	<i>Escherichia coli</i>	Висока	Значний	Високий
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Kurthia gibsonii</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Enterococcus faecium</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Chryseobacterium bovis</i>	Низька	Помірний	Низький
Нормалізована суміш	<i>Escherichia coli</i>	Висока	Значний	Високий
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Низька	Помірний	Низький
	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	Середня	Помірний	Середній
Після пастеризації	<i>Bacillus cereus</i>	Низька	Значний	Середній
	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Висока	Помірний	Середній

Продовження таблиці 3.17

1	2	3	4	5
Після пастеризації	<i>Enterococcus faecalis</i>	Низька	Помірний	Низький
	<i>Escherichia coli</i>	Низька	Значний	Середній
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Низька	Помірний	Низький
Сир після пресування	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Висока	Значний	Високий
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Escherichia coli</i>	Висока	Значний	Високий
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	Низька	Помірний	Низький
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Низька	Помірний	Низький
Сир після дозрівання	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Висока	Значний	Високий
	<i>Escherichia coli</i>	Висока	Значний	Високий
	<i>Bacillus cereus</i>	Середня	Значний	Середній
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Низька	Помірний	Низький
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Середня	Помірний	Середній
	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	Низька	Помірний	Низький
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Низька	Помірний	Низький
	<i>Pseudomonas putida</i>	Низька	Помірний	Низький

Отримані дані, наведені в табл. 3.17 свідчать про те, що по ходу технологічного процесу виділено 8 ризиків високого ступеню та не виявленого жодного критично високого ризику, 20 ризиків – середнього ступеню, та 10 – низького.

Аналіз мікробіологічних ризиків показав, що найвищий рівень мікробіологічних небезпечних факторів виявлено на початковому етапі

технологічного процесу – у сирому молоці, яке є основним джерелом мікробної контамінації. У процесі виробництва частина мікроорганізмів елімінується внаслідок технологічних операцій, зокрема пастеризації, однак деякі бактерії можуть зберігатися або потрапляти до продукту внаслідок вторинної контамінації. Отримані результати свідчать про необхідність постійного мікробіологічного контролю на всіх етапах виробництва твердих сичужних сирів.

Також був проведений аналіз потенційних джерел ризиків та рекомендованих заходів контролю, на різних етапах технологічного виробництва – табл. 3.18.

Таблиця 3.18

**Оцінка ризиків під час технологічного процесу виробництва
твердого сичужного сиру та заходи контролю**

Етап технологічного процесу	Потенційні небезпечні фактори	Джерело ризику	Заходи контролю
1	2	3	4
Сире молоко	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Enterobacter bugandensis</i> ; <i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>Streptococcus uberis</i> ; <i>Kurthia gibsonii</i> ; <i>Lactococcus garvieae</i> ;	Первинна мікробна контамінація сировини	Контроль якості молока, ветеринарний контроль, гігієна доїння

Продовження таблиці 3.18

1	2	3	4
Бактофугування	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Enterococcus faecium</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Chryseobacterium bovis</i> ; <i>Kurthia gibsonii</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i>	Неповне видалення мікроорганізмів	Контроль ефективності бактофугування
Нормалізована суміш	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Macroccoccus caseolyticus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	Первинна контамінація з сировини; вторинна контамінація під час технологічних операцій	Контроль якості молока, ветеринарний контроль, гігієна доїння. Належна санітарна обробка обладнання
Пастеризація	<i>Bacillus cereus</i> ; <i>Streptococcus gallolyticus</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i>	Виживання термостійких бактерій або порушення режиму пастеризації	Контроль температури та часу пастеризації

Продовження таблиці 3.18

1	2	3	4
Сир після пресування	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>Macroccoccus caseolyticus</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i>	Вторинна контамінація з обладнання або розсолу	Дезінфекція обладнання, гігієна персоналу, мікробіологічний контроль розсолу
Сир після 30-денного дозрівання	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Macroccoccus caseolyticus</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Pseudomonas putida</i>	Розвиток умовно патогенних та спороутворюючих бактерій	Контроль температури та вологості під час дозрівання

Дослідження мікробіологічного складу розсолу для засолювання твердого сичужного сиру показало наявність різноманітної мікрофлори, серед якої переважали представники родини Enterobacteriaceae та ентерококи. Наявність *E. coli*, *Enterobacter cloacae* та *K. pneumoniae* свідчить про можливу контамінацію розсолу мікроорганізмами кишкового походження. Виявлення цих бактерій після пастеризації розсолу може бути пов'язане як із недостатньою ефективністю термічної обробки, так і з вторинною контамінацією під час подальших технологічних операцій. Отримані результати підтверджують необхідність регулярного мікробіологічного контролю розсолу та дотримання санітарно-гігієнічних вимог під час виробництва сиру.

У табл. 3.19 показано оцінку мікробіологічного ризику розсолу.

Ймовірність визначалась наступним чином:

- висока → >50 % зразків позитивні;
- середня → 10–50 % зразків позитивні;
- низька → <10 % зразків позитивні.

Складність наслідків:

- висока → патогенні бактерії, що можуть викликати захворювання під час споживання продукту;
- помірна → умовно-патогенні бактерії, що можуть викликати захворювання за несприятливих умов;
- низька → технологічна мікрофлора, незначний ризик для здоров'я.

Таблиця 3.19

Оцінка мікробіологічного ризику розсолу

Мікро- організми	Кіль- кість у розсолі до пасте- ризації	Кіль- кість після пасте- ризації	Ймо- вір- ність	Склад ність	Рівень ризик	Пояснення
1	2	3	4	5	6	7
<i>Escherichia coli</i>	2×10^5 КУО/см ³	2×10^5 КУО/см ³	Висока	Висока	Високий	Присутній у всіх зразках, патогенний, небезпечний у разі споживання сирів без додаткової обробки

Продовження таблиці 3.19

1	2	3	4	5	6	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1×10^3 КУО/см ³	1×10^3 КУО/см ³	Середня	Висока	Середній — Високий	Утворює умовно-патогенну мікрофлору, присутній після пастеризації, ризик вторинної контамінації
<i>Enterobacter cloacae</i>	1×10^3 КУО/см ³	2×10^3 КУО/см ³	Середня	Помірна	Середній	Умовно-патогенний, присутній у 10–50 % зразках, можливий розвиток у разі порушення санітарії
<i>Enterococcus faecalis</i>	1×10^1 КУО/см ³	1×10^1 КУО/см ³	Низька— Середня	Помірна	Середній	Умовно-патогенний, невелика кількість, можливі проблеми за тривалого контакту з продуктом

Продовження таблиці 3.19

1	2	3	4	5	6	7
<i>Enterococcus faecium</i>	1×10^1 КУО/см ³	—	Низька	Помір- на	Низький– Середній	Умовно- патогенний, присутній у невеликій кількості
<i>Lactococcus garvieae</i>	1×10^1 КУО/см ³	—	Низька	Низька	Низький	Технологічна мікрофлора, мінімальний ризик для здоров'я
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	—	1×10^1 КУО/см ³	Низька	Помір- на	Низький– Середній	Виявляється тільки після пастеризації, низька концентрація, умовно- патогенний

Отже, з аналізу табл. 3.19, можна зробити підсумок щодо ризику, який можуть спричинити виділені мікроорганізми.

Високий → *E. coli*: присутній у високій концентрації до і після пастеризації. Патогенний, може викликати харчові токсикоінфекції.

Середній–високий → *K. pneumoniae*: умовно-патогенний, присутній після пастеризації, може колонізувати сир і розсіл.

Середній → *E. cloacae*, *E. faecalis*: умовно-патогенні, присутні в достатній кількості, потенційно небезпечні за порушення гігієни.

Низький–середній → *E. faecium*, *E. xiangfangensis*: малі концентрації, незначний або умовний ризик.

Низький → *L. garvieae*: технологічна мікрофлора, не загрожує здоров'ю.

Аналіз результатів дослідження показав, що формування мікробіоти сиру відбувається на різних етапах технологічного процесу. Основним джерелом первинної контамінації є сире молоко, тоді як на подальших стадіях технологічного процесу можливе повторне інфікування продукту через технологічне обладнання, виробниче середовище або допоміжні матеріали.

У процесі технологічної обробки, зокрема після бактофугування та пастеризації, виявлено зменшення різноманіття мікроорганізмів, однак окремі бактерії продовжували траплятися на наступних стадіях виробництва. Це свідчить як про можливість часткового збереження мікроорганізмів після технологічної обробки, так і про потенційну вторинну контамінацію продукту на етапах формування сирної маси, пресування або дозрівання.

Особливу увагу привертає наявність *E. coli* на всіх етапах технологічного процесу. Частота її виявлення становила 100 % у сирому молоці та зразках після бактофугування, 66 % у нормалізованій суміші, 17 % – після пастеризації та після пресування, а також 83 % – у сирі після 30-денного дозрівання. Така динаміка може свідчити про можливість повторної контамінації продукту під час подальших технологічних операцій або про недостатню ефективність окремих санітарно-гігієнічних заходів.

Крім того, у сирі після пресування та після 30-денного дозрівання були виявлені умовно-патогенні мікроорганізми, зокрема *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. faecalis* та представники роду *Bacillus*. Наявність цих бактерій може бути пов'язана з контамінацією технологічного обладнання, виробничого середовища або формуванням біоплівки на поверхнях технологічних установок.

Додатковим джерелом мікробіологічних ризиків під час виробництва сиру може бути розсіл для засолювання. У ході досліджень у зразках розсолу були виявлені *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*

та інші мікроорганізми. Особливо важливим є той факт, що деякі з цих бактерій були ідентифіковані навіть після пастеризації розсолу, що може свідчити про повторну контамінацію або наявність мікробних біоплівки на технологічному обладнанні.

Проведена оцінка ризиків на основі матриці ймовірності та складності наслідків показала, 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.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про те, 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.

Отримані результати підкреслюють 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 безпечністю харчових продуктів на основі процедур, заснованих на принципах НАССР, дозволить знизити ризик контамінації сиру небажаною мікрофлорою та забезпечить безпечність готового продукту.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1. Аналіз загального мікробіологічного скринінгу твердого сичужного сиру «Український»

Мікробіологічний скринінг твердого сичужного сиру «Український» із використанням технології MALDI-TOF MS, проведений від збірного сирого молока до готового молочного продукту, показав наявність мікроорганізмів на всіх етапах виробництва. Усього було ізольовано та ідентифіковано 43 види різних мікроорганізмів, що відображає високу мікробну різноманітність молока-сировини та готового продукту.

На першому етапі – у сирому молоці – було зафіксовано 18 видів мікроорганізмів. Серед них домінували представники родини *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*), а також грампозитивні бактерії *Lactococcus* та *Staphylococcus aureus*, що можуть впливати як на якість, так і на безпечність продукту.

Інші 25 видів були ідентифіковані на наступних технологічних етапах виробництва: після бактофугування, нормалізації, пастеризації, пресування та 30-денного дозрівання сиру. Варто зазначити, що деякі бактерії, ізольовані у сирому молоці, залишалися в готовому продукті. Зокрема *E. coli* та *A. baumannii* були виявлені на всіх ключових етапах, що свідчить про можливу внутрішню контамінацію та необхідність ретельного контролю санітарного стану виробництва.

Загалом, динаміка мікрофлори на різних етапах показала такі тенденції:

- після бактофугування кількість бактерій зменшилася на один порядок, але деякі види, зокрема *E. coli*, виявлена у 100% зразків;
- на етапі нормалізації суміші позитивні зразки *E. coli* знизилися до 66%, а після пастеризації – до 17%;

- після пресування та дозрівання сиру частка позитивних зразків підвищилася, що вказує на можливе відновлення бактерій під час дозрівання та вплив умов зберігання.

Домінуючі родини бактерій у готовому продукті включали:

- Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*),
- Bacillaceae (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*),
- Lactococcaceae та Staphylococcaceae.

Такі дані свідчать, що технологічні процеси не повністю усувають певні бактерії, а деякі види здатні виживати, утворювати біоплівки на обладнанні та потенційно впливати на безпеку продукту. З огляду на це, виробничі умови повинні передбачати регулярний мікробіологічний контроль на всіх етапах, а особлива увага має бути приділена мікроорганізмам роду Enterobacteriaceae, що є ключовими індикаторами санітарного стану та потенційними патогенами.

Загальна мікробіологічна картина свідчить про складну динаміку мікрофлори впродовж технології виробництва сиру «Український». Ці дані підкреслюють необхідність поєднання санітарних заходів, контролю процесів пастеризації та бактофугування, а також регулярного моніторингу *E. coli*, яка є не лише показником фекальної контамінації, але й потенційним ризиком для здоров'я споживачів.

4.2. *E. coli* як індикатор санітарного стану та фактор безпечності

E. coli є індикаторним мікроорганізмом санітарного стану виробництва харчових продуктів та широко використовується для оцінки фекальної контамінації. Патогенні штами, зокрема *E. coli* O157:H7, здатні спричиняти спалахи харчових токсикоінфекцій, пов'язаних зі споживанням молочних продуктів.

Необхідно зазначити, що велика рогата худоба є основним природним резервуаром ешерихії, зокрема серотипів, що продукують шига-токсин (*E. coli*

O157:H7), які можуть безсимптомно колонізувати шлунково-кишковий тракт і виділятися з фекаліями. *E. coli O157:H7* також виявляють у кіз та овець, причому спектр серогруп у цих видів може відрізнятися. Під час обсіменіння молока бактерії можуть зберігатися в молочних продуктах [204].

E. coli у сирому коров'ячому молоці може бути пов'язана із незадовільними санітарно-гігієнічними умовами виробництва молока та з потраплянням домішок із молока корів із субклінічним маститом у сировину для виробництва молочних продуктів. Так, 59% ізолятів *E. coli* були виділені з виділень молочної залози корів, уражених маститом. Повідомляється про резистентність до бета-лактамних антибіотиків на рівні 84%, 72,7%, 52,27%, 50% та 45,4% для цефотаксиму, цефепіму, цефуроксиму, оксациліну та цефалексину відповідно [170].

У нашому дослідженні *E. coli* виділяється на всіх етапах технологічного процесу виробництва сиру та була виявлена у 100% зразках у молока-сировини, що наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Частка позитивних зразків з *E.coli* та її кількісний вміст

Етап виробництва	% зразків із <i>E. coli</i>	КУО/см ³
Сире молоко	100	$2,5 \pm 0,2 \times 10^4$
Після бактофугування	100	$1,6 \pm 0,1 \times 10^3$
Нормалізована суміш	66	—
Пастеризація	17	—
Сир після пресування	83	—
Готовий сир після 30 днів	83	$5,6 \pm 0,01 \times 10^2$ (сир), $2 \pm 0,02 \times 10^5$ (розсіл)

Після бактофугування цей мікроорганізм також був виділений із 100% зразків, що може свідчити про значний вміст *E. coli* та можливу внутрішню контамінацію сировини. Кількісне значення змінилося лише на один порядок: у

сировині кількість *E. coli* становила $2,5 \pm 0,2 \times 10^4$, після бактофугування – $1,6 \pm 0,1 \times 10^3$.

На наступних етапах частка виявлення *E. coli* знизилася до 66% на етапі нормалізації та 17% – на етапі пастеризації, проте суттєво підвищилася на кінцевому етапі, тобто у готовому продукті – сирі після 30-денного дозрівання – до 83%.

Однак контамінація була зафіксована через розсіл, де *E. coli* була виявлена в кількості $2 \pm 0,02 \times 10^5$.

Присутність *E. coli* у сирому молоці може свідчити про:

- недостатні санітарно-гігієнічні умови виробництва молока;
- потрапляння бактерій з молока корів із субклінічним маститом;
- потенційну внутрішню контамінацію молока-сировини.

E. coli – це домінуючий мікроорганізм протягом всього експерименту, є припущення, що бактерія розмножується за сприятливих умов, що пояснює її концентрацію у сирі після дозрівання в кількості $5,6 \pm 0,01 \times 10^2$. Це свідчить про здатність бактерії розмножуватися за сприятливих умов та високий ризик внутрішньої контамінації молока-сировини.

Серед мікрофлори, ізольованої із сирого молока та дослідженої на чутливість до антибактеріальних препаратів, *E. coli* виявилася стійкою до фторхінолонів, пеніцилінів, цефалоспоринових, тетрациклінів, аміноглікозидів, триметоприму та фосфоміцину, що свідчить про формування її стійкості до значної кількості антибактеріальних засобів на молочних фермах, які постачають сировину на переробне підприємство.

У нормалізованій суміші *E. coli* була стійкою до гентаміцину та амікацину й помірно резистентною до доксицикліну. Ймовірно бактерії, що залишилися в молоці після бактофугування, були чутливими до більшості антибактеріальних препаратів. Після пастеризації *E. coli* проявляла чутливість до ципрофлоксацину та стійкість до всіх інших досліджених препаратів. На цьому етапі повторна поява стійких бактерій до антибіотиків може свідчити про формування

біоплівки на обладнанні, що використовується для пастеризації молочної суміші.

У кінцевому продукті – твердому сичужному сири «Український» – стійкість *E. coli* зберігалася до гентаміцину, амікацину та виявлена помірна стійкість до доксицикліну. Процеси, що відбуваються в сири впродовж 30-добового дозрівання, відновлюють чутливість *E. coli* до більшості антибактеріальних препаратів.

На цьому підприємстві молоко, яке використовується для виробництва твердого сичужного сиру «Український», піддається пастеризації за температури $74,0 \pm 2$ °C впродовж 20 секунд. Виробник враховує кілька публікацій щодо формування специфічних смакових властивостей сиру, особливо тих, що виготовлені з непастеризованого молока [169], і тому застосовує зазначений режим пастеризації. Проте слід також враховувати можливість утворення біоплівки на обладнанні, якщо температури постійно недостатні.

Науковці відзначають, що пастеризація часто не гарантує належної якості молока, особливо якщо сировина містить декілька патогенних бактерій, включно з бактеріями фекального походження. Крім того, вони виявили бактеріальні ізоляти, резистентні до амоксициліну, цефокситину та/або еритроміцину [169].

Деякі вчені також описують випадки виявлення *E. coli* після пастеризації молока, пояснюючи це наявністю термостійких бактерій, які здатні витримувати температуру 60 °C протягом 6 хвилин і формувати біоплівку у 97% випадків [171].

У літературі ми не виявили однозначного пояснення змін чутливості до антибіотиків на різних стадіях виробництва молочних продуктів, оскільки дані з цього питання суперечливі. Наприклад, дослідження термостійких *E. coli*, які формують біоплівки на обладнанні для пастеризації, показали, що вони чутливі до декількох антибактеріальних препаратів [169]. Інші дослідження, навпаки,

підтверджують наявність стійких терmostійких штамів *E. coli* [172]. Повідомлялося про виділення мультирезистентних *E. coli* після пастеризації молока [173].

У Китаї 2,0% ізольованих штамів *E. coli* були отримані з пастеризованого молока, демонструючи резистентність до амікацину (100%), стрептоміцину (50%) та тетрацикліну (50%) [174]. Вчені з Ірану повідомили про виділення патогенних штамів *E. coli* з 5,55% пастеризованого молока та інших молочних продуктів, причому 73,68% випадків мали резистентність хоча б до одного антибіотика. Найвища резистентність була зафіксована до стрептоміцину та тетрацикліну (по 50%), однак усі штами були чутливі до амікацину [175].

Отримані нами дані потребують подальших досліджень для виявлення терmostійких і мультирезистентних штамів *E. coli* та проведення досліджень стійкості конкретних штамів до антибіотиків за різних температурних режимів.

Зміни чутливості *E. coli* до антибактеріальних препаратів у нашому експерименті також виявлені у готовому твердому сичужному сирі. Після 30-денного дозрівання бактерія відновлювала чутливість до більшості протестованих антибактеріальних засобів, за винятком гентаміцину та амікацину, а до доксицикліну була помірно чутлива.

Наявність *E. coli* у готовому сирі є особливо небезпечною, оскільки бактерія може продукувати Shiga-токсин (STEC), що викликає кишкові захворювання у людей [176]. Бактерії родини Enterobacteriaceae є основними мікроорганізмами, що спричиняють псування харчових продуктів [177].

Вчені ізолювали *E. coli* із сирів, виготовлених як з пастеризованого, так і з непастеризованого молока. Дослідження мікрофлори сирів з непастеризованого молока (20 видів сирів з коров'ячого, козиного та овечого молока) показали наявність Enterococcus, Staphylococcus, Enterobacteriaceae, причому деякі ізоляти були стійкими до тетрацикліну, еритроміцину та хлорамфеніколу: 20% ізолятів були стійкі до одного антибіотика, 8% – до двох, 12% – до всіх протестованих антибіотиків [178].

Також *E. coli* ізолювали із сирів з сирого молока, де деякі штами здатні утворювати біоплівки. Ці штами виявили стійкість до тетрацикліну (25,6%), ампіциліну (17,9%), цефоксину (7,7%), налідиксової кислоти (5,1%) та амоксициліну (2,6%) [179].

Інші дослідження сирів із сирого молока показали наявність термотолерантних штамів *E. coli* (93,3%), 11 штамів (7,8%) були стійкі до цефалоспоринів третього покоління [180]. У північному Китаї *E. coli* ізолювали у 34,4% випадків, включно зі штамми, що продукують Shiga-токсин та інші токсини. Ці штами показали різний рівень стійкості до ампіциліну (46,3%), амоксициліну з клавулановою кислотою (16,4%), триметоприму-сульфаметоксазолу (13,4%), тетрацикліну (13,4%), цефокситину (11,9%), хлорамфеніколу (7,5%), канаміцину (7,5%), стрептоміцину (6,0%), тобраміцину (4,5%), азитроміцину (4,5%) та ципрофлоксацину (1,5%). Всі ізоляти були чутливі до гентаміцину [181].

У Бразилії у сирах із пастеризованого молока виявлено 43% термостійких коліформних *E. coli* та 4% патогенних штамів STEC, що продукують Shiga-токсин; два штами STEC були стійкі до стрептоміцину [182]. Інші дослідники ізолювали уропатогенні штами *E. coli* (UPEC) із 43% сирів із пастеризованого молока, які утворювали біоплівки [183].

Вплив технологічних процесів на чутливість до антибіотиків найбільше проявлявся у *E. coli*. Бактофугація – це процес, що використовує відцентрову силу для відділення та видалення мікроорганізмів. Після бактофугації в молоці міститься на 90% менше бактерій, ніж до неї [191]. Проте в ході експерименту ми також виявили вплив на чутливість до антибіотиків, що можна пояснити впливом фізичних факторів на бактерії. Стійкість *E. coli* до пеніцилінів та цефалоспоринів може свідчити про наявність ферментів бета-лактамазної резистентності [192]. Оскільки фактори, такі як температура, можуть впливати на фермент бета-лактамазу, що виробляють грамнегативні бактерії, включаючи

E. coli, можна припустити, що бактофугація також може впливати на цей фермент і, відповідно, на чутливість до антибіотиків [193].

4.3. *Klebsiella pneumoniae* як клінічно значущий мікроорганізм у молочних продуктах

K. pneumoniae є грамнегативною бактерією родини *Enterobacteriaceae*, що виступає як умовно патогенний та клінічно значущий мікроорганізм. Ця бактерія здатна викликати інфекції сечовивідних шляхів, пневмонії та сепсис у людей, особливо у групах ризику, та є індикатором санітарного стану харчових продуктів.

У нашому дослідженні *K. pneumoniae* була виявлена у розсолі та готовому твердому сичужному сирі «Український». Потрапляння бактерії у готовий продукт, ймовірно, пов'язане з недостатнім контролем на етапі виробництва та неналежними санітарними заходами, що дозволяє сторонній мікрофлорі контамінувати продукт. Концентрації та частка позитивних зразків *K. pneumoniae* наведена у табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Частка позитивних зразків та кількісний вміст *K. pneumoniae*

Етап виробництва	% зразків із <i>K. pneumoniae</i>	КУО/см ³
Сир після пресування	—	—
Розсіл після пастеризації	100	$1,2 \pm 0,05 \times 10^3$
Готовий сир після 30 днів	100	$2,5 \pm 0,1 \times 10^2$

Контамінація *K. pneumoniae* у молочних продуктах може відбуватися кількома шляхами:

- 1) з молока-сировини – якщо корови є носіями бактерії або мають субклінічний мастит, *K. pneumoniae*, крім того, може потрапити у молоко разом з фекаліями або виділеннями молочної залози;
- 2) через розсіл – бактерії можуть виживати у розсолі, де створюються сприятливі умови для збереження та навіть помірного розмноження;
- 3) через обладнання – утворення біоплівки на трубах, ємностях та пресах може призводити до повторної контамінації продукту навіть після пастеризації;
- 4) недотримання санітарних норм – недостатнє очищення обладнання, рук персоналу або приміщень може сприяти потраплянню сторонньої мікрофлори.

Необхідно зазначити, що обидві бактерії (*K. pneumoniae* і *E. coli*) є грамнегативними Enterobacteriaceae та можуть виживати у молочних продуктах після стандартної термічної обробки.

- *E. coli* у дослідженні проявляла здатність до розмноження у сирі після 30-добового дозрівання, а *K. pneumoniae* переважно зберігалася у розсолі та готовому сирі без суттєвого збільшення концентрації.

- Обидві бактерії демонструють стійкість до антибіотиків: *E. coli* – широкого спектру, включно з пеніцилінами, цефалоспорином та тетрацикліном; *K. pneumoniae* – ампіцилін та фосфоміцин, зберігаючи чутливість до ципрофлоксацину, гентаміцину та амікацину.

- Основна відмінність – *E. coli* може продукувати Shiga-токсин, тоді як *K. pneumoniae* здатна викликати системні інфекції у разі потрапляння в організм людини, особливо у групах ризику.

Порівняння присутності та резистентності *E. coli* і *K. pneumoniae* на різних етапах виробництва твердого сичужного сиру «Український» наведено у табл. 4.3.

Таблиця 4.3

Порівняння присутності та стійкості *E. coli* і *K. pneumoniae* на різних етапах виробництва твердого сичужного сиру «Український»

Етап виробництва	<i>E. coli</i> (% позитивних зразків)	<i>K. pneumoniae</i> (% позитивних зразків)	Резистентність <i>E. coli</i>	Резистентність <i>K. pneumoniae</i>
Сире молоко	100%	0%	Широка (пеніциліни, цефалоспорины, тетрациклін)	—
Після бактофугування	100%	0%	Менше, чутливі до більшості антибіотиків	—
Нормалізована суміш	66%	—	Стійкість до гентаміцину та амікацину	—
Пастеризація	17%	100% (у розсолі)	Чутливість до ципрофлоксацину, стійкість до інших	Стійка до ампіциліну та фосфоміцину
Сир після пресування	83%	100% (у розсолі)	Помірна стійкість до доксицикліну	Зберігає стійкість до ампіциліну та фосфоміцину
Готовий сир після 30 днів	83%	100%	Відновлюється чутливість до більшості антибіотиків, крім гентаміцину та амікацину	стійкість зберігається до ампіциліну та фосфоміцину

Отже, необхідно посилити контроль якості молока-сировини та розсолу, включно з мікробіологічним моніторингом *K. pneumoniae*. Також важливо проводити регулярну оцінку стійкості мікрофлори до антибіотиків, щоб запобігти передачі стійких видів мікроорганізмів через харчові продукти. Санітарні заходи на підприємстві мають бути посилені для мінімізації ризику контамінації обладнання та готового продукту.

4.4. *Acinetobacter* spp. як індикатор мікробіологічної безпечності та потенційні патогени

Інфекції, спричинені представниками роду *Acinetobacter*, належать до серйозних глобальних загроз через здатність викликати складні захворювання та високий рівень стійкості до антибіотиків. Найбільш клінічно значущим патогеном є *A. baumannii*, однак у літературі також описані інфекції, спричинені *Acinetobacter nosocomialis* та *Acinetobacter pittii*.

У нашому дослідженні *A. baumannii* був виявлений у молоці-сировині у 17% зразків. Після бактофугування та пастеризації мікроорганізм не виявлявся, але був повторно ізолюваний у сирі після пресування у 50% зразків та у готовому продукті – у 33% зразків. *A. nosocomialis* виявлявся лише у сирому молоці, а *A. pittii* – у 17% зразків нормалізованої суміші, надалі не простежувався. Частка позитивних зразків і кількість *A. baumannii* на різних етапах виробництва наведено у табл. 4.4.

Клінічна діагностика інфекцій, спричинених *A. baumannii*, ускладнюється через можливість помилкової ідентифікації з іншими видами роду, зокрема *A. nosocomialis*. Літературні дані показують, що рівень летальності за інфекцій, викликаних *A. baumannii* та *A. nosocomialis*, становив 33% та 36% відповідно, а частка позалікарняних інфекцій – 35% для *A. baumannii* та 29% – для *A. nosocomialis* [105].

Таблиця 4.4

Частка позитивних зразків і кількість *A. baumannii* на різних етапах виробництва

Етап виробництва	% зразків із <i>A. baumannii</i>	КУО/см ³
Сире молоко	17	$1,2 \pm 0,1 \times 10^3$
Після бактофугування	0	—
Нормалізована суміш	0	—
Пастеризація	0	—
Сир після пресування	50	$2,8 \pm 0,2 \times 10^2$
Готовий сир після 30 днів	33	$1,5 \pm 0,1 \times 10^2$

Acinetobacter pittii належить до родини *Moraxellaceae*. *Acinetobacter pittii* у поєднанні з іншими видами роду *Acinetobacter* може спричиняти різні інфекційні захворювання у людей, такі як пневмонія, бактеріємія, інфекції ран, менінгіт та інфекції сечовивідних шляхів. *Acinetobacter pittii* був виділений один раз у 17% зразків у молоці пастеризованому, що становить ризик потрапляння у кінцевий продукт даного мікроорганізму. Бактерії роду *Acinetobacter* мають природну стійкість до антибіотиків і легко набувають додаткову резистентність, а клінічні ізоляти цих бактерій можуть швидко поширюватися серед пацієнтів і виживати в умовах лікарняного середовища.

Точна ідентифікація виду є критично важливою для належного лікування. Стандартні мікробіологічні методи часто не дозволяють диференціювати види роду *Acinetobacter*. У США та Таїланді помилкова ідентифікація видів, відмінних від *A. baumannii* становила 14% [107]. Метод MALDI-TOF MS показав високу точність у визначенні видів мікроорганізмів роду *Acinetobacter* у клінічних та виробничих дослідженнях [108].

У нашому експерименті ізоляти *A. baumannii* з сирого молока та кінцевого продукту демонстрували стійкість до цефотаксиму. Після дозрівання сиру була

відновлена помірна чутливість до амікацину та фосфоміцину. Виявлена резистентність у розсолі після пастеризації може свідчити про формування біоплівки на обладнанні та недостатній контроль санітарії.

З огляду на результати дослідження, виробнику рекомендується:

- регулярний контроль якості миття та дезінфекції виробничих приміщень і обладнання;
- моніторинг утворення біоплівки на технологічному обладнанні;
- підвищення температури пастеризації молока;
- контроль наявності *E. coli*, *K. pneumoniae* та *A. baumannii* на завершальному етапі виробництва сиру;
- забезпечення ідентифікації мікроорганізмів роду *Acinetobacter* за допомогою MALDI-TOF MS або молекулярних методів для уникнення помилок у моніторингу.

4.5. *Staphylococcus* spp. та споріднені мікроорганізми як потенційні патогени та індикатори безпечності

Staphylococcus spp. – грампозитивні, нерухомі бактерії, що зазвичай існують як комменсали, колонізуючи слизові оболонки теплокровних тварин та людини. Нині описано понад 70 видів і підвидів цього роду [109]. Деякі види, особливо *S. aureus*, є збудниками важких інфекцій, включно з бактеріємією, раневими інфекціями, гнійними ураженнями та маститом у тварин.

Staphylococcus aureus продукує ентеротоксини, що є основною причиною стафілококових харчових отруєнь. Коагулазонегативні стафілококи (CoNS) також потенційно ентеротоксигенні, проте їхній патогенний потенціал та роль у харчових отруєннях вивчені недостатньо [110].

Золотистий стафілокок (*S. aureus*) досі входить до п'ятірки основних патогенів, що сприяють розвитку харчових захворювань внутрішнього походження, і є причиною найбільшої кількості госпіталізацій щороку [110].

До цього часу добре охарактеризовані лише ентеротоксини, що продукує *S. aureus*, тоді як ентеротоксигенний потенціал коагулазонегативних стафілококів залишається недостатньо вивченим. Роль коагулазонегативних стафілококів як патогенів та їхній внесок у розвиток стафілококових харчових отруєнь ще не досліджені належним чином, хоча відомо, що ентеротоксигенні штами коагулазонегативних стафілококів можуть асоціюватися з інфекціями у людей і тварин, а також із харчовими отруєннями [110].

Staphylococcus chromogenes належить до найбільш значущих коагулазонегативних стафілококів, що ізолюються за маститу у молочних корів. Серед коагулазонегативних стафілококів, які найчастіше виявляють у випадках маститу, *S. chromogenes* займає провідне місце за частотою виділення [109]. *S. chromogenes* був виділений лише у молоці після бактофугування, що свідчить про його низьку концентрацію у технологічному ланцюзі. Однак його наявність у молоці після бактофугування свідчить про ризик передачі даної бактерії у наступні етапи технологічного процесу.

S. chromogenes може спричиняти субклінічний мастит у корів, а деякі штами також продемонстрували антибактеріальну активність проти таких патогенів, як метицилін-резистентний золотистий стафілокок (MRSA) [111].

Антимікробна стійкість у коагулазонегативних стафілококів (CoNS) виявляється рідше, ніж у *S. aureus*. Проте наявність горизонтального переносу ДНК між видами роду *Staphylococcus*, спільні екологічні ніші та зростання застосування антимікробних препаратів поза клінічними умовами підкреслюють необхідність контролю за поширенням резистентності серед не-*aureus* видів. На жаль, систематичні спостереження та епідеміологічні дослідження антимікробної стійкості у CoNS залишаються обмеженими та неповними [112].

Зазвичай він колонізує кишечник та сечостатеву систему вагітних жінок. Проте є дані, що цей мікроорганізм асоційований з інфекційним ендокардитом та раком товстої кишки у людей. Він має здатність адгезуватися до

позаклітинного матриксу, такого як колаген, фібрoneктин та фібрин, що є механізмом патогенезу [101].

Macrococcus caseolyticus – каталазо-позитивний, оксидазо-позитивний опортуністичний мікроорганізм роду *Macrococcus*, близький до *Staphylococcus*, раніше відомий як *Staphylococcus caseolyticus* [198,199]. Вид широко трапляється у молочних продуктах, ферментованих сирах, ковбасах, а також у свиней, телят, яловичині та свинині [200]. Може покращувати смак молочних продуктів через продукування амінокислотних та ліпідних сполук [203]. Сучасні дані свідчать про горизонтальний перенос генів метицилін-резистентності (*mecB*, *mecD*) між різними видами мікроорганізмів роду *Macrococcus*, подібно до MRSA, із потенційною участю транспозону Tn6045 [201, 202].

У ході експерименту із сировини та твердого сичужного сиру «Український» було виявлено два види стафілококів та *Macrococcus caseolyticus* – табл. 4.5.

Таблиця 4.5

Частка позитивних зразків виділених стафілококів та *Macrococcus caseolyticus* на різних етапах виробництва твердого сичужного сиру «Український», $M \pm m$, $n = 45$

Етап виробництва	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Macrococcus caseolyticus</i>
Сире молоко	—	—	17%
Після бактофугування	17%	—	—
Нормалізована суміш	—	—	50%
Сир після пресування	33%	17%	33%
Готовий сир	33%	17%	33%

- *S. chromogenes* був виявлений після бактофугування, що свідчить про його низьку концентрацію у технологічному ланцюзі та потенційну передачу на наступні етапи.

- *S. aureus* ізолювано лише після пресування та у готовому продукті (17% зразків), що підкреслює необхідність контролю на останніх етапах виробництва.

- *Macroccoccus caseolyticus* був виявлений на кількох етапах технологічного процесу (17–50%), проте не фіксувався після бактофугування та пастеризації, що свідчить про можливу внутрішню контамінацію у процесі виробництва.

Стійкість до антибіотиків та контроль.

- Деякі штами *S. chromogenes* можуть проявляти антимікробну активність проти MRSA [111].

- *M. caseolyticus* може переносити гени метицилін-резистентності (*mecB*, *mecD*) між родами *Macroccoccus* та *Staphylococcus* [201,202].

- Рекомендації: регулярний контроль наявності стафілококів та *Macroccoccus*, моніторинг стійкості, ретельне очищення та дезінфекція обладнання, контроль температури пастеризації та бактофугування.

Висновки.

- *S. aureus*, CoNS та *M. caseolyticus* є потенційними патогенами у молочних продуктах.

- Технологічні процеси ефективно знижують їх концентрацію, але ризик внутрішньої контамінації зберігається.

- Особливу увагу слід приділяти моніторингу на фінальних етапах виробництва сиру, щоб запобігти потраплянню патогенів у готовий продукт.

4.6. *Citrobacter* spp. як умовно-патогенні мікроорганізми у молочних продуктах

У ході дослідження на початкових етапах технологічного процесу сиру «Український» були виявлені представники роду *Citrobacter*, що наведено у табл. 4.6.

Таблиця 4.6

Частка позитивних зразків *Citrobacter* spp. на різних етапах виробництва сиру «Український», $M \pm m$, n= 45

Етап виробництва	<i>C. freundii</i>	<i>C. braakii</i>	<i>C. koseri</i>
Сире молоко	17%	17%	—
Після бактофугування	17%	—	—
Нормалізована суміш	50%	66%	17%
Пастеризація	—	—	—
Готовий сир після 30 днів	—	—	—

C. freundii підвищував свою частку від 17% на ранніх етапах до 50% – у нормалізованій суміші, що свідчить про потенційну міграцію та підвищення концентрації цього мікроорганізму у процесі технологічного об'єднання сировини.

C. braakii та *C. koseri* були виявлені на початкових етапах і нормалізованій суміші, проте не фіксувалися у кінцевому продукті, що, ймовірно, пов'язано з чутливістю бактерій до пастеризації та технологічних температурних режимів.

Citrobacter spp. – грамнегативні паличкоподібні бактерії родини Enterobacteriaceae, умовно-патогенні для людини. Вони можуть спричиняти інфекції у новонароджених, дітей та пацієнтів з ослабленим імунітетом, включно з сепсисом, інфекціями дихальних шляхів та сечовивідних шляхів [119]. Поширені в ґрунті, воді, харчових продуктах, а також у шлунково-кишковому тракті людей і тварин і відомі як збудники сепсису, інфекцій дихальних шляхів та сечовивідних шляхів [119]. Мікробіологічне та медичне значення цих бактерій визначається не лише їхньою патогенністю, а й появою штамів з множинною стійкістю до антибіотиків, що використовуються в лікуванні [122].

C. koseri, *C. freundii* та *C. amalonaticus* вважаються потенційно патогенними для людини, при цьому *C. koseri* асоціюється з важкими неонатальними інфекціями, менінгітом та абсцесами головного мозку [127]. *Citrobacter koseri* (раніше відомий як *Citrobacter diversus*) є грамнегативною

паличкоподібною бактерією родини Enterobacteriaceae, яка входить до складу нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту здорових людей і тварин [125].

S. koseri може спричиняти складні форми септицемії та менінгіту, переважно у новонароджених дітей і пацієнтів з імунodefіцитними станами [127, 131]. У значної частки хворих (до 77%) реєстрували формування абсцесів головного мозку [127]. Перебіг інфекції може супроводжуватися високою летальністю (близько 30%) та розвитком важких неврологічних ускладнень (приблизно у 50% випадків) [127, 128, 129]. У неонатальних відділеннях лікарень часто виявляється горизонтальна передача збудника через руки медичного персоналу, а також описані випадки вертикальної трансмісії від матері до дитини під час внутрішньоутробного розвитку або в процесі пологів [127, 130]. Вертикальне інфікування зазвичай асоціюється з передчасними пологами (гестаційний вік <37 тижнів), розвитком сепсису та менінгіту, тоді як випадки мимовільного переривання вагітності не описані [131].

Citrobacter freundii найчастіше ізолюють у собак і котів з інфекціями сечовивідних шляхів, однак цей вид також може бути збудником катетер-асоційованих інфекцій, бактеріємії та ендокардиту [124].

Представники роду природно резистентні до ампіциліну та цефалоспоринів першого покоління і можуть набувати гени стійкості, включно з ESBL та фторхінолонами [124].

Висновки та рекомендації.

Виявлення *Citrobacter spp.* на початкових етапах виробництва свідчить про необхідність контролю якості молока-сировини та технологічного середовища.

Пастеризація та технологічні процеси знижують концентрацію *Citrobacter spp.* до невиявленого рівня у готовому продукті, що підтверджує ефективність термічної обробки.

Однак потенційний ризик передачі умовнопатогенних бактерій на ранніх етапах підкреслює важливість дотримання санітарних норм, контролю бактеріологічної чистоти обладнання та моніторингу мікробіологічного стану сировини.

4.7. Інші умовно-патогенні та технологічно значущі мікроорганізми

У процесі виробництва сиру «Український» було виявлено низку умовно-патогенних та технологічно значущих бактерій, які не належать до основних патогенів (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.).

Chryseobacterium bovis було виділено у 17% зразків після бактофугування. Це грамнегативні, паличкоподібні, оксидазопозитивні аеробні бактерії, що трапляються у воді, ґрунті та клінічному середовищі [113]. Вони належать до психротолерантної та протеолітичної мікрофлори молока та молочних продуктів, де можуть спричиняти дефекти смаку та псування продуктів [114].

Lelliottia amnigena виділена у 33% зразків нормалізованої суміші. Цей вид мікроорганізмів родини Enterobacteriaceae зазвичай ізолюють із води та харчових продуктів, зокрема молока та м'яса. *L. amnigena* може утворювати біоплівки та виступає потенційним колонізатором або опортуністичним патогеном, особливо у імунокомпрометованих людей.

L. amnigena належить до типу Pseudomonadota, класу Gammaproteobacteria, родини Enterobacteriaceae та роду Lelliottia разом із *L. nimipressuralis* (спочатку відомою як *Erwinia nimipressuralis*, а пізніше перекласифікованою як *Enterobacter nimipressuralis*) та новим видом *L. jeotgali*, який асоціюється з традиційними корейськими ферментованими моллюсками [116]. Вірулентні властивості цього виду представлені такими ферментами, як пектиназа, протеаза, пектинліаза та целюлаза [117]. Зазвичай її виявляють у джерелах води, а потім у харчових продуктах (цибуля, вершки, непастеризоване молоко та

іспанські свинячі ковбаси), що за сприятливих умов може спричиняти інфекційні захворювання у людей, особливо у імунокомпрометованих пацієнтів. У наукових публікаціях описано декілька випадків інфекцій у людей, таких як ендодфальміт, інфекції сечовивідних шляхів, піонефроз та сепсис [118].

L. amnigena є штамом з низькою вірулентністю та зберігають чутливість до антибіотиків, однак вони асоціюються з утворенням біоплівки [118].

L. amnigena є патогенним мікроорганізмом з відносно низькою вірулентністю. Він рідко викликає інфекції у людей, здебільшого у осіб з ослабленою імунною системою і, зазвичай, виділяється з біологічних рідин, таких як мокротиння, кров і сеча. Водночас показано, що *L. amnigena* не завжди виступає основним збудником інфекції, а часто є потенційним колонізатором. Співіснування з іншими патогенними бактеріями з низькою вірулентністю може підвищувати патогенність *L. amnigena*, спричиняючи полімікробні інфекції в умовах, схожих на описаний випадок, зокрема ті, що пов'язані з утворенням біоплівки [118].

Kurthia gibsonii спостерігалася на всіх етапах виробництва: у 33% молока-сировини та молока після бактофугування, у 50% нормалізованої суміші та у 17% пастеризованого молока, сиру після пресування і готового продукту. *Kurthia* spp. зазвичай непатогенні, але можуть проявляти протеолітичну, ліполітичну та антимікробну активність, що може впливати на якість молока та сирів.

Рід *Kurthia* був описаний Тревісаном у 1885 році на честь Г. Курта, який виділив та охарактеризував перший вид [155]. Рід *Kurthia* складається з восьми визнаних видів – *Kurthia zopfii*, *Kurthia gibsonii*, *Kurthia sibirica*, *Kurthia massiliensis*, *Kurthia huakuii*, *Kurthia senegalensis*, *Kurthia ruminicola* та *Kurthia populi* [156]. Види мікроорганізмів роду *Kurthia* зазвичай вважаються непатогенними, оскільки вони часто трапляються у навколишньому середовищі або як частина фізіологічної мікрофлори у різних видах тварин і рослин [157]. Тим не менш, їх було виділено із різних клінічних матеріалів, таких як

мокротиння, пілонідальна кіста, уретра, аортальний клапан та фекалії пацієнтів з гострою діареєю [158] і тому їх слід розглядати як умовно патогенні мікроорганізми. *Kurthia* spp. також були виділені з баранини, свинини, птиці та м'яса кролів, а також з різних оброблених м'ясних продуктів [159] та виробляє антимікробні пептиди.

Kurthia gibsonii була виділена на всіх етапах, ймовірно, завдяки потраплянню разом із сировиною.

Kurthia gibsonii – суворе аеробна психротрофна бактерія, яку виділяють зі свіжого м'яса, сирого молока та кисломолочного паніру. Вона може бути причетна до псування м'яса, але не завжди впливає на свіже молоко. *K. gibsonii* проявляє протеолітичну, ліполітичну та антимікробну активність, тому її бактеріоцини можуть використовуватися як харчові консерванти [160].

Enterococcus spp. (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. saccharolyticus*) були виділені на більшості етапів технологічного процесу. *E. faecalis* виявлено у 50% молока-сировини, 66% – після бактофугування та нормалізованої суміші, 17% – пастеризованого молока, 50% – сирного зерна та готового продукту. *E. faecium* виявлявся на всіх етапах окрім нормалізованої та пастеризованої суміші, у готовому продукті – у 17% випадків. Ці бактерії є частиною нормальної флори людини та тварин, але можуть спричиняти нозокоміальні інфекції (бактеріємії, інфекцій сечовивідних шляхів, шкіри, м'яких тканин, черевної порожнини, тазу та центральної нервової системи) та проявляти стійкість до антибіотиків. Основну частку викликає *E. faecalis* (~80 %) та *E. faecium* (10–15 %). Ці бактерії стійкі до багатьох антибактеріальних засобів, здатні передавати гени стійкості іншим мікроорганізмам, що робить їх індикаторами антимікробної резистентності та потенційно небезпечними для людини.

Збільшення кількості зразків, з яких було виділено *E. faecalis*, може бути пов'язане з утворенням біоплівок цих мікроорганізмів на обладнанні або з незадовільним рівнем його гігієни [100].

Streptococcus spp. включають екологічні та молочнокислі види, такі як *S. uberis*, *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*, *S. parauberis* та *S. gallolyticus*., *S. parauberis* відіграє роль у ферментації та формуванні смаку продукту, тоді як *S. gallolyticus* був виявлений у 17% після бактофугування та у 100% пастеризованого молока, що підкреслює потенційний мікробіологічний ризик через його здатність спричиняти ендокардит та колоректальний рак. До екологічних видів *Streptococcus*, що асоціюються з маститом великої рогатої худоби, належать *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae*, *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equinus* (раніше відомий як *Streptococcus bovis*) та *Streptococcus parauberis* (раніше описаний як *S. uberis* генотипу II) [122].

Streptococcus uberis вважається непатогенним для людини, ймовірно, через складнощі у визначенні цього типу інфекції.

Серед стрептококів екологічного походження *S. uberis* та *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae* є найпоширенішими збудниками, які за сприятливих умов найчастіше інфікують молочну залозу [122].

Нещодавні дослідження підкреслюють потенційну роль *Streptococcus parauberis* у ферментаційних процесах. *S. parauberis* впливає на амінокислотний профіль та розвиток смаку в мао-тофу, що обґрунтовує його застосування у функціональних ферментованих продуктах [137]. Крім того, його участь у спонтанному бродінні молока була задокументована, де він співіснує з іншими молочнокислими бактеріями (МКБ) [138]. Ферментація не лише покращує смак та текстуру молочних продуктів, а й їх харчовий профіль та термін придатності. Метаболічна активність *S. parauberis* може сприяти формуванню унікальних сенсорних властивостей продуктів, хоча досліджень у цьому напрямі поки обмаль.

Взаємодія *S. parauberis* з іншими МКБ під час ферментації може створювати синергетичні ефекти, що покращують загальний процес.

Наприклад, присутність різних штамів МКБ, зокрема, *Streptococcus thermophilus*, впливає на динаміку росту та метаболічні профілі під час молочної ферментації [139]. Це свідчить про потенціал *S. parauberis* для спільного використання зі штамми МКБ для оптимізації ферментації, хоча його конкретний внесок потребує подальших досліджень.

Дані літератури також свідчать про антимікробну активність *S. parauberis*, що може бути корисною для контролю організмів, що спричиняють псування молочних продуктів. Здатність виробляти бактеріюцини та інші антимікробні сполуки сприяє підвищенню безпечності та якості ферментованих продуктів. Цей аспект набуває особливої актуальності у контексті зростаючого попиту на натуральні та мінімально оброблені продукти, де перевага надається корисним мікроорганізмам замість синтетичних консервантів [139].

Хоча *S. parauberis* здебільшого відомий як збудник маститу великої рогатої худоби, його потенційне застосування у ферментації молока потребує подальшого вивчення. Розуміння його взаємодії з іншими МКБ та метаболічних можливостей може призвести до інноваційних підходів у молочній промисловості, що підвищить якість та безпечність молочних продуктів.

Streptococcus gallolyticus виділили у 17% зразків після бактофугування та у 100% зразків молока пастеризованого. Це свідчить про потенційний мікробіологічний ризик, оскільки після пастеризації продукт не проходить термічної обробки, а відповідно є ризик потрапляння його у кінцевий продукт. *Streptococcus gallolyticus* – опортуністичний патоген може проникати в кровообіг людини та спричиняти різні захворювання, включаючи інфекційний ендокардит та колоректальний рак. У корів він може викликати мастит [163].

Moraxella osloensis виділено у 17% зразків нормалізованої суміші. Ця бактерія є коменсальною, рідко викликає клінічно значущі інфекції у людей із ослабленим імунітетом, але може контамінувати молоко з виробничого середовища. *Moraxella osloensis* – аеробна, оксидазопозитивна грамнегативна коккобацила родини Moraxellaceae, зазвичай коменсальна, що мешкає на шкірі,

слизових оболонках та у дихальних шляхах людини. Рідко викликає клінічно значущі інфекції, переважно у осіб із імунodefіцитом, включно з пацієнтами з онкологічними захворюваннями та реципієнтами трансплантатів [132–136]. Мікроорганізм ізолювано також із навколишнього середовища, зокрема лікарняного, що свідчить про можливу роль у внутрішньолікарняних інфекціях. Його рідкість і складність ідентифікації обмежують знання про клінічне значення; точне визначення за допомогою MALDI-TOF MS [132,134].

У харчових продуктах *M. osloensis* зазвичай не трапляється, але може потрапляти з виробничого середовища та забруднювати сире або пастеризоване молоко [140]. У нашому дослідженні мікроорганізм зафіксований лише на етапі нормалізованої суміші у 17% зразків.

Buttiauxella sp. були виявлені у молоці як психротолерантні, факультативно анаеробні бактерії.

Buttiauxella sp. – це психротолерантні, факультативно анаеробні, грамнегативні паличкоподібні бактерії, які належать до типу Proteobacteria, класу Gammaproteobacteria, порядку Enterobacteriales, родини Enterobacteriaceae та роду *Buttiauxella*. Ці мікроорганізми зазвичай ізолюють із води та ґрунту, а також з апендикса і кишкового тракту; проте їхнє клінічне значення ще не до кінця вивчено. Дані бактерії були виділені із кишківника диких жуйних [145].

Бактерії роду *Buttiauxella* sp. можуть виділятися із сирого молока [142].

Aeromonas media зафіксована одноразово у нормалізованій суміші. Ці бактерії ростуть за низьких температур, потенційно спричиняють гастроентерит у дітей та осіб з ослабленим імунітетом і можуть бути джерелом харчових інфекцій. *Aeromonas media* також була виділена на етапі нормалізованої суміші одноразово та більше не фіксувалась.

Вперше вид *Aeromonas media* було описано Алленом та співавт. (1983) після виділення з річки Ейвон, Англія [148]. Надалі бактерію виявляли у різних водних середовищах, включно зі стічними водами, у воді озера, річки та питній воді [149, 150]. У людей *A. media* асоціюють з випадками діареї [151], а у риб –

з виразками шкіри, наприклад, у коропа Кої, сома, тупоносого ляща, вугра, південного чорного ляща та карася [152]. Також *A. media* виділяли з молюсків, зокрема устриць, равликів, гребінців та креветок [153]. На ринках різних країн його виявляли у суші, заморожених морепродуктах й охолодженому м'ясі птиці та свинини [154]. Це свідчить, що *A. media* може передаватися людині через їжу, воду та довкілля [147].

Види роду *Aeromonas* часто ізолюються із сирого молока та можуть траплятися у до 60% зразків. Хоча аеромонади зазвичай чутливі до тепла та інактивуються під час пастеризації, їх виявляли у пастеризованому молоці та молочних продуктах, ймовірно, внаслідок обсіменіння після термічної обробки. Ці бактерії здатні рости за низьких температур (4–8 °C), що робить їх присутність в охолоджених продуктах харчування важливими з точки зору безпеки для споживачів [146].

Aeromonas spp. та інші рухомі аеромонади, асоційовані з гастроентеритом у дітей, літніх людей та осіб із порушеним імунітетом. Види роду *Aeromonas* спочатку вважалися патогенами холоднокровних тварин, однак нині відомо, що вони можуть бути джерелом харчових інфекцій у людей. У зв'язку з цим дослідження обсіменіння сирого і пастеризованого молока аеромонадами є актуальним для оцінки безпеки молочних продуктів [146].

Дослідження *Aeromonas media* SD/21–15, виділеного з морських відкладень, показало наявність генів, що визначають вірулентність та антимікробну стійкість, порівняно з іншими видами роду *Aeromonas*. Це свідчить про потенційну роль цього виду у передачі резистентності та ризику для здоров'я, особливо у водних середовищах і продуктах харчування, які контактують із морською водою [147].

Bacillus spp., зокрема *B. cereus* та *B. licheniformis*, були виявлені у пастеризованому молоці та сирі після пресування і дозрівання. Це споротвірні мікроорганізми, які можуть спричиняти псування продукту та бути потенційним джерелом харчових токсинів.

B. cereus – це споротвірний мікроорганізм, поширений як контамінант молочних продуктів (табл. 7). Через те, що цей мікроорганізм широко поширений у навколишньому середовищі, він може обсіменяти молоко під час доїння та потрапляти у молочні продукти на будь-якому етапі обробки, зберігання або дозрівання твердих сирів. Пастеризація молока не є ефективною проти обсіменіння *B. cereus* і вона може навіть виступати активатором проростання спор. *B. cereus* був виявлений у пастеризованому молоці та сирі після пресування у 33% та у 50% у сирі після дозрівання. Встановлено, що у попередніх етапах ці види бактерій не були зафіксовані.

Bacillus – це ще один психротрофний грампозитивний мікроорганізм, пов'язаний із псуванням продуктів. Ці мікроорганізми впливають на термін придатності пастеризованого молока. *Bacillus licheniformis* був виділений лише один раз у 66% зразках пастеризованого молока.

Lactococcus lactis відноситься до мезофільної групи бактерій і є ключовим компонентом заквасок. Основна функція лактококів у молочних ферментаціях полягає у метаболізмі лактози з утворенням молочної кислоти та перетворенні молочних білків на сполуки, що формують смак продукту. Ці бактерії є грампозитивними, каталазонегативними, факультативно анаеробними, нерухомими та неспоротвірними. Штами *Lactococcus lactis* використовуються у молочних ферментаціях [115]. *Lactococcus lactis* були виділені у молоці-сировині у 17% та у 50% зразках після бактофугування. У нормалізованій суміші та молоці після пастеризації – вони не фіксувалися. Також *Lactococcus lactis* був виділений у сирі після пресування у 66% зразків та кінцевому продукті у тій же кількості зразків – 66%.

Chryseobacterium, *Lelliottia*, *Kurthia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Moraxella*, *Buttiauxella*, *Aeromonas* та *Bacillus* демонструють різну роль у формуванні мікробіологічного складу продукту: від технологічно значущих до умовно-патогенних мікроорганізмів. Їхня присутність підкреслює важливість контролю санітарного стану обладнання, якості сировини та моніторингу на

завершальних етапах виробництва для забезпечення безпечності готового продукту.

У сирому молоці ізолювано такі види бактерій, як *E. coli*, *Streptococcus uberis*, *Acinetobacter pittii* та *Citrobacter braakii*, що свідчить про можливу контамінацію молока-сировини мікрофлорою навколишнього середовища або обладнання. Після проведення технологічних операцій, зокрема, бактофугування та пастеризації, виявлено часткове зниження різноманіття мікроорганізмів, однак окремі види бактерій зберігалися на наступних етапах виробництва.

У процесі формування сирного зерна, пресування та визрівання було виявлено наявність таких мікроорганізмів як *Klebsiella variicola*, *E. coli*, *Streptococcus uberis* та *Acinetobacter pittii*, що може свідчити про можливість вторинної контамінації під час технологічного процесу.

Отримані результати підтверджують, що мікробіологічний склад продукту формується під впливом як вихідної сировини, так і умов виробництва, включно із санітарним станом обладнання, технологічними операціями та параметрами виробничого середовища.

Виявлення умовно-патогенних мікроорганізмів на окремих етапах виробництва підкреслює необхідність проведення оцінки мікробіологічних ризиків у технологічному процесі виробництва твердого сичужного сиру.

Отримані результати дослідження мають важливе практичне значення для удосконалення системи мікробіологічного контролю під час виробництва твердих сичужних сирів. Проведений аналіз мікробіоти на різних етапах технологічного процесу дозволив визначити основні джерела мікробної контамінації та встановити критичні стадії, на яких можливе потрапляння небажаної мікрофлори до продукту.

Зокрема встановлено, що сире молоко є основним джерелом первинної мікробної контамінації, а також підтверджено можливість повторного інфікування продукту під час окремих технологічних операцій, зокрема під час

пресування, засолювання та дозрівання сиру. Особливу увагу слід приділяти контролю мікробіологічного стану розсолу, оскільки він може виступати додатковим фактором перенесення мікроорганізмів у сирну масу.

Виявлення умовно-патогенних мікроорганізмів та бактерій індикаторної групи, зокрема *E. coli*, *K. pneumoniae* та *Enterobacter cloacae*, свідчить про необхідність посилення санітарно-гігієнічного контролю технологічного обладнання, виробничого середовища та допоміжних матеріалів.

Практичне використання отриманих результатів може бути спрямоване на вдосконалення системи менеджменту безпечності харчових продуктів на підприємствах молочної промисловості, зокрема шляхом уточнення критичних контрольних точок у системі НАССР, поліпшення ефективності санітарної обробки технологічного обладнання та оптимізації режимів мікробіологічного моніторингу у процесі виробництва твердих сирів.

Результати проведених досліджень можуть бути використані для розроблення рекомендацій щодо підвищення мікробіологічної безпечності молочних продуктів та запобігання контамінації сирів небажаною мікрофлорою.

На основі результатів проведених мікробіологічних досліджень та аналізу ризиків у технологічному процесі виробництва твердого сичужного сиру можна запропонувати такі рекомендації щодо поліпшення безпечності готового продукту.

Оскільки сире молоко є основним джерелом первинної мікробної контамінації, необхідно здійснювати регулярний мікробіологічний контроль сировини, зокрема щодо наявності бактерій групи *Enterobacteriaceae* та індикаторних мікроорганізмів, таких як *E. coli*.

Пастеризація є однією з ключових технологічних операцій, що забезпечує зниження мікробного навантаження. Необхідно забезпечувати суворе дотримання температурних режимів та часу пастеризації, а також здійснювати регулярну перевірку ефективності роботи пастеризаційного обладнання.

Особливу увагу слід приділяти санітарно-гігієнічному стану технологічного обладнання, форм для пресування, трубопроводів та інших поверхонь, які контактують із сирною масою, оскільки вони можуть бути джерелом повторного інфікування продукту.

Розсіл може виступати додатковим фактором перенесення мікроорганізмів у сирну масу, тому необхідно здійснювати регулярний мікробіологічний контроль розсолу, своєчасно проводити його пастеризацію або заміну, а також контролювати санітарний стан ємностей для його зберігання.

Наявність умовно-патогенних бактерій може бути пов'язана з формуванням мікробних біоплівки на поверхнях обладнання. Для їх запобігання необхідно застосовувати ефективні методи санітарної обробки та дезінфекції.

Контроль мікробіологічного стану повинен проводитися на всіх етапах виробництва, включно з дослідженням сирого молока, проміжних продуктів, розсолу та готових продуктів.

Отримані результати можуть бути використані для уточнення критичних контрольних точок у системі НАССР та оптимізації програм виробничого контролю на підприємствах молочної промисловості.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено комплексне мікробіологічне дослідження під час технологічного процесу виробництва твердого сичужного сиру «Український» із використанням сучасного методу ідентифікації MALDI-TOF MS; встановлено чутливість окремих клінічно значущих мікроорганізмів до антибіотиків на різних етапах технологічного процесу, що дозволило проаналізувати динаміку формування мікрофлори та її стійкості до антибактеріальних засобів – від сирого молока до готового продукту – та оцінити потенційні мікробіологічні ризики.

1. Встановлено, що мікробіологічний склад молока-сировини характеризується високим різноманіттям: ідентифіковано 18 видів мікроорганізмів. Значна частина мікрофлори, ідентифікованої в молоці-сировині, мала фекальне походження: *E. faecalis* було виявлено у 50% зразків, а *Enterobacter cloacae* та *Enterobacter bugandensis* – у 33% зразків.

2. На другому технологічному етапі – бактофугуванні – у молоці було виділено та ідентифіковано 13 видів мікроорганізмів. Порівняно із молоком-сировиною, на другому етапі не було виявлено *Acinetobacter baumannii*, *Hafnia alvei*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus uberis*, *Enterobacter kobei*, *Citrobacter braakii*, *Macroccoccus caseolyticus*, однак деякі бактерії були виділені вперше у 17% зразків, зокрема, *Staphylococcus chromogenes* та *Streptococcus gallolyticus*.

3. На етапі вивчення зразків молочної суміші, нормалізованої за вмістом жиру, було повторно виділено 18 видів мікроорганізмів. Відзначено появу мікроорганізмів, які не були виділені на попередніх двох етапах, а саме: *Lelliottia amnigena*, *Streptococcus parauberis* та *Citrobacter gillenii*, *Citrobacter koseri*, *Moraxella osloensis*, *Buttiauxella gaviniae*, *Aeromonas media*.

4. У пастеризованій суміші на наступному, третьому етапі, були виявлені 10 видів мікроорганізмів. Після пастеризації відзначили появу різних видів

бактерій родини *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*), які раніше не фіксувалися.

5. Встановлено, що у сирі після пресування присутні 15 видів мікроорганізмів. На відміну від попередніх етапів, у суміші після пресування сиру були виявлені *K. pneumoniae*, різні види бактерій роду *Klebsiella*, *Enterobacter xiangfangensis*, *Pseudomonas putida* та *Enterobacter hormaechei*, що може свідчити про внутрішнє обсіменіння під час виробництва сиру.

6. У розсолі для засолювання сиру до та після пастеризації ізолювано 7 видів мікроорганізмів. *Enterobacter xiangfangensis* виявлено лише після пастеризації розсолу у незначній кількості (1×10^3 КУО/см³).

7. На завершальному етапі досліджень у твердому сичужному сирі «Український» після дозрівання ізолювано 18 видів мікроорганізмів, зокрема, виділено бактерії, які не траплялися на попередніх технологічних етапах: *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium flavescens*, *Staphylococcus hominis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Enterobacter asburiae*, *Corynebacterium flavescens*.

8. Доведено, що бактерії родини *Enterobacteriaceae*, зокрема *E. coli*, є домінуючими на всіх етапах технологічного процесу. *E. coli* була виявлена у 100% зразків сирого молока та зберігалася до кінцевого продукту (83 %), що свідчить про її високу адаптивність, здатність до виживання після технологічних обробок і можливу внутрішню контамінацію виробництва.

9. Встановлено, що мікроорганізми, ізолювані на різних етапах виробництва, демонструють варіабельну чутливість до антибактеріальних препаратів. Зокрема *E. coli* із молока-сировини характеризувалася високим рівнем стійкості, тоді як після бактофугування виявлено підвищення її чутливості до більшості антибіотиків. Водночас на наступних етапах знову відзначено зростання стійкості *E. coli* до антибіотиків.

10. Встановлено, що *Klebsiella pneumoniae* зберігає чутливість до антибіотиків, за винятком окремих випадків стійкості до ампіциліну та фосфоміцину.

11. Визначено, що *Acinetobacter baumannii* зберігає чутливість до антибактеріальних препаратів, за винятком окремих випадків стійкості до цефотаксиму.

12. Проведено оцінку мікробіологічних ризиків: найвищий рівень ризику пов'язаний із сирим молоком, тоді як середній рівень ризику характерний для більшості наступних стадій виробництва.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Управління мікробіологічними ризиками під час виробництва твердого сичужного сиру необхідне тільки за умови комплексного моніторингу на всіх етапах виробництва з акцентом на молоко-сировину.

2. Обґрунтовано необхідність посилення санітарно-гігієнічного контролю на підприємстві, регулярного моніторингу *Enterobacteriaceae* (особливо *E. coli*), контролю мікрофлори розсолу, виявлення та руйнування біоплівки, застосування сучасних методів ідентифікації мікроорганізмів з використанням методик MALDI-TOF MS.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mikulec, N., Oštarić, F., Plavljanić, D., Lovrić, N., & Kljusurić, J. G. (2024). MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based Identification of Aerobic Mesophilic Bacteria in Raw Unpreserved and Preserved Milk. *Processes*, 12(4), 731. <https://doi.org/10.3390/pr12040731>
2. Yuan, H., Han, S., Zhang, S., Xue, Y., Zhang, Y., Lu, H., & Wang, S. (2022). Microbial Properties of Raw Milk throughout the Year and Their Relationships to Quality Parameters. *Foods*, 11(19), 3077. <https://doi.org/10.3390/foods11193077>
3. Mohamed, H. M. A., Abd-Elhafeez, H. H., Al-Jabr, O. A., & El-Zamkan, M. A. (2022). Characterization of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Raw Milk. *Biology*, 11(12), 1845. <https://doi.org/10.3390/biology11121845>
4. Song, J., Xiang, W., & Gong, Q. L. (2023). Prevalence and risk factors of *Klebsiella* spp. in milk samples from dairy cows with mastitis—A global systematic review. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1143257. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1143257>
5. Oliver, S. P., Boor, K. J., Murphy, S. C., & Murinda, S. E. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), 793–806. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0302>
6. Міністерство освіти та науки України. (б.д.). Мікробіологія молока і молочних продуктів: Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів I-II рівнів акредитації зі спеціальності 5.05170111 “Зберігання, консервування та переробка молока”. Технологіко-економічний коледж Білоцерківського НАУ.
7. Hahne, J., Kloster, T., Rathmann, S., Weber, M., & Lipski, A. (2018). Isolation and characterization of *Corynebacterium* spp. from bulk tank raw cow's milk of different dairy farms in Germany. *PLoS ONE*, 13(3), e0194365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194365>

8. Song, J., Xiang, W., Wang, Q., Yin, J., Tian, T., Yang, Q., Zhang, M., Ge, G., Li, J., Diao, N., Liu, F., Shi, K., Cai, R., Du, R., & Gong, Q. (2023). Prevalence and risk factors of *Klebsiella* spp. in milk samples from dairy cows with mastitis – A global systematic review. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1143257. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1143257>
9. Bonardi, S., Cabassi, C. S., Fiaccadori, E., Cavirani, S., Parisi, A., Bacci, C., Lamperti, L., Rega, M., Conter, M., Marra, F., Crippa, C., Gambi, L., Spadini, C., Iannarelli, M., Paladini, C., & Filippin, N. (2023). Detection of carbapenemase- and ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* from bovine bulk milk and comparison with clinical human isolates in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 387, 110049. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110049>
10. Barberis, C., Almuzara, M., Join-Lambert, O., Ramírez, M. S., Famiglietti, A., & Vay, C. (2014). Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. *PLoS ONE*, 9(9), e106303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106303>
11. Ashurst, J. V., & Dawson, A. (2023). *Klebsiella pneumoniae*. StatPearls Publishing. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30085546/>
12. Farrell, S., Benson, T., McKernan, C., Regan, Á., Burrell, A. M. G., & Dean, M. (2023). Factors influencing dairy farmers' antibiotic use: An application of the COM-B model. *Journal of Dairy Science*, 106(6), 4059–4071. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22263>
13. Gómez, M., Houwers, D., & Smith, R. (2023). Antibiotic residues in milk as a consequence of mastitis treatment: Balancing animal welfare and One Health risks. *Veterinary Sciences*, 12(12), 1159. <https://doi.org/10.3390/vetsci12121159>
14. Kumar, A., Panda, A. K., & Sharma, N. (2022). Determination of antibiotic residues in bovine milk by HPLC-DAD and assessment of human health

risks in Northwestern Himalayan region, India. *Journal of Food Science and Technology*, 59, 95–104. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05040-z>

15. Navarrete-Molina, C., Meza-Herrera, C. A., De Santiago-Miramontes, A., Valenzuela-Núñez, L. M., Marin-Tinoco, R. I., Soto-Cardenas, M. A., & Sariñana-Navarrete, M. A. (2024). Dairy goat production: Socioeconomic, environmental, and cultural importance across time (1970–2022) and possible scenarios (2050). *Resources*, 13, 177. <https://doi.org/10.3390/resources13110177>

16. Simbine-Ribisse, E. O., Bila, N. M., Manhiça, A. J., Macuamule, C. J., & Bragotto, A. P. A. (2024). Antibiotic residues in dairy products in Africa: A systematic review. *Food Chemistry Advances*, 5, 100822. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100822>

17. Von Keyserlingk, M., Rushen, J., de Passillé, A. M., & Weary, D. M. (2009). Invited review: The welfare of dairy cattle – Key concepts and the role of science. *Journal of Dairy Science*, 92, 4101–4111. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2326>

18. Ajose, D. J., Oluwarinde, B. O., Abolarinwa, T. O., Fri, J., Montso, K. P., Fayemi, O. E., Aremu, A. O., & Ateba, C. N. (2022). Combating bovine mastitis in the dairy sector in an era of antimicrobial resistance: Ethno-veterinary medicinal option as a viable alternative approach. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 800322. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.800322>

19. Tomanić, D., Samardžija, M., & Kovačević, Z. (2023). Alternatives to antimicrobial treatment in bovine mastitis therapy: A Review. *Antibiotics*, 12, 683. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040683>

20. Virto, M., Santamarina-García, G., Amores, G., & Hernández, I. (2022). Antibiotics in dairy production: Where is the problem? *Dairy*, 3, 541–564. <https://doi.org/10.3390/dairy3030039>

21. Krömker, V., & Leimbach, S. (2017). Mastitis treatment – Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 21–29. <https://doi.org/10.1111/rda.13032>

22. Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. (2023). Antimicrobial resistance: A growing serious threat for global public health. *Healthcare*, 11(13), 1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
23. Sekyere, J. O., & Asante, J. (2018). Emerging mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria and fungi: Advances in the era of genomics. *Future Microbiology*, 13(2), 241–262. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0221>
24. Pipitò, L., Cassaro, D., Giammanco, A., Fasciana, T., & Di Carlo, P. (2025). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Journal of Pathogen Research*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s44158-024-00160-x>
25. Naddaf, M. (2024). 40 million deaths by 2050: Toll of drug-resistant infections to rise by 70%. *Nature*, 633, 747–748. <https://doi.org/10.1038/d41586-024-03033-w>
26. World Health Organization. (2024, August 26). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
27. World Health Organization. (2024). *WHO bacterial priority pathogens list, 2024*. World Health Organization. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf>
28. Denissen, J., Reyneke, B., Waso-Reyneke, M., Havenga, B., Barnard, T., Khan, S., & Khan, W. (2022). Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 244, 114006. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114006>
29. Daruka, L., Czikkely, M. S., Szili, P., Farkas, Z., Balogh, D., Grézal, G., Maharramov, E., Vu, T. H., Sipos, L., Juhász, S., et al. (2025). ESKAPE pathogens rapidly develop resistance against antibiotics in development in vitro. *Nature Microbiology*, 10, 313–331. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01891-8>

30. Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G. & Edwards, J. E. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 1279–1286 (2004).
31. Ma, Y.-X., Wang, C.-Y., Li, Y.-Y., Li, J., Wan, Q.-Q., Chen, J.-H., Tay, F. R., & Niu, L.-N. (2019). Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. *Advanced Science*, 7(1), 1901872. <https://doi.org/10.1002/advs.201901872>
32. Wieland, K., Chhatwal, P., & Vonberg, R. P. (2018). Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: A systematic review. *American Journal of Infection Control*, 46(6), 643–648. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.11.014>
33. Lupo, A., Haenni, M., & Madec, J. Y. (2018). Antimicrobial resistance in animals: Food-producing animals and pets. *Microbiology Spectrum*, 6(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0006-2017>
34. Tavares-Carreón, F., De Anda-Mora, K., Rojas-Barrera, I. C., & Andrade, A. (2023). *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: A literature review. *PeerJ*, 11, e14399. <https://doi.org/10.7717/peerj.14399>
35. Elshobary, M. E., Badawy, N. K., Ashraf, Y., Zatioun, A. A., Masriya, H. H., Ammar, M. M., Mohamed, N. A., Mourad, S., & Assy, A. M. (2025). Combating antibiotic resistance: Mechanisms, multidrug-resistant pathogens, and novel therapeutic approaches: An updated review. *Pharmaceuticals*, 18(3), 402. <https://doi.org/10.3390/ph18030402>
36. Kakoullis, L., Papachristodoulou, E., Chra, P., & Panos, G. (2021). Mechanisms of antibiotic resistance in important Gram-positive and Gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. *Antibiotics*, 10(4), 415. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040415>

37. De Gaetano, G. V., Lentini, G., Famà, A., Coppolino, F., & Beninati, C. (2023). Antimicrobial resistance: Two-component regulatory systems and multidrug efflux pumps. *Antibiotics*, 12(6), 965. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060965>
38. Elshobary, M. E., Ebaid, R., Alquraishi, M., & Ende, S. S. (2025). Synergistic microalgal cocultivation: Boosting flocculation, biomass production, and fatty acids profile of *Nannochloropsis oculata* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Biomass and Bioenergy*, 193, 107595. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2024.107595>
39. El-Sapagh, S., El-Shenody, R., Pereira, L., & Elshobary, M. (2023). Unveiling the potential of algal extracts as promising antibacterial and antibiofilm agents against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: In vitro and in silico studies including molecular docking. *Plants*, 12(18), 3324. <https://doi.org/10.3390/plants12183324>
40. Ahsan, A., Thomas, N., Barnes, T. J., Subramaniam, S., Loh, T. C., Joyce, P., & Prestidge, C. A. (2024). Lipid nanocarriers-enabled delivery of antibiotics and antimicrobial adjuvants to overcome bacterial biofilms. *Pharmaceutics*, 16(3), 396. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16030396>
41. Zakaria, N. F. S., & Yahya, M. F. Z. R. (2023). Multiple bacterial strategies to survive antibiotic pressure: A review. *Preprints*. <https://doi.org/10.20944/preprints202311.1070.v1>
42. Chaudhari, R., Singh, K., & Kodgire, P. (2022). Biochemical and molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Salmonella* spp. *Research in Microbiology*, 174, 103985. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103985>
43. Belay, W. Y., Getachew, M., Tegegne, B. A., Teffera, Z. H., Dagne, A., Zeleke, T. K., Abebe, R. B., Gedif, A. A., Fenta, A., Yirdaw, G., & et al. (2024). Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1444781. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1444781>

44. Scoffone, V. C., Trespidi, G., Barbieri, G., Arshad, A., Israyilova, A., & Buroni, S. (2025). The evolution of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* and new strategies to fight it. *Antibiotics*, 14(1), 85. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14010085>
45. Tatsi, V. A., et al. (2021). Prevalence and mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from mastitic dairy cattle in Canada. *BMC Microbiology*, 21, 222. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02279-8>
46. Ghai, I. (2024). Electrophysiological insights into antibiotic translocation and resistance: The impact of outer membrane proteins. *Membranes*, 14(8), 161. <https://doi.org/10.3390/membranes14080161>
47. Ghai, I. (2023). A barrier to entry: Examining the bacterial outer membrane and antibiotic resistance. *Applied Sciences*, 13(7), 4238. <https://doi.org/10.3390/app13074238>
48. Scoffone, V. C., Trespidi, G., Barbieri, G., Arshad, A., Israyilova, A., & Buroni, S. (2025). The evolution of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* and new strategies to fight it. *Antibiotics*, 14(1), 85. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14010085>
49. Nikoloudaki, O., Lemos Junior, W. J. F., Campanaro, S., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2021). Role prediction of Gram-negative species in the resistome of raw cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 340, 109045. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109045>
50. Food Inspection Agency. (2019). *Title of the document/report*. Food Inspection Agency.
51. Yi, S., Song, H., Kim, W.-H., Lee, S., Guk, J.-H., Woo, J., & Cho, S. (2024). Dynamics of microbiota and antimicrobial resistance in on-farm dairy processing plants using metagenomic and culture-dependent approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 417, 110704. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110704>

52. Woo, J., Guk, J.-H., Yi, S., Lee, J., Song, H., Kim, W.-H., & Cho, S. (2023). Effect of biofilm formation by antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in cold storage on survival in dairy processing lines. *International Journal of Food Microbiology*, 386, 110019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110019>
53. Nikoloudaki, O., Lemos Junior, W. J. F., Campanaro, S., Di Cagno, R., & Gobetti, M. (2021). Role prediction of Gram-negative species in the resistome of raw cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 340, 109045. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109045>
54. Journal of Dairy Science. (2025). Biofilm formation in dairy: A food safety concern – Microbial community tracking from dairy farm to factory; Insights on biofilm management for enhanced food safety and quality. *Journal of Dairy Science*, 108(8), 8101–8119. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25671>
55. Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382–398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>
56. Grigore-Gurgu, L., Bucur, F. I., Borda, D., Alexa, E. A., Neagu, C., & Nicolau, A. I. (2019). Biofilms formed by pathogens in food and food processing environments. In *Bacterial Biofilms*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86532>
57. Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., & Gohar, M. (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, 156(4), 1009–1018. <https://doi.org/10.1099/mic.0.034827-0>
58. Gould, L. H., Mody, R. K., Ong, K. L., Clogher, P., Cronquist, A. B., Garman, K. N., Lathrop, S., Medus, C., Spina, N. L., Webb, T. H., & et al. (2013). Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000–2010: Epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(5), 453–460. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1404>

59. Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9, 898. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
60. Lim, E. S., Koo, O. K., Kim, M. J., & Kim, J. S. (2019). Bio-enzymes for inhibition and elimination of *Escherichia coli* O157:H7 biofilm and their synergistic effect with sodium hypochlorite. *Scientific Reports*, 9, 9920. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46342-9>
61. Lee, J., Bansal, T., Jayaraman, A., Bentley, W. E., & Wood, T. K. (2007). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* biofilms are inhibited by 7-hydroxyindole and stimulated by isatin. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4100–4109. <https://doi.org/10.1128/AEM.00360-07>
62. Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22–32. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>
63. Amina, M., & Bensoltane, A. (2015). Review of *Pseudomonas* attachment and biofilm formation in food industry. *Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences*, 3(1), 129. <https://doi.org/10.4172/2375-446X.1000129>
64. Carrascosa, C., Millán, R., Jaber, J. R., Lupiola, P., del Rosario-Quintana, C., Mauricio, C., & Sanjuán, E. (2015). Blue pigment in fresh cheese produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 54, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.042>
65. Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kačániová, M., Czaczyk, K., & et al. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6, 841. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>
66. Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. *BioMed Research International*, 2014, 827965. <https://doi.org/10.1155/2014/827965>

67. Salamandane, A., Leech, J., Almeida, R., et al. (2024). Metagenomic analysis of the bacterial microbiome, resistome and virulome distinguishes Portuguese Serra da Estrela PDO cheeses from similar non-PDO cheeses: An exploratory approach. *Food Research International*, 189, 114556. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114556>
68. Kaur, H., Kaur, G., & Ali, S. A. (2022). Dairy-based probiotic fermented functional foods: An update on their health-promoting properties. *Fermentation*, 8(9), 425. <https://doi.org/10.3390/fermentation8090425>
69. Bastião Rocha, P. A., Monteiro Marques, J. M., Barreto, A., & Semedo-Lemsaddek, T. (2022). *Enterococcus* spp. from Azeitão and Nisa PDO-cheeses: Surveillance for antimicrobial drug resistance. *LWT – Food Science and Technology*, 154, 112622. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112622>
70. Russo, N., Caggia, C., Pino, A., Coque, T. M., Arioli, S., & Randazzo, C. L. (2018). *Enterococcus* spp. in Ragusano PDO and Pecorino Siciliano cheese types: A snapshot of their antibiotic resistance distribution. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.023>
71. Zheng, X., Shi, X., & Wang, B. (2021). A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Frontiers in Microbiology*, 12, 703284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703284>
72. Golob, M., Pate, M., Kušar, D., et al. (2019). Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat. *BioMed Research International*, 2019, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/2815279>
73. Amidi-Fazli, N., & Hanifan, S. (2022). Biodiversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Enterococcus* species in artisanal dairy products. *International Dairy Journal*, 129, 105287. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105287>

74. Liu, J., Zhu, Y., Jay-Russell, M., Lemay, D. G., & Mills, D. A. (2020). Reservoirs of antimicrobial resistance genes in retail raw milk. *Microbiome*, 8(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00861-6>
75. Possas, A., Bonilla-Luque, O. M., & Valero, A. (2021). From cheese-making to consumption: Exploring the microbial safety of cheeses through predictive microbiology models. *Foods*, 10(2), 355. <https://doi.org/10.3390/foods10020355>
76. Khattab, A. R., Guirguis, H. A., Tawfik, S. M., & Farag, M. A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 343–360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>
77. Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, E. H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21(6), 805–815. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.11.015>
78. Tiwari, U., Walsh, D., Rivas, L., Jordan, K., & Duffy, G. (2014). Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurised semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening. *Food Control*, 42, 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.005>
79. Rolim, F. R. L., Freitas Neto, O. C., Oliveira, M. E. G., Oliveira, C. J. B., & Queiroga, R. C. R. E. (2020). Cheeses as food matrixes for probiotics: In vitro and in vivo tests. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 138–154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.008>
80. Nuñez, M., Calzada, J., & Olmo, A. (2020). High pressure processing of cheese: Lights, shadows and prospects. *International Dairy Journal*, 100, 104558. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104558>
81. Alexa Oniciuc, E. A., Walsh, C. J., Coughlan, L. M., & et al. (2020). Dairy products and dairy-processing environments as a reservoir of antibiotic resistance and quorum quenching determinants as revealed through functional

metagenomics. *mSystems*, 5(1), e00723-19. <https://doi.org/10.1128/msystems.00723-19>

82. Weber, M., Göpfert, B., von Wezyk, S., Savin-Hofmeyer, M., & Lipski, A. (2023). Correlation between bacterial cell density and abundance of antibiotic resistance on milking machine surfaces assessed by cultivation and direct qPCR methods. *Microbial Ecology*, 86(3), 1676–1685. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02225-7>

83. Yao, J., Gao, J., Guo, J., & et al. (2022). Characterization of bacteria and antibiotic resistance in commercially produced cheeses sold in China. *Journal of Food Protection*, 85(3), 484–493. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-198>

84. Salamandane, A., Cahango, G., Muetanene, B. A., Malfeito-Ferreira, M., & Brito, L. (2023). Multidrug resistance in enterococci isolated from cheese and capable of producing benzalkonium chloride-resistant biofilms. *Biology*, 12(10), 1353. <https://doi.org/10.3390/biology12101353>

85. Okura, M. H., & Marin, J. M. (2014). Survey of Minas Frescal cheese from Southwest Minas Gerais for virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates. *Ciência Rural*, 44(8), 1506–1511. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131237>

86. Rodrigues, M. X., Silva, N. C. C., Trevilin, J. H., & et al. (2017). Molecular characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from cheese processing plants. *Journal of Dairy Science*, 100(7), 5167–5175. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12477>

87. ПВ.БЛС 7.2–08.15. (б.д.). *Мікробіологічний скринінг харчових продуктів, кормів та води*. [Робоча інструкція].

88. ПВ.БЛС 7.2-09/08. (б.д.). *Дослідження біологічних рідин мікробіологічним методом (напівкількісний метод)*. [Процедура верифікації].

89. РІ.БЛС 7.2-09.13. (б.д.). *Робота з MALDI-TOF MS Bruker Biotyper*. [Робоча інструкція].

90. ПВ.БЛС 7.2-09/10. (б.д.). *Виділення патогенних/умовно патогенних бактерій з ідентифікацією на MALDI-TOF MS*. [Процедура верифікації].
91. ДСТУ ISO 16140:2006. *Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Протокол валідації альтернативних методів*. (2006). Держспоживстандарт України.
92. РІ.БЛС 7.2-09/05. (б.д.). *Схеми постановки чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів різними методами*. [Робоча інструкція].
93. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2024). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0*. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
94. Zheplinska, M., Mushtruk, M., Shablui, L., Shynkaruk, V., Slobodyanyuk, N., Rudyk, Y., Chumachenko, I., Marchyshyna, Y., Omelian, A., & Kharsika, I. (2022). Development and shelf-life assessment of soft-drink with honey. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 16, 114–126. <https://doi.org/10.5219/173839>
95. Soman, R., & Eashwernath, R. (2020). Bacteremia due to *Streptococcus gallolyticus*: A name with an ominous significance? *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 24(10), 901–902. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-23623>
96. Birlutiu, V., Birlutiu, R. M., & Dobritoiu, E. S. (2023). *Lelliottia amnigena* and *Pseudomonas putida* coinfection associated with a critical SARS-CoV-2 infection: A case report. *Microorganisms*, 11(9), 2143. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092143>
97. Tirloni, E., Stella, S., Celandroni, F., Mazzantini, D., Bernardi, C., & Ghelardi, E. (2022). *Bacillus cereus* in dairy products and production plants. *Foods*, 11(17), 2572. <https://doi.org/10.3390/foods11172572>
98. Lázaro-Díez, M., Navascués-Lejarza, T., Remuzgo-Martínez, S., Navas, J., Icardo, J. M., Acosta, F., Martínez-Martínez, L., & Ramos-Vivas, J. (2016). *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii* clinical isolates lack adherence and cytotoxicity

to lung epithelial cells in vitro. *Microbes and Infection*, 18(9), 559–564.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.05.002>

99. Chooduang, S., Surya, W., Torres, J., & Boonserm, P. (2018). An aromatic cluster in *Lysinibacillus sphaericus* BinB is involved in toxicity and proper in-membrane folding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 660, 29–35.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.10.006>

100. Dawadi, P., Odari, R., Poudel, R. C., Pokhrel, L. R., & Bhatt, L. R. (2023). Isolation of *Lactococcus garvieae* NEP21 from raw cow (*Bos indicus*) milk in Nepal. *Science of The Total Environment*, 861, 160641.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160641>

101. Adamchuk, L., Sukhenko, V., Akulonok, O., Bilotserkivets, T., Vyshniak, V., Lisohurska, D., Lisohurska, O., Slobodyanyuk, N., Shanina, O., & Galyasnyj, I. (2020). Methods for determining the botanical origin of honey. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 483–493.
<https://doi.org/10.5219/1386>

102. Mohamed, H. M. A., Abd-Elhafeez, H. H., Al-Jabr, O. A., & El-Zamkan, M. A. (2022). Characterization of *Acinetobacter baumannii* isolated from raw milk. *Biology*, 11(12), 1845. <https://doi.org/10.3390/biology11121845>

103. Rogoskii, I., Mushtruk, M., Titova, L., Snezhko, O., Rogach, S., Blesnyuk, O., Rosamaha, Y., Zubok, T., Yeremenko, O., & Nadtochiy, O. (2020). Engineering management of starter cultures in study of temperature of fermentation of sour-milk drink with apiproducs. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 1047–1054. <https://doi.org/10.5219/1437>

104. Pati, N. B., Doijad, S. P., Schultze, T., Mannala, G. K., Yao, Y., Jaiswal, S., Ryan, D., Suar, M., Gwozdzinski, K., Bunk, B., Mraheil, M. A., Marahiel, M. A., Hegemann, J. D., Spröer, C., Goesmann, A., Falgenhauer, L., Hain, T., Imirzalioglu, C., Mshana, S. E., ... Chakraborty, T. (2018). *Enterobacter bugandensis*: A novel enterobacterial species associated with severe clinical infections. *Scientific Reports*, 8(1), 5047. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23069-z>

105. Nithichanon, A., Kewcharoenwong, C., Da-oh, H., Surajinda, S., Khongmee, A., Koosakunwat, S., Wren, B. W., Stabler, R. A., Brown, J. S., & Lertmemongkolchai, G. (2022). *Acinetobacter nosocomialis* causes as severe disease as *Acinetobacter baumannii* in Northeast Thailand: Underestimated role of *A. nosocomialis* in infection. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e02836-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02836-22>
106. Vijayakumar, S., Biswas, I., & Veeraraghavan, B. (2019). Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: An update. *Future Science OA*, 5(6), FSO395. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2018-0127>
107. Chusri, S., Chongsuvivatwong, V., Rivera, J. I., Silpapojakul, K., Singkhamanan, K., McNeil, E., & Doi, Y. (2014). Clinical outcomes of hospital-acquired infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 4172–4179. <https://doi.org/10.1128/AAC.02992-14>
108. Li, X., Tang, Y., & Lu, X. (2018). Insight into identification of *Acinetobacter* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the clinical laboratory. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(8), 1546–1553. <https://doi.org/10.1007/s13361-018-1911-4>
109. Cabral dos Santos, D., Lange, C. C., Avellar-Costa, P., Netto dos Santos, K. R., Paiva Brito, M. A. V., & Giambiagi-de Marval, M. (2016). *Staphylococcus chromogenes*, a coagulase-negative *Staphylococcus* species that can clot plasma. *PLOS ONE*, 11(3), e0151396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151396>
110. Podkowik, M., Park, J. Y., Seo, K. S., Bystron, J., & Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 163(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005>
111. Chin, D., Deecker, S. R., Ensminger, A. W., & Heinrichs, D. E. (2021). Draft genome sequence of *Staphylococcus chromogenes* ATCC 43764, a coagulase-

negative *Staphylococcus* strain with antibacterial potential. *Microbiology Resource Announcements*, 10(28), e00492-21. <https://doi.org/10.1128/mra.00492-21>

112. O’Keefe, K. (2025). *Diversity, genomics and antimicrobial resistance of coagulase-negative Staphylococcus: A literature review* [Master’s thesis, University at Albany, State University of New York]. Scholars Archive.

113. Hantsis-Zacharov, E., Senderovich, Y., & Halpern, M. (2008). *Chryseobacterium bovis* sp. nov., isolated from raw cow’s milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(5), 1024–1028. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65582-0>

114. Hantsis-Zacharov, E., Senderovich, Y., & Halpern, M. (2008). *Chryseobacterium bovis* sp. nov., isolated from raw cow’s milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(5), 1024–1028. (Duplicate entry).

115. Mills, S., Ross, R. P., & Coffey, A. (2011). Lactic acid bacteria: *Lactococcus lactis*. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed., pp. 132–137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00266-1>

116. Yuk, K.-J., Kim, Y.-T., Huh, C.-S., & Lee, J.-H. (2018). *Lelliottia jeotgali* sp. nov., isolated from a traditional Korean fermented clam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(5), 1725–1731. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002737>

117. Osei, R., Yang, C., Wei, L., Jin, M., & Boamah, S. (2022). Effects of combined application of salicylic acid and proline on the defense response of potato tubers to newly emerging soft rot bacteria (*Lelliottia amnigena*) infection. *Sustainability*, 14(15), 8870. <https://doi.org/10.3390/su14158870>

118. Birlutiu, V., Birlutiu, R.-M., & Dobritoiu, E. S. (2023). *Lelliottia amnigena* and *Pseudomonas putida* coinfection associated with a critical SARS-CoV-2 infection: A case report. *Microorganisms*, 11(9), 2143. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092143>

119. Liu, L., Lan, R., Liu, L., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., & Xu, J. (2017). Antimicrobial resistance and cytotoxicity of *Citrobacter* spp. in Maanshan Anhui Province, China. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1357. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01357>
120. Brenner, D. J., O'Hara, C. M., Grimont, P. A., Janda, J. M., Falsen, E., Aldova, E., Ageron, E., Schindler, J., Abbott, S. L., & Steigerwalt, A. G. (1999). Biochemical identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of *Citrobacter gillenii* sp. nov. and *Citrobacter murlinae* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(8), 2619–2624. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.8.2619-2624.1999>
121. Brenner, D. J., Grimont, P. A. D., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Ageron, E., & Riddle, C. F. (1993). Classification of citrobacteria by DNA hybridization: Designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(4), 645–658. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-4-645>
122. Cho, G.-S., Stein, M., Bockelmann, W., Neve, H., Brinks, E., & Franz, C. M. A. P. (2019). Draft genome sequence of *Citrobacter gillenii* MBT-C3, isolated from lamb's lettuce. *Microbiology Resource Announcements*, 8(1), e01177-18. <https://doi.org/10.1128/mra.01177-18>
123. Oliver, S. P., Pighetti, G. M., & Almeida, R. A. (2011). Mastitis pathogens: Environmental pathogens. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed., pp. 415–421). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00301-0>
124. Sinnott-Stutzman, V., & Sykes, J. E. (2021). Gram-negative bacterial infections. In J. E. Sykes (Ed.), *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat* (5th ed., pp. 643–654). Elsevier.

125. Reyes, F., Singh, N., Anjuman-Khurram, N., Lee, J., & Chow, L. (2017). *Strongyloides* Hyperinfection Syndrome causing fatal meningitis and septicemia by *Citrobacter koseri*. *IDCases*, 10, 102–104. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2017.09.005>
126. Liu, L., Zhang, L., Zhou, H., Yuan, M., Hu, D., Wang, Y., Sun, H., Xu, J., & Lan, R. (2021). Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Citrobacter* spp. causing extraintestinal infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 737636. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.737636>
127. Doran, T. I. (1999). The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: Review. *Clinical Infectious Diseases*, 28(2), 384–394. <https://doi.org/10.1086/515106>
128. Chowdhry, S. A., & Cohen, A. R. (2012). *Citrobacter* brain abscesses in neonates: Early surgical intervention and review of the literature. *Child's Nervous System*, 28, 1715–1722. <https://doi.org/10.1007/s00381-012-1746-4>
129. Brenner DJ, Grimont PA, Steigerwalt AG, Fanning GR, Ageron E, Riddle CF (1993) Classification of citrobacteria by DNA hybridization: designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol* 43:645–658.
130. Feferbaum, R., Diniz, E. M., Valente, M., Giolo, C. R., Vieira, R. A., Galvani, A. L., Ceccon, M. E., Araujo, M. C., Krebs, V. L., & Vaz, F. A. (2000). Brain abscess by *Citrobacter diversus* in infancy: Case report. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 58(3A), 736–740. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2000000400023>
131. Hashiguchi, M., Sugi, S., Mizuno, Y., Hoshinoo, K., Kokuho, T., & Shibahara, T. (2023). *Citrobacter koseri* related abortion and fetal septicemia in cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 85(10), 1094–1098. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0199>
132. Koleri, J., Petkar, H. M., Husain, A. A. M., Almaslamani, M. A., & Omrani, A. S. (2022). *Moraxella osloensis* bacteremia, a case series and review of the literature. *IDCases*, 28, e01450. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2022.e01450>

133. Bøvre, K., Hagen, N., Berdal, B. P., & Jantzen, E. (1977). Oxidase positive rods from cases of suspected gonorrhoea. A comparison of conventional, gas chromatographic and genetic methods of identification. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*, 85B(1), 27–37. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1977.tb00341.x>

134. Han, X. Y., & Tarrand, J. J. (2004). *Moraxella osloensis* blood and catheter infections during anticancer chemotherapy: Clinical and microbiologic studies of 10 cases. *American Journal of Clinical Pathology*, 121(4), 581–587. <https://doi.org/10.1309/8XDJ-6D3X-76MG-QD7K>

135. Purcell, C., Moolman, N., MacKay, C., Hatchette, T. F., Trites, J., Taylor, S. M., & et al. (2019). Bacterial contamination of surgical loupes and headlights. *The Journal of Laryngology & Otology*, 133(5), 436–440. <https://doi.org/10.1017/S002221511900060X>

136. Bennett, S. N., McNeil, M. M., Bland, L. A., Arduino, M. J., Villarino, M. E., Perrotta, D. M., & et al. (1995). Postoperative infections traced to contamination of an intravenous anesthetic, propofol. *New England Journal of Medicine*, 333(3), 147–154. <https://doi.org/10.1056/NEJM199507203330304>

137. Guan, T., Fu, S., Wu, X., Yu, H., & Liu, Y. (2024). Bioturbation effect of artificial inoculation on the flavor metabolites and bacterial communities in the Chinese Mao-tofu fermentation. *Food Chemistry: X*, 21, 101133. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101133>

138. Chessa, L., Daga, E., Dupré, I., Paba, A., Fozzi, M. C., Dedola, D. G., & Comunian, R. (2023). Biodiversity and safety: Cohabitation experimentation in undefined starter cultures for traditional dairy products. *Fermentation*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010029>

139. Han, M., Wu, Y., Guo, X., Jiang, L., Wang, X., & Gai, Z. (2022). Milk fermentation by monocultures or co-cultures of *Streptococcus thermophilus* strains. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1097013. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1097013>

140. Suresh, V., James, L., Beena, A. K., Sudhakaran, V. A., & Divya, M. P. (2023). Isolation, identification and characterization of thermotolerant psychrotrophic bacteria from market samples of pasteurized milk collected from Mannuthy, Kerala State, India. *Asian Food Science Journal*, 22(4), 10–23. <https://doi.org/10.9734/afsj/2023/v22i4628>
141. Ribeiro Júnior, J. C., Peruzzi, G. A. S., Bruzaroski, S. R., Tamanini, R., Lobo, C. M. O., Alexandrino, B., Conti, A. C. M., Alfieri, A. A., & Beloti, V. (2019). Short communication: Effect of bactofugation of raw milk on counts and microbial diversity of psychrotrophs. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 7794–7799. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16148>
142. Farkye, N. Y. (2004). Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 91–98. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00146.x>
143. Gésan-Guiziou, G. (2010). Removal of bacteria, spores and somatic cells from milk by centrifugation and microfiltration techniques. In *Improving the Safety and Quality of Milk* (pp. 349–372). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845699420.4.349>
144. Stack, A., & Sillen, G. (1998). Bactofugation of liquid milks. *Nutrition & Food Science*, 98(5), 280–282. <https://doi.org/10.1108/00346659810224217>
145. Lauková, A., Pogány Simonová, M., Kubašová, I., Miltko, R., Bełżecki, G., & Strompfová, V. (2018). Sensitivity to antimicrobials of faecal *Buttiauxella* spp. from roe and red deer (*Capreolus capreolus*, *Cervus elaphus*) detected with MALDI-TOF mass spectrometry. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 21(3), 543–547. <https://doi.org/10.24425/124288>
146. Melas, D. S., Papageorgiou, D. K., & Mantis, A. I. (1999). Enumeration and confirmation of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, and *Aeromonas sobria* isolated from raw milk and other milk products in Northern Greece. *Journal of Food Protection*, 62(5), 463–466. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.5.463>
147. Dubey, S., Ager-Wick, E., Pen, B., Evensen, Ø., Sørum, H., & Mweemba Munang'andu, H. (2022). Characterization of virulence and antimicrobial

resistance genes in *Aeromonas media* SD/21–15 isolated from marine sediments in comparison with other *Aeromonas* species. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1022639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1022639>

148. Allen, D. A., Austin, B., & Colwell, R. R. (1983). *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(3), 599–604. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-3-599>

149. Singh, D. V. (2000). A putative heat-labile enterotoxin expressed by strains of *Aeromonas media*. *Journal of Medical Microbiology*, 49(8), 685–689. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-8-685>

150. Pablos, M., Huys, G., Cnockaert, M., Rodríguez-Calleja, J., Otero, A., Santos, J. A., & et al. (2011). Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.006>

151. Singh, D. V. (2000). A putative heat-labile enterotoxin expressed by strains of *Aeromonas media*. *Journal of Medical Microbiology*, 49(8), 685–689. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-8-685>

152. Lü, A., Hu, X., Li, L., Sun, J., Song, Y., Pei, C., et al. (2016). Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of pathogenic *Aeromonas media* isolated from diseased koi carp (*Cyprinus carpio koi*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(2), 760–774.

153. Evangelista-Barreto, N. S., Vieira, R. H., Carvalho, F. C. T., Torres, R. C., Sant'Anna, E. S., Rodrigues, D. P., et al. (2006). *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48(3), 129–133. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000300003>

154. Hoel, S., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2017). Species distribution and prevalence of putative virulence factors in mesophilic *Aeromonas* spp. isolated

from fresh retail sushi. *Frontiers in Microbiology*, 8, 931. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00931>

155. Gardner, G. A. (1969). Physiological and morphological characteristics of *Kurthia zopfii* isolated from meat products. *Journal of Applied Bacteriology*, 32(3), 371–380. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1969.tb02241.x>

156. Kim, M. K., Kim, E. T., Kim, S. B., Jeong, H. Y., Park, B. Y., & Srinivasan, S. (2018). *Kurthia ruminicola* sp. nov., isolated from the rumen contents of a Holstein cow. *Journal of Microbiology*, 56(1), 36–41. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7359-x>

157. Mukhopadhyay, B. C., Mitra, S., Kazi, A., Mandal, S., & Biswas, R. (2019). Draft genome sequence of cold-tolerant *Kurthia gibsonii* B83, isolated from spinach leaf. *Microbiology Resource Announcements*, 8(3), e01480–18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01480-18>

158. Ongrádi, J., Stercz, B., Kövesdi, V., Nagy, K., & Chatlynne, L. (2014). Isolation of *Kurthia gibsonii* from non-gonorrheal urethritis: Implications for the pathomechanism upon surveying the literature. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 61(1), 79–87. <https://doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.1.7>

159. Dourou, D., Spyrelli, E. D., Doulgeraki, A. I., Argyri, A. A., Grounta, A., Nychas, G.-J. E., Chorianopoulos, N. G., & Tassou, C. C. (2021). Microbiota of chicken breast and thigh fillets stored under different refrigeration temperatures assessed by next-generation sequencing. *Foods*, 10(4), 765. <https://doi.org/10.3390/foods10040765>

160. Sjöblom, A. (2024). *Microbial composition of artisan starter cultures used in Swedish dairy products* [Master's thesis, Swedish University of Agricultural Sciences]. Scholars Archive.

161. Malta, R. C. R., Ramos, G. L. de P. A., & Nascimento, J. dos S. (2020). From food to hospital: We need to talk about *Acinetobacter* spp. *Germs*, 10(3), 210–217. <https://doi.org/10.18683/germs.2020.1197>

162. Tirloni, E., Stella, S., Celandroni, F., Mazzantini, D., Bernardi, C., & Ghelardi, E. (2022). *Bacillus cereus* in dairy products and production plants. *Foods*, 11(17), 2572. <https://doi.org/10.3390/foods11172572>
163. Sarba, E. J., Wirtu, W., Gebremedhin, E. Z., Borena, B. M., & Marami, L. M. (2023). Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157 isolated from cow milk and milk products, Ethiopia. *Scientific Reports*, 13(1), 15724. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43043-8>
164. Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., Salata, V. Z., Klymyk, V. T., Vorozhbit, N. M., & Rushchinskaya, T. M. (2021). *Staphylococcus aureus* of raw cow's milk. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 23(102), 53–59. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10208>
165. Lázaro-Díez, M., Navascués-Lejarza, T., Remuzgo-Martínez, S., Navas, J., Icardo, J. M., Acosta, F., Martínez-Martínez, L., & Ramos-Vivas, J. (2016). *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii* clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro. *Microbes and Infection*, 18(9), 559–564. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.05.002>
166. Nahar, A., Islam, A. K. M. A., Islam, M. N., Khan, M. K., Khan, M. S., Rahman, A. K. M. A., & Alam, M. M. (2023). Molecular characterization and antibiotic resistance profile of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from healthy cow raw milk in smallholder dairy farms in Bangladesh. *Veterinary World*, 16(6), 1333–1339. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.1333-1339>
167. Tyasningsih, W., Ramandinianto, S. C., Ansharieta, R., Witaningrum, A. M., Permatasari, D. A., Wardhana, D. K., Effendi, M. H., & Ugbo, E. N. (2022). Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from raw milk in East Java, Indonesia. *Veterinary World*, 15(8), 2021–2028. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2021-2028>
168. Iakubchak, O. M., Vivych, A. Y., Hryb, J. V., Danylenko, S. H., & Taran, T. V. (2024). Production and meat quality of broiler chickens with the use of

a probiotic complex of bifidobacteria and lactobacilli. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 15(3), 477–482. <https://doi.org/10.15421/022467>

169. Didouh, N., Khadidja, M., Campos, C., Sampaio-Maia, B., Boumediene, M. B., & Araujo, R. (2023). Assessment of biofilm, enzyme production, and antibiotic susceptibility of bacteria from milk pre- and post-pasteurization pipelines in Algeria. *International Journal of Food Microbiology*, 407, 110389. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110389>

170. Deb, R., Chaudhary, P., & De, S. (2022). CRISPR/Cas9 cassette targeting the *Escherichia coli* blaCTX-M specific gene of mastitis cow milk origin can alter the antibiotic resistant phenotype for cefotaxime. *Animal Biotechnology*, 34(5), 1849–1854. <https://doi.org/10.1080/10495398.2022.2053695>

171. Machado, M. A. M., Castro, V. S., da Cunha-Neto, A., Vallim, D. C., Pereira, R. de C. L., dos Reis, J. O., de Almeida, P. V., Galvan, D., Conte-Junior, C. A., & Figueiredo, E. E. de S. (2023). Heat-resistant and biofilm-forming *Escherichia coli* in pasteurized milk from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(2), 1035–1046. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00920-8>

172. Vovkotrub, V., Kołacz, R., Iakubchak, O., Vovkotrub, N., & Shevchenko, L. (2024). Effect of lactic acid bacteria ferment cultures on pork freshness. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 15(1), 48–65. <https://doi.org/10.31548/veterinary1.2024.48>

173. Statkevych, O. I., Kolomiets, Y. V., Holembovska, N. V., Israelian, V. M., Babych, O. A., Slobodyanyuk, N. M., Babytskiy, A. I., & Statkevych, A. O. (2024). Effects of nutrient medium on various-age larvae of *Hermetia illucens* (Diptera, Stratiomyidae). *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 15(4), 907–911. <https://doi.org/10.15421/0224131>

174. Wang, S., Yu, Z., Wang, J., Ho, H., Yang, Y., Fan, R., Du, Q., Jiang, H., & Han, R. (2021). Prevalence, drug resistance, and virulence genes of potential pathogenic bacteria in pasteurized Chinese fresh milk bar milk. *Journal of Food Protection*, 84(11), 1863–1867. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-094>

175. Madani, A., Esfandiari, Z., Shoaee, P., & Ataei, B. (2022). Evaluation of virulence factors, antibiotic resistance, and biofilm formation of *Escherichia coli* isolated from milk and dairy products in Isfahan, Iran. *Foods*, 11(7), 960. <https://doi.org/10.3390/foods11070960>
176. Drugea, R. I., Siteavu, M. I., & Băraițăreanu, S. (2023). Microbiological contamination of milk and the impact of bacterial strains on human health. *Revista Română de Medicină Veterinară*, 33(2), 55–68.
177. Lokes, S., Shevchenko, L., Doronin, K., Mykhalska, V., Israelian, V., Holembovska, N., Tverezovska, N., & Savchenko, O. (2024). Effect of starter cultures of lactic acid bacteria on microbiological parameters and shelf life of sausages. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 18, 935–950. <https://doi.org/10.5219/2012>
178. Nalepa, B., & Markiewicz, L. H. (2022). Microbiological diversity of regional cow's, goat's, and sheep's milk cheeses produced in Poland and the antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from them. *Animals*, 13(1), 168. <https://doi.org/10.3390/ani13010168>
179. de Campos, A. C. L. P., Puño-Sarmiento, J. J., Medeiros, L. P., Gazal, L. E. S., Maluta, R. P., Navarro, A., Kobayashi, R. K. T., Fagan, E. P., & Nakazato, G. (2018). Virulence genes and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from natural milk cheeses in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(2), 94–100. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2345>
180. Hammad, A. M., Eltahan, A., Hassan, H. A., Abbas, N. H., Hussien, H., & Shimamoto, T. (2022). Coliform and fecal coliform load and characterization of thermotolerant *Escherichia coli* in fresh raw milk cheeses. *Foods*, 11(3), 332. <https://doi.org/10.3390/foods11030332>
181. Rogoskii, I., Mushtruk, M., Titova, L., Snezhko, O., Rogach, S., Blesnyuk, O., Rosamaha, Y., Zubok, T., Yeremenko, O., & Nadtochiy, O. (2020). Engineering management of starter cultures in study of temperature of fermentation

of sour-milk drink with apiproducs. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 1047–1054. <https://doi.org/10.5219/1437>

182. Rosario, A. I. L. S., Castro, V. S., Santos, L. F., Lisboa, R. C., Vallim, D. C., Silva, M. C. A., Figueiredo, E. E. S., Conte-Junior, C. A., & Costa, M. P. (2021). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from pasteurized dairy products in Bahia, Brazil. *Journal of Dairy Science*, 104(6), 6535–6547. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19511>

183. Vovkotrub, V., Iakubchak, O., Vovkotrub, N., Shevchenko, L., Lebedenko, T., Holembovska, N., Pylypchuk, O., & Omelian, A. (2024). Quality and safety of pork after cooling and treatment with lactic acid starter cultures. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 18, 439–452. <https://doi.org/10.5219/1954>

184. Iakubchak, O., Martynenko, O., Taran, T., Pylypchuk, O., Naumenko, T., Tverezovska, N., Menchynska, A., & Stetsyuk, I. (2024). Analysis of the hard rennet cheese microbiota at different stages of the technological process. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 18, 899–918. <https://doi.org/10.5219/2011>

185. Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Popović, N., Tolinački, M., & Golić, N. (2021). Enterococci from raw-milk cheeses: Current knowledge on safety, technological, and probiotic concerns. *Foods*, 10(11), 2753. <https://doi.org/10.3390/foods10112753>

186. Azwai, S. M., Lawila, A. F., Eshamah, H. L., Sherif, J. A., Farag, S. A., Naas, H. T., Garbaj, A. M., Salabi, A. A. E., Gammoudi, F. T., & Eldaghayes, I. M. (2024). Antibacterial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* isolated from some dairy products in Libya as a foodborne pathogen. *Veterinary World*, 17(5), 1168–1176. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.1168-1176>

187. Garrouste-Orgeas, M., Marie, O., Rouveau, M., Villiers, S., Arlet, G., & Schlemmer, B. (1996). Secondary carriage of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in an adult intensive care unit: Relation to nosocomial

infections and mortality. *Journal of Hospital Infection*, 34(4), 279–289. [https://doi.org/10.1016/s0195-6701\(96\)90108-5](https://doi.org/10.1016/s0195-6701(96)90108-5)

188. Elbehiry, A., Marzouk, E., Moussa, I. M., Dawoud, T. M., Mubarak, A. S., Al-Sarar, D., Alsubki, R. A., Alhaji, J. H., Hamada, M., Abalkhail, A., A. Hemeg, H., & Zahran, R. N. (2021). *Acinetobacter baumannii* as a community foodborne pathogen: Peptide mass fingerprinting analysis, genotypic analysis of biofilm formation, and phenotypic pattern of antimicrobial resistance. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 1158–1166. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.052>

189. Dahiru, M., & Enabulele, O. (2015). *Acinetobacter baumannii* in birds' feces: A public health threat to vegetables and irrigation farmers. *Advances in Microbiology*, 5(10), 693–698. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.510072>

190. Sadvari, V. Y., Shevchenko, L. V., Slobodyanyuk, N. M., Tupitska, O. M., Gruntkovskiy, M. S., & Furman, S. V. (2024). Microbiome of craft hard cheeses from raw goat milk during ripening. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 15(3), 483–489. <https://doi.org/10.15421/022467>

191. Jovanovska, V. J., Sovreski, Z. S., Arapceska, M. A., Dimitrovska, G. D., Bojkovska, K. B., Joshevska, E. J., & Jovanovska, K. J. (2017). Devices for bactofugation in the function of providing quality long-life milk. *Banat's Journal of Biotechnology*, 8(15), 12–17. [https://doi.org/10.7904/2068-4738-viii\(15\)-12](https://doi.org/10.7904/2068-4738-viii(15)-12)

192. Rasheed, M. U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., & Jamil, K. (2014). Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(4), 341–346. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652014000400012>

193. Cullmann, W., & Dick, W. (1990). Influence of temperature on beta-lactamase production and outer membrane proteins in gram-negative rods. *Chemotherapy*, 36(4), 277–286. <https://doi.org/10.1159/000238778>

194. Liu, C., Sun, S., Sun, Y., Li, X., Gu, W., Luo, Y., Wang, N., & Wang, Q. (2024). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from food and clinical

environment in China from 2001 to 2020. *Science of The Total Environment*, 939, 173498. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173498>

195. Bukalova, N., Bohatko, N., & Prylipko, T. (2023). Problems of ecological safety of food products in Ukraine. In *Materials of the scientific-practical online conference "Food safety and quality in the 'One Health' concept"* (Lviv, June 1–2, 2023). NVLVET. <https://nvlvet.com.ua/index.php/conferences/issue/view/226>

196. Молочні продукти в Україні: споживання нижче норми, але категорія залишається стабільною. (2026, 11 лютого). *Економічна правда*. <https://epravda.com.ua/press/molochni-produkti-v-ukrajini-spozhiwannya-nizhche-normi-ale-kategoriya-zalishayetsya-stabilnoyu-817889/>

197. Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. *Molecules*, 23(4), 795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>

198. Indráková, A., Kovařovic, V., Schumann, P., Spröer, C., Králová, S., Šedo, O., Křištofová, L., Vrbovská, V., Füzik, T., Petráš, P., Zdráhal, Z., Ružicková, V., Doškař, J., & Pantuček, R. (2018). Description and comparative genomics of *Macrococcus caseolyticus* subsp. *hominis* subsp. nov., *Macrococcus goetzii* sp. nov., *Macrococcus epidermidis* sp. nov., and *Macrococcus bohemicus* sp. nov., novel *Macrococci* from human clinical material with virulence potential and suspected uptake of foreign DNA by natural transformation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1178. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01178>

199. Zhang, Y., Min, S., Sun, Y., Ye, J., Zhou, Z., & Li, H. (2022). Characteristics of population structure, antimicrobial resistance, virulence factors, and morphology of methicillin-resistant *Macrococcus caseolyticus* in global clades. *BMC Microbiology*, 22, 266. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02666-4>

200. Keller, J. E., Schwendener, S., Neuenschwander, J., Overesch, G., & Perreten, V. (2022). Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Macrococcus* spp. in food producing animals and meat in Switzerland in 2019.

Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 164(2), 153–164.
<https://doi.org/10.17236/sat00343>

201. Gómez-Sanz, E., Schwendener, S., Thomann, A., Gobeli Brawand, S., & Perreten, V. (2015). First staphylococcal cassette chromosome *mec* containing a *mecB*-carrying gene complex independent of transposon Tn6045 in a *Macrococcus canis* isolate from a canine infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), 4577–4583. <https://doi.org/10.1128/AAC.05064-14>

202. Schwendener, S., Cotting, K., & Perreten, V. (2017). Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Macrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. *Scientific Reports*, 7, 43794. <https://doi.org/10.1038/srep43794>

203. Zhang, Y., Min, S., Sun, Y., Ye, J., Zhou, Z., & Li, H. (2022). Characteristics of population structure, antimicrobial resistance, virulence factors, and morphology of methicillin-resistant *Macrococcus caseolyticus* in global clades. *BMC Microbiology*, 22, 266.

204. Karmali, M. A., Gannon, V., & Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011>

205. Little, C. L., Rhoades, J. R., Sagoo, S. K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K., & McLauchlin, J. (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*, 25(2), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.007>

206. Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppeggaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., & Cerf, O. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), 190–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових виданнях інших держав, включених до міжнародної наукометричної бази даних Scopus:

1. Iakubchak, O., **Martynenko, O.**, Taran, T., Pylypchuk, O., Naumenko, T., Tverezovska, N., Menchynska, A., & Stetsyuk, I. (2024). Analysis of the hard rennet cheese microbiota at different stages of the technological process. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 18, 899–918. <https://doi.org/10.5219/2011> (Iakubchak, O. розроблено програму і наукову концепцію дослідження, організовано проведення експериментів. Martynenko, O. виконано науковий експеримент, виконано ідентифікацію мікрофлори та її аналіз на різних етапах технологічного процесу, проаналізовано отримані результати та визначено їх наукову новизну й актуальність. Taran T. V. та Pylypchuk O. підготовлено матеріали для публікації та оформлено ілюстрації. Tverezovska N. здійснено статистичну обробку результатів. Naumenko T. проведено контроль якості зразків та їх підготовку для досліджень. Menchynska A. виконано лабораторний відбір та аналіз проб сиру. Stetsyuk I. підготовлено обговорення та висновки до статті).
2. Olha Iakubchak, **Olha Martynenko**, Tetiana Taran, Alina Menchynska, Mykola Nikolaenko, Oleksandr Savchenko, Yevheniia Marchyshyna, Alina Omelian (2025). Susceptibility of microflora to antibacterial drugs at different stages of hard rennet cheese production. *Scifood*, 19(1), 520-536. <https://doi.org/10.5219/scifood.58> (Iakubchak O. M. розроблено програму та концепцію дослідження, організовано проведення експериментів. Martynenko O. A. виконано науковий експеримент, виконано лабораторний аналіз мікроорганізмів на чутливість до антибактеріальних засобів, проаналізовано результати та визначено їх новизну й актуальність. Taran T. B. здійснено відбір та підготовку зразків сиру для аналізу мікрофлори. Menchynska A. та Nikolaenko M. проведено статистичну обробку результатів дослідження. Savchenko O. підготовлено і

оформлено таблиці та ілюстрації. Marchyshyna Y. виконано контроль якості досліджуваних зразків. Otelian A. підготовлено обговорення та висновки до статті).

Статті у наукових фахових виданнях України, які цитуються в міжнародних наукометричних базах:

1. Якубчак О. М., Мартиненко О. А., Таран Т. В. Мікробіологічний скринінг виробництва твердого сичужного сиру «Український» за використання технології MALDI-TOF. *Таврійський науковий вісник*. 2025. № 145. Ч. 2. С. 288–294. – DOI: <https://doi.org/10.32782/2226-0099.2025.145.2.32> (Якубчак О. М. розроблено програму та концепцію дослідження, організовано проведення експериментів. Мартиненко О. А. виконано науковий експеримент, проаналізовано отримані результати та визначено їх новизну й актуальність, виконано відбір та підготовку зразків сиру для мікробіологічного аналізу, проведено лабораторні дослідження. Таран Т. В. підготовлено результати для публікації).

Тези наукових доповідей

1. Якубчак О. М., Мартиненко О. А. Стійкість мікрофлори молока до антибіотиків у процесі виготовлення молочних продуктів. Продовольчі системи України: Повоєнне відновлення та забезпечення сталого розвитку: матеріали Міжнар. науково-практичного форуму, 15-16 травня 2024 р. Харків: ДБТУ, 2024. С. 54-57. (Мартиненко О. А. зроблено аналіз літературних джерел, підготовлено тези доповіді. Якубчак О. М. проведено науковий експеримент, проаналізовано результати та визначено стійкість мікрофлори молока до антибіотиків у процесі виготовлення молочних продуктів).

2. Мартиненко О. А., Якубчак О. М. Циркуляція мікроорганізмів, стійких до антибактеріальних засобів, під час виробництва молочних продуктів та ризик їх передачі до кінцевого продукту. Актуальні питання ветеринарної медицини: реалії та перспективи: збірник тез доповідей Міжнар. наук.-практ. конф. науковців, викладачів та аспірантів, 22 травня 2024 р.; Держ. біотехнологічний

ун-т. Харків, 2024. С. 216-219. (*Мартиненко О. А. проведено аналіз літературних джерел та підготовлено тези доповіді. Якубчак О. М. виконано науковий експеримент, проаналізовано результати та визначено ризики передачі мікроорганізмів до кінцевого продукту*).

3. Якубчак О. М., **Мартиненко О. А.** Циркуляція мікроорганізмів у процесі виробництва молочних продуктів та їх чутливість до антибіотиків. Збірник матеріалів за підсумками науково-практичної конференції «Актуальні питання сьогодення та післявоєнного відновлення сільського господарства й екології: експертно-аналітичні складові формування продовольчої стратегії України» з нагоди 20-річчя УЛЯБП АПК НУБіП України, 2 жовтня 2023 р.; К.: НУБіП України, 2023. 179 с. (*Якубчак О. М. виконано науковий експеримент, проаналізовано результати та визначено мікроорганізми, що циркулюють у процесі виробництва та встановлено їх чутливість до антибіотиків. Мартиненко О. А. проведено аналіз літературних джерел та підготовлено тези доповіді*).

4. Якубчак О. М., **Мартиненко О. А.** Ризик передачі антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів, які циркулюють у харчовому ланцюгу молочних продуктів. Матеріали Міжнародної конференції «Єдине здоров'я: соціальний вимір», 3 грудня 2024. – К.: НУБіП України, 2024 . – 73 с. (*Якубчак О. М. виконано науковий експеримент, проаналізовано результати та визначено ризик передачі антибіотикорезистентних штамів. Мартиненко О. А. проведено аналіз літературних джерел та підготовлено тези доповіді*).

5. Якубчак О. М., **Мартиненко О. А.** Оцінка впливу технологічних процесів на штами мікроорганізмів, що циркулюють у процесі виробництва молочних продуктів. Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., м. Одеса, 14–15 верес. 2023 р. Одеса, 2023. 200 с. (*Якубчак О. М. виконано науковий експеримент, проаналізовано отримані результати та визначено оцінку впливу технологічних процесів на штами мікроорганізмів. Мартиненко О. А. проведено аналіз літератури та підготовлено тези доповіді*).