

В диссертационный совет
Д 006.021.02 при ФГБНУ
«Федеральный научный
центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН
109316. г. Москва, ул. Талалихина, 26

ОТЗЫВ

Официального оппонента доктора технических наук, профессора Ишевского Александра Леонидовича на диссертационную работу Юшиной Юлии Константиновны «Научные основы реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности мясной продукции», представленную на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности: 05.18.04 - Технология мясных, молочных, рыбных продуктов и холодильных производств.

На отзыв предоставлены диссертация и автореферат

Актуальность темы выполненной работы

Антропогенные воздействия на окружающую среду «форсировали» эволюцию микробов и привели к появлению среди традиционных контаминаントов продовольственного сырья и пищевых продуктов штаммов с измененными свойствами, резистентных к воздействию окружающей среды, к антибиотикам, с дополнительными факторами патогенности, чем в настоящее время объясняется всё возрастающее количество так называемых «эмерджентных» (возникающих неожиданно) инфекций от пищи. По этой причине диссертационная работа Ю.К. Юшиной, связанная с комплексным подходом к изучению микробиома пищевых производств, базирующимся на использовании расширенного микробного профилирования, актуальна и своевременна.

Актуальность и значимость темы диссертационной работы, отнесение ее к числу фундаментальных и поисковых научных исследований подтверждается также тем, что данная тематика поддержана грантом РНФ № 075-15-2020-775.

Основное содержание работы

Представленная к защите диссертационная работа имеет традиционную структуру и состоит из введения, семи глав, заключения, списка литературы и приложения.

Общий объем диссертации включает 324 страницы, 74 рисунка, 50 таблиц, 283 использованных источников. В приложении представлены документы, подтверждающие внедрение основных результатов диссертационной работы. Автореферат включает 45 страниц, достаточно полно отражает содержание работы, реализацию задач для достижения поставленной цели, с логичным завершением

представленными выводами. Содержание работы полностью отражено в публикациях автора.

Список использованных источников литературы включает 283 наименований, из которых 226 – иностранных. Приложения к диссертации содержат методические рекомендации по определению патогенных микроорганизмов, стандарт, методические рекомендации по повышению пищевой безопасности, методика создания моделей моно- и мультивидовых биопленок грамотрицательных и грамположительных бактерий, подтверждающие научную новизну и практическую значимость результатов исследования.

Во введении отражена актуальность заявленной работы, представлена ее научная и практическая значимость. Изложены цель и задачи исследования, указан личный вклад и приведены сведения об апробации работы.

В первой главе диссертационной работы проведен обзор научно-технической отечественной и зарубежной литературы, проанализированы публикации, посвященные актуальным вопросам циркуляции пищевых патогенов, в том числе в составе биопленок, рассмотрены вопросы дезинфекции на пищевых предприятиях, роли биопленок в контаминации объектов производства.

В второй главе на основе, анализа, обобщения и систематизации научной информации диссертантом обоснованы направления исследований, определены методы для выполнения этапов анализа и приведен алгоритм проведения расширенного микробиологического профилирования предприятий.

В третьей главе проведена апробация молекулярных методов определения патогенов, циркулирующих в производственной среде. Показана их высокая эффективность и целесообразность использования при оценке циркуляции патогенных микроорганизмов.

В четвертой главе представлены результаты изучения микробного сообщества абиотических и биотических объектов производственной среды предприятий мясной и птицеперерабатывающей промышленности. Представлены результаты сезонных изменений микробных сообществ, а также изучения контаминация абиотических и биотических объектов отдельными патогенными микроорганизмами, продемонстрирована молекулярно-генетическая взаимосвязь патогенных микроорганизмов.

Полученные данные позволяют изменить подходы к дезинфекции объектов производственной среды, а именно усилить санитарные мероприятия в теплое время года. Проведенные исследования показали эффективность комплексного подхода в определении разнообразия пищевых патогенов

В пятой главе приведены результаты изучения таксономического состава и структурной организации пищевых биопленок, отобранных в разных цехах мясоперерабатывающего и птицеперерабатывающего

предприятия с поверхности технологического оборудования и помещений. Метагеномный анализ показал высокую таксономическую сходность микроорганизмов, доминирующих в разных образцах. Среди биопленочных контаминаントов были обнаружены бактерии, вызывающие порчу мясных, рыбных и молочных продуктов и способные к биопленкообразованию.

Представлены исследования микробиоты нативных БП абиотических объектов производственной среды технологического, вспомогательного оборудования, инвентаря и конструкций как в зависимости от сезона, так и в зависимости от функции и места в производственной цепи. Получены новые данные о сходстве/различии видового состава микробиоты биопленок по сезонам

В шестой главе изучена устойчивость биопленок к воздействию дезинфектантов, полимерных комплексов и физических методов. Практически значимыми, являются результаты исследований эффективности некоторых промышленных дезинфектантов в отношении биопленок микроорганизмов. До настоящего времени такие исследования проводились относительно планктонных форм микроорганизмов. Применение наиболее часто используемых на пищевых производствах дезинфектантов в обычных концентрациях является неэффективным против биопленочного сообщества. Продемонстрирована перспективность использования физических методов воздействия как на планктонные, так и на биопленочные сообщества микроорганизмов. Получены данные апробации метода аппликационного лазерного переноса НЧ металлов серебра и меди на поверхность биопленок, показана его эффективность. В результате воздействия полностью уничтожается бактериальная БП независимо от степени зрелости и не зависимо от поверхности, на которой биопленка была сформирована.

В седьмой главе показана и научно обоснована необходимость изменения подходов к обеспечению гигиены микробиологической безопасности на предприятиях мясной и птицеперерабатывающей промышленности. В работе предложено использование нового термина реинжиниринг процедур обеспечения микробиологической безопасности пищевого производства (предприятия). Применение этого термина к процессам обеспечения микробиологической безопасности представляется чрезвычайно своевременным. В настоящее время традиционно существовавшая практика применения гигиенических процедур на пищевых предприятиях требует, в свете полученных новых знаний о микробных сообществах, радикального переосмыслиния и перепроектирования.

Представлены поэтапные решения для реализации реинжиниринга, в основе которого лежит методология проведения расширенного микробиологического профилирования пищевого предприятия для детализации циркулирующих микроорганизмов, в том числе в составе

биопленок.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Обоснованность научных положений и выводов работы Юшиной Ю.К. обусловлена глубоким анализом современной научной литературы, данных предшествующих исследований по теме диссертации, достаточном объеме экспериментальных данных. Работа выполнена на хорошем методическом уровне с использованием современных методов исследования, в том числе с использованием современных молекулярных методов анализа. Научные положения и выводы подтверждены результатами, полученными в ходе диссертационного исследования, а также положительной апробацией результатов в лабораторных условиях и широким обсуждением на научно-практических международных конференциях и круглых столах.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов достигается обоснованной методологией и выбранными методами исследований, формулированием рабочей гипотезы и определением задач исследований, разработкой научной концепции реализации рабочей гипотезы, проведением исследований с применением общепринятых стандартизованных и оригинальных методов оценки качества сырья, полуфабрикатов и продуктов.

Основные положения диссертации опубликованы в 59 печатных работах, в том числе в 32 статьях в периодических изданиях, рецензируемых ВАК Министерства науки и высшего образования, в 12 статьях (4 из которых в высокорейтинговых изданиях первого и второго квартиля) в международных изданиях, входящих в научометрические базы Scopus и Web of Science. Получен 1 патент Российской Федерации на изобретение.

Обоснованность и достоверность выполненных исследований подтверждены результатами практической реализации разработанной теоретических и практических методов при выполнении фундаментальных научных исследований в рамках Гранта от 28.09.2020 г. № 075-15-2020-775 (2020–2022 гг.) «Фундаментальные исследования перемещений патогенных микроорганизмов и вирусов в пищевых системах и создание инновационных средств их предотвращения, с использованием антимикробных материалов и физических методов воздействий на биологические объекты».

Научная новизна исследований заключается в том, что:

Впервые проведены комплексные исследования биопленочной и свободно циркулирующей микрофлоры пищевых производств, в результате которых установлена способность к образованию биопленок у циркулирующих в производственной среде микроорганизмов.

Изучена морфология и выявлена высокая гетерогенность по таксономическому разнообразию и по степени зрелости. Подтвержден микроколониальный рост бактерий в БП, описано нахождение бактерий в общей капсule-матриксе.

Впервые предложены подходы к оценке антимикробных свойств различных химических веществ и материалов относительно биопленок патогенных микроорганизмов пищевых систем на разных стадиях их развития (формирующиеся и сформированные), что является принципиально новым подходом при оценке эффективности антимикробных материалов (веществ).

Созданы новые подходы к организации производственного контроля и проведению санитарно-гигиенических мероприятий на предприятиях, способствующих эффективному предотвращению устойчивой циркуляции патогенных микроорганизмов, обоснованному сокращению применения дезинфицирующих средств; использованию новых материалов с антимикробными свойствами; уменьшению потерь в результате порчи продукции и обеспечению развития систем безопасности и качества пищевых производств.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Выполненные Юшиной Ю.К. исследования имеют теоретическое значение для пищевой, аналитической, биотехнологической и микробиологической отраслей науки. Заслуживает особого внимания разработанный алгоритм проведения реинжиниринга (полного переосмыслиния и перепроектирования) процедур обеспечения микробиологической безопасности мясной продукции.

Научные положения и материалы диссертационного исследования используются при проведении курсов повышения квалификации для специалистов мясной отрасли в Учебном центре ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, а также при подготовке магистерских и дипломных работ.

Разработанные принципы легли в основу новой редакции ГОСТ 32031 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria* (*Listeria* spp.)».

Разработано и апробировано 7 методических рекомендаций для определения патогенов. Разработанные методы внедрены более, чем на 15 предприятиях.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней»
Диссертационная работа Юшиной Ю.К. выстроена логично и состоит из введения, семи глав, заключения, списка литературы и приложения.

Список использованных источников литературы включает 283 наименований, из которых 226 – иностранных. Приложения к диссертации содержат методические рекомендации по определению

патогенных микроорганизмов, стандарт, методические рекомендации по повышению пищевой безопасности, методика создания моделей моно- и мульти- видовых биопленок грамм-отрицательных и грамм- положительных бактерий, подтверждающие научную новизну и практическую значимость результатов исследования.

Общий объем диссертации включает 324 страницы, 74 рисунка, 50 таблиц, 283 использованных источников. В приложении представлены документы, подтверждающие внедрение основных результатов диссертационной работы. Автореферат включает 40 страниц и достаточно полно отражает содержание работы, реализацию задач для достижения поставленной цели, с логичным завершением представленными выводами. Содержание работы полностью отражено в публикациях автора.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертация соответствует специальности 05.18.04 – «Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств».

Исследование, выполненное Юшиной Ю.К., является самостоятельной законченной работой, представляющей теоретический и практический интерес. Автором на достаточно высоком научном уровне используются различные подходы и методы обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций, изучаются и критически анализируются известные достижения и теоретические положения других исследователей по оценки эффективности пищевых продуктов и функциональных ингредиентов.

Объем анализируемого материала, методический уровень исследований полностью соответствуют поставленным задачам. Полученные выводы логически вытекают из аргументированных материалов, экспериментальных исследований, приведенных табличных данных, диаграмм и достоверной статистической обработки.

Диссертационная работа оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями, характеризуется логичностью и завершенностью исследований.

Диссертация и автореферат по содержанию, структуре и объему соответствуют требованиям «Положения о присуждении ученых степеней».

При общей положительной оценке работы, при ознакомлении с диссертационной работой возникли некоторые замечания и пожелания по тексту работы и автореферата.

- «Из образцов, отобранных с предприятия II (птицекомбинат), было выделено и отобрано 98 колоний микроорганизмов с различными фенотипическими признаками. Методом время пролётной масс-спектрометрии MALDI-Tof-MS они были идентифицированы и установлено более 58 различных видов микроорганизмов (табл. 17)».

Для чего необходимо было получать отдельные колонии для дальнейшей идентификации? Почему нельзя было охарактеризовать микробное сообщество только по таксономическому составу, результаты которого также были приведены в работе?

- Диссертантом установлено, что высокие значения КМАФАнМ на уровне 4-6 log₁₀ КОЕ/см² на вспомогательном оборудовании наблюдались как в грязной, так и в чистой зонах. Как можно объяснить данные результаты?

- Вызывают озабоченность данные о том, что на объектах производственной среды обнаружены малоизученные, редкие, неконтролируемые и трудно культивируемые патогены, в том числе *Rhizobium radiobacter*, *Moraxella osloensis*, *Acinetobacter* spp., которые могут являться возбудителями инфекционных заболеваний у человека. Чем можно объяснить присутствие данных микроорганизмов? Несомненно, в дальнейшем этой проблеме необходимо уделить пристальное внимание

- На стр.98 диссертации приведены результаты чувствительности и специфичности метода LAMP, однако хотелось бы видеть примеры расчетов, позволяющие оценить их правильность

- Имеются отдельные недостатки, связанные с оформлением диссертации. Так, в тексте на стр274 отсутствует номер рисунка, о котором говорится в тексте; встречаются неточности в указании ссылок на методы («для определения островков патогенности SPIFinder 2.0 (XXXXX)»).

- Большая часть изолированных и изученных сапротрофов относились к микроорганизмам порчи, таким как *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Pseudomonas* spp., в том числе обладающим способностью к биопленкообразованию. Было отмечено, что предприятия различались по количеству случаев обнаружений данных микроорганизмов, однако имели и сходные особенности. Чем можно объяснить данные различия? В связи с этим, могут ли обобщенные данные исследования использоваться при организации производственного контроля на других предприятиях?

- Считается, что культивировать в стандартных лабораторных условиях удается менее 1 % из них. Сравнительное исследование таксономического состава микробных сообществ предприятий метагеномным методом, основанным на анализе разнообразия молекулярных маркеров (наиболее распространенным является последовательность гена 16 S) подтвердило это утверждение. Каковы перспективы использования данного метода в практике предприятий?

Высказанные замечания не являются принципиальными, носят дискуссионный характер и не снижают теоретическую и практическую ценность выполненных Юшиной Ю.К. диссертационных исследований.

Заключение по диссертационной работе

Диссертация Юшиной Ю.К. «Научные основы реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности мясной продукции» является завершенной научно-исследовательской работой, теоретические положения и практические рекомендации которой можно квалифицировать как значимые научные достижения для решения важных социально-экономических задач. Оппонируемая работа по актуальности, объему проведенных исследований, научно - методическому уровню и полученным результатам соответствует паспорту научной специальности 05.18.04 - «Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств» и пунктам 9-11, 13 и 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013г. (ред. от 01.10.2018г., с изм. от 26.05.2020, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 05.18.04 «Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств».

Доктор технических наук, профессор,
ординарный доцент факультета
биотехнологий Федерального
государственного автономного
образовательного учреждения высшего
образования «Национальный
исследовательский университет ИТМО»,
доктор технических наук по научной
специальности 05.18.04 – «Технология
мясных, молочных и рыбных продуктов и
холодильных производств»

Ишевский Александр
Леонидович

Сведения об организации
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр.,
д. 49, лит. А. Номер телефона: +7 (812) 315-23-81
Электронная почта: alishevskii@itmo.ru

Подпись Ишевский Александр Леонидович
Заверяю

Подпись Ишевского
удостоверяю
Менеджер ОПС
Гарькина В.А.

29 04

