

В диссертационный совет Д 006. 021.02
при ФБГНУ «Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
109316, Москва, ул. Талалихина, 26

ОТЗЫВ
официального оппонента, доктора технических наук,
профессора Рябцевой Светланы Андреевны
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 и рыбных
продуктов и холодильных производств

Актуальность темы диссертационной работы

Актуальность темы работы обусловлена необходимостью совершенствования и поиска новых методов обеспечения микробиологической безопасности пищевых продуктов. Тема работы полностью соответствует «Стратегии повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года», одной из приоритетных задач которой является расширение перечня показателей безопасности пищевой продукции в целях контроля новых потенциально опасных контаминаントов химической и биологической природы, содержащихся в пищевой продукции.

Особое значение имеет обеспечение микробиологической безопасности мяса и мясных продуктов, так как они могут быть источниками опасных, т.н. «приоритетных» патогенных бактерий. При этом большую роль играет способность бактерий к формированию биопленок на поверхности оборудования и продуктов, в которых они могут приобретать повышенную устойчивость к факторам внешней среды. Во всем мире наблюдается рост количества научных исследований, направленных на поиск принципиально новых методов в борьбе с устойчивыми патогенными и условно-патогенными бактериями, в том числе в составе биопленок. В нашей стране существует потребность в пересмотре инструкций по санитарной обработке и дезинфекции оборудования пищевых предприятий на основе комплексного подхода, сочетающего использование антимикробных материалов и биоцидных покрытий, физических, химических и биохимических методов обработки, ингибирующих микробную контаминацию объектов производственной среды.

В связи с этим исследования, направленные на обоснование и разработку научных основ для проведения реинжиниринга (радикального переосмыслиния и перепроектирования) процедур обеспечения микробиологической безопасности мясной продукции, являются

своевременными и необходимыми. Актуальность и значимость темы диссертационной работы Юшиной Ю.К. подтверждается также тем, что данное направление исследований поддержано грантом РНФ № 075-15-2020-775.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Высокая степень обоснованности научных положений и выводов работы Юшиной Ю.К. обусловлена глубоким анализом современной научной литературы, данных предшествующих исследований по теме диссертации, большим объемом экспериментальных данных и тщательным их анализом. Работа выполнена на хорошем методическом уровне с использованием современных методов исследования, в том числе с использованием молекулярно-генетических методов анализа: метода петлевой изотермической амплификации (LAMP), масс-спектрометрического метода MALDI-Tof-Ms, метода высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК и др., полученные данные обрабатывали с помощью методов биоинформатики. Сформулированные в диссертации выводы соответствуют полученным результатам исследований. Основные положения работы в достаточной степени апробированы, обсуждены в научном сообществе, разработанные методики и рекомендации проверены в условиях мясоперерабатывающих предприятий.

Достоверность полученных результатов исследований

Достоверность полученных результатов подтверждается обоснованной методологией и выбранными методами исследований, формулированием рабочей гипотезы и определением задач исследований, разработкой научной концепции реализации рабочей гипотезы, проведением исследований с применением общепринятых стандартных методов исследований, а также применением современных методов планирования экспериментов и статистической обработки экспериментальных данных.

Полученные результаты были широко опубликованы и обсуждены в научном сообществе, в т.ч. на международных и всероссийских форумах, научно-практических конференциях и семинарах. Основные положения диссертации опубликованы в 59 печатных работах, в том числе в 32 статьях в периодических рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования, 12 статьях в международных изданиях, входящих в научометрические базы Scopus и Web of Science (в т.ч. 4 – в высокорейтинговых изданиях первого и второго квадриля).

Обоснованность и достоверность результатов исследований подтверждены результатами практической реализации разработанной теории и методов при выполнении фундаментальных научных исследований в рамках Гранта от 28.09.2020 г. № 075-15-2020-775 (2020–2022 гг.).

Новизна полученных результатов исследований

Новизна работы Юшиной Ю.К. определяется несколькими аспектами. Прежде всего, соискателем обоснована и разработана методология проведения расширенного микробиологического профилирования предприятий для детализации сообществ циркулирующих микроорганизмов, в том числе в составе биопленок. 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.

К новым результатам можно отнести и данные, полученные при исследовании биопленок на пищевых предприятиях Российской Федерации. Изучена морфология и выявлена высокая гетерогенность биопленок по таксономическому разнообразию и по степени зрелости. Получена новая информация о закономерностях образования, видовом составе биопленок и устойчивости к дезинфектантам. Впервые предложены подходы к оценке antimикробных свойств различных химических веществ и материалов по отношению к биопленкам патогенных микроорганизмов пищевых систем на разных стадиях их развития.

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

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Автором диссертационной работы получены данные, которые вносят значимый вклад в науку не только о переработке мяса и получении мясных продуктов, но и пищевую микробиологию в целом. Теоретическая значимость диссертационной работы обусловлена разработкой новой методологии определения микробиоты пищевых производств.

В результате проведенной работы научно обоснована необходимость изменения подходов к обеспечению микробиологической безопасности на предприятиях мясной и птицеперерабатывающей промышленности. Особого внимания, как с точки зрения теории, так и практики, заслуживает разработанная доктором схема реинжиниринга (радикального переосмыслиния и перепроектирования) процедур обеспечения микробиологической безопасности пищевых предприятий.

Охарактеризована микробиота объектов производственной среды, в том числе в составе биопленок, исследованы закономерности выявления патогенных микроорганизмов в сезонной динамике. Разработана методология

идентификации, сбора и оценки наличия биопленочного фенотипа микробных контаминаントов пищевого производства с учетом выполненных исследований и обобщения литературных данных. На основании проведенных исследованы оформлены методические рекомендации: МР 784-00419779-2021 «Методика создания моделей моно- и мультивидовых биопленок грамотрицательных и грамположительных бактерий»; МР 4.2.0161-19 «Методы индикации биологических пленок микроорганизмов на абиотических объектах».

Разработанная концепция микробиологического профилирования апробирована при проведении работ на ряде предприятий. Разработанные принципы легли в основу новой редакции ГОСТ 32031 - 2011 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria* (*Listeria* spp.)».

Разработано и апробировано 7 методических рекомендаций определения патогенов, которые внедрены на предприятиях пищевой промышленности.

Полученные результаты использованы при разработке Инструкций по применению дезинфицирующий средств для санитарной обработки оборудования и помещений на предприятиях мясной промышленности

Результаты исследований используются при проведении курсов повышения квалификации для специалистов мясной отрасли, а также при подготовке магистерских и дипломных работ студентов ВУЗов.

Структура диссертации и автореферата, оценка содержания

Диссертационная работа Юшиной Ю.К. оформлена в классическом стиле и состоит из введения, семи глав, заключения, списка литературы и приложений. Общий объем диссертации включает 324 страницы, 74 рисунка, 50 таблиц. Список использованных источников включает 283 наименования, из которых 226 – иностранных.

Во введении обоснована актуальность работы и представлены основные положения: разработанность темы; цель и задачи исследования; научная новизна; методология и методы работы; теоретическая и практическая значимость; положения, выносимые на защиту; степень достоверности; апробация результатов; публикации; структура и объем работы; личный вклад автора; благодарности. Следует отметить, что работа выполнена в период с 2010 г. по 2021 г. лично диссертантом и при его прямом участии. При этом диссертант осуществлял все этапы выполнения диссертационной работы: обоснование актуальности работы и выбор направления научных исследований, формулирование рабочей гипотезы и научной концепции, постановка цели и задач исследований, планирование, разработка методических походов и проведение экспериментов, обработка полученных данных и их анализ, практическая реализация результатов исследований, в том числе разработка различных видов документации и её апробация в промышленности, внедрение результатов исследований в образовательный процесс.

Первая глава посвящена анализу информации по проблематике микробиологической безопасности мясной продукции. Особую ценность представляет сравнение основных тенденций исследований в этой области в России и за рубежом. Показано, что интерес отечественных исследователей в основном направлен на выявление патогенов в пищевых продуктах и на санитарное состояние производства, а за рубежом большая часть исследований посвящена выявлению путей контаминации пищевых продуктов и ранней идентификации патогенов. Приведенные диаграммы распределения публикаций по темам и годам подтверждают актуальность темы диссертации.

В обзоре литературы рассмотрены вопросы распространенности пищевых инфекций, связанных с потреблением мяса и мясной продукции, санитарно-гигиенические процедуры на пищевых предприятиях, основные дезинфицирующие средства для санитарной обработки на предприятиях мясной промышленности. Большое внимание уделено вопросам образования, строения и свойств биопленок, которые представляют колоссальную опасность для мясной промышленности и определяют необходимость совершенствования процедур обеспечения микробиологической безопасности. Глубокий анализ литературы позволил диссидентанту четко сформулировать концепцию, гипотезу, цель и задачи работы.

Во второй главе изложена методология выполнения работы, показана ее организационно-иерархическая структура, приведено описание объектов и методов исследований, применяемых в работе. Особо хотелось бы отметить разработанную диссидентантом методологию идентификации микробиоты пищевых предприятий, а также информативное описание методов и объектов исследований на разных этапах работы, которое позволяет оценить огромный объем выполненных экспериментов.

В третьей главе приведены результаты апробации молекулярных методов определения патогенов, циркулирующих в производственной среде. Результаты оценки чувствительности и специфичности метода LAMP, высокая сходимость полученных результатов с референс-методами доказали эффективность этого метода при исследовании мясной продукции и объектов производственной среды предприятий для выявления пищевых патогенов *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp. и *Salmonella* spp. Полученные результаты позволяют внедрить в практику микробиологических исследований данный метод, что имеет большое значение для обеспечения безопасности выпускаемой продукции.

В четвертой главе представлены результаты изучения микробного сообщества абиотических и биотических объектов производственной среды.

Результаты исследования абиотических объектов производственной среды показали, что значительные разбросы по степени контаминации наблюдались для технологического, вспомогательного оборудования, инвентаря и конструкций как в зависимости от сезона, так и в зависимости

от функции и места в производственной цепи. Полученные данные позволяют изменить подходы к дезинфекции объектов производственной среды, а именно усилить санитарные мероприятия в теплое время года. Проведенные исследования показали эффективность молекулярно-генетических методов в определении разнообразия пищевых патогенов

В пятой главе приведены результаты изучения биопленочной микробной контаминации абиотических объектов производственной среды пищевого предприятия по сезонам. Установлено значительное биоразнообразие микрофлоры биопленок, которая включает как микроорганизмы порчи пищевых продуктов, так и патогенные микроорганизмы, в том числе редкие. Несмотря на проводимые на предприятии санитарно-гигиенические мероприятия, биопленки демонстрировали устойчивость к используемым на предприятии средствам дезинфекции.

Отличительными чертами проведенного исследования были: расширение спектра точек отбора образцов биопленок, включая нетривиальные и не подвергаемые ежедневной санитарной обработке места (потолок, ступень, колеса, ролики транспортеров, помещения с температурой ниже 0°C); электронно-микроскопическая оценка биопленок, степени их зрелости и функциональной активности (развитость матрикса, биоразнообразие морфотипов бактерий, их возрастная гетерогенность); сравнительный анализ структуры БП по сезонам.

В шестой главе представлены материалы по изучению устойчивости моно- и поливидовых биопленок, сформированных пищевыми патогенами и сапротрофами к воздействию дезинфектантов, полимерных комплексов и физических методов. Показано, что применение наиболее часто используемых на пищевых производствах дезинфицирующих веществ в обычных концентрациях не эффективно против биопленочного сообщества. Продемонстрировано, что метод аппликационного лазерного переноса наночастиц серебра и меди на поверхности биопленок можно использовать для инактивации бактериальных пленок, сформированных патогенными микроорганизмами.

В седьмой главе показана и научно обоснована необходимость изменения подходов к обеспечению гигиены микробиологической безопасности на предприятиях мясной и птицеперерабатывающей промышленности. В этой связи, была сформулирована, концептуально обоснована и разработана схема реинжениринга процедур обеспечения микробиологической безопасности, которая апробирована на пищевых предприятиях.

Заключение содержит основные выводы по работе, которые достаточно полно аргументированы материалом экспериментальных исследований, рядом табличных данных, диаграмм, достоверной статистической обработкой и логически вытекают из полученных данных.

В приложениях к диссертации приведены методические рекомендации по определению патогенных микроорганизмов, стандарт «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria* (*Listeria* spp.)», 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.

Исследование, выполненное Юшиной Ю.К., является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, обладающей новизной, представляющей теоретический и практический интерес. Автором на высоком научном уровне использованы различные подходы и методы обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций, полученные данные и закономерности сопоставлены с известными достижениями и теоретическими положениями других исследователей. В целом содержание диссертационной работы изложено в строгой логической последовательности и обладает внутренним единством, что соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней».

В автореферате представлены все необходимые положения, показаны наиболее важные результаты работы, подтверждающие выводы и рекомендации. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной работы. Автореферат и опубликованные работы достаточно полно отражают содержание диссертации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

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

Замечания по диссертационной работе.

При рассмотрении диссертации возникли следующие вопросы и замечания.

1. В обзоре литературы (глава 1, с. 23) сделан вывод о необходимости уделять большее внимание изучению *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* spp., *Brochothrix* spp. при исследовании мяса и мясной продукции отечественного производства. Однако далее, в разделе 1.1 в качестве возбудителей пищевых инфекций, связанных с потреблением мяса и мясной продукции, рассмотрены только возбудители листериоза, сальмонеллеза и кампилобактериоза.

2. Известно, что биоплёнки могут включать не только бактерии, но и эукариотические микроорганизмы, в т.ч. дрожжи и мицелиальные грибы. Упоминание об этом есть в обзоре литературы (раздел 1.4.1). Некоторые результаты диссертационной работы (стр. 111, табл. 14 – обнаружено присутствие *Rhodotorula minuta*, с. 109 – несколько видов *Candida zeylanoides*, *C. famata*, табл. 45 – в большинстве образцов классическими методами обнаружены представители *Ascomycota* и др.) подтверждают участие грибов в контаминации объектов пищевых предприятий, но данных об их участии в

формировании биопленок недостаточно. Возможно, в дальнейшем этому вопросу следует уделить больше внимания.

3. Диссертант установил, что в зимний период микробная контаминация объектов производственной среды была выше, чем в другие сезоны, а самая низкая – летом (с. 144), что объясняет повышенным уровнем санитарной гигиены в этот период. В то же время на с. 145 рекомендуется усилить санитарные мероприятия в теплое время года. Желательно более подробно пояснить представленные закономерности и рекомендации.

4. В работе имеются отдельные технические недоработки. Например, разное цветовое решение оформления диаграмм, на которых представлен таксономический состав микробных сообществ образцов (рис. 14 на с. 127, рис. 12 на с. 119, рис. 16 на с. 146) затрудняет сравнительный анализ этих данных. Кроме того, несоответствие некоторых подрисуночных подписей и обозначений на фотографии (рис. 26 на с. 192), отсылка к обозначению подписей на другом рисунке (рис. 29 на с. 195), отсутствие изображения Г (клетки с биокристаллизованным нуклеоидом) на рис. 51 (с. 218) осложняет подробное изучение и сопоставление интересных и объемных данных о формировании биопленок.

5. Особую тревогу вызывают данные о том, что количество готовых к употреблению мясных продуктов, контаминированных *L. monocytogenes*, увеличивается с каждым годом (с. 170). Желательно более подробно пояснить причины данного явления. Связано ли это со способностью этих патогенных бактерий участвовать в образовании биопленок, подробно изученных диссертантом (раздел 5.3)? Название рис. 58 (с. 241) «Формирование биопленки изолятами *Listeria spp...*» является неточным, так как на рисунке показана оптическая плотность окрашенных смывов с биопленок, которая косвенно характеризует их образование. Чем можно объяснить практически одинаковое формирование биопленок *L. monocytogenes* при температурах +4 и +37 °C?

6. Диссидентом проведено сравнительное исследование антибактериальных и антибиопленочных свойств наночастиц серебра, золота и меди, полученных методом лазерного переноса (раздел 6.2.1). Почему наночастицы наносили на биопленку, а не на подложку? Какими методами были получены данные, приведенные в табл. 46 (с. 263) «Антибактериальное воздействие НЧ металлов на БП, сформированные на различных поверхностях»? Как можно реализовать метод лазерного переноса на практике, в условиях предприятий?

Указанные вопросы и рекомендации носят дискуссионный характер, замечания не имеют принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Юшиной Ю.К.

Заключение по диссертации

Диссертация Юшиной Юлии Константиновны «Научные основы реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности

мясной продукции» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения и практические рекомендации для решения научной проблемы обеспечения микробиологической безопасности пищевых продуктов, имеющей важное социально-экономическое значение. Диссертация соответствует требованиям п. 9-11, 13 и 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Юшина Юлия Константиновна заслуживает присуждения ученой степени доктора технических наук по специальности 05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств.

Официальный оппонент,

доктор технических наук

по специальности 05.18.04

«Технология мясных, молочных и рыбных продуктов
и холодильных производств»,

профессор, профессор кафедры

прикладной биотехнологии

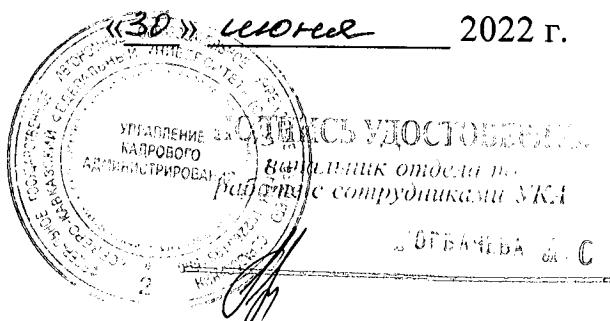
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования
«Северо-Кавказский федеральный университет»,
355017, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1

Тел.: +79280084685

e-mail: ryabtseva07@mail.ru



Рябцева Светлана Андреевна



2022 г.