

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора медичних наук, професора Ковальчука Валентина Петровича, завідувача кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України, на дисертаційну роботу П'ятковського Тараса Івановича на тему «Мікробіологічне обґрунтування ефективності альтернативних методів інактивації мікроорганізмів на основі комбінування нетермічних і термічних факторів впливу», що представлена на здобуття ступеня доктора медичних наук у спеціалізовану вчену раду Д 05.600.03 Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України у галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія

Обґрунтування вибору теми дослідження:

Мікробне забруднення продуктів харчування спричиняє не лише значні економічні збитки шляхом псування останніх, але й несе безпосередню загрозу здоров'ю людей. Мікробіологічна безпека харчових продуктів є основним критерієм в оцінці їх якості, адже кількість захворювань, які передаються через вживання контамінованої небезпечними мікроорганізмами їжі зростає з кожним роком. За даними ВООЗ, у світі щорічно реєструють від 68,4 до 275 млн випадків гострих діарей інфекційної природи, так чи інакше пов'язаних з ужитком забруднених мікробами продуктів. Хімічні консерванти, які використовуються у харчовій промисловості, спричиняють токсичний вплив на організм людини і негативно впливають на смакові характеристики продуктів. Тому, актуальність пошуку альтернативних способів знезаражування харчових продуктів не викликає сумнівів.

Крім того, актуальність підтверджується також і тим, що мікробіологічно безпечна вода є найважливішим ресурсом для життєдіяльності людей. Підрив Каховської ГЕС поставив під загрозу життя багатьох людей, в тому числі через обмеження доступу до чистої води. Забезпечення чистою водою цивільних осіб, військових, рятувальників і волонтерів у зонах з пошкодженою інфраструктурою є надзвичайно важливим завданням. Термічна обробка є давно відомим

ефективним методом інактивації бактерій та їх спор, проте її не завжди можна застосувати. У такому випадку альтернативою можуть бути розроблені здобувачем нетермічні методи обробки.

Тема досліджень актуалізована бойовими діями, що ведуться на території нашої держави. У сучасних умовах лікування вогнепальних та мінно-вибухових поранень ускладнюється стрімким зростанням антибіотикорезистентності ранової мікрофлори. За цих обставин розробка нових методів топічної санації ран перетворюється у наріжний науковий напрямок. Одним із найбільш перспективних методів є застосування озонованої води. Озон має потужну, неспецифічну біоцидну дію: він руйнує клітинні мембрани бактерій та розщеплює захисні біоплівки, до яких не можуть проникнути антибіотики. При цьому до озону у мікроорганізмів не виробляється стійкість. Крім антимікробного ефекту, озонована вода стимулює місцевий кровообіг, насичує тканини киснем і прискорює процеси регенерації. Для військової медицини цей метод є справжнім порятунком через свою доступність, низьку собівартість та безпечність для здорових тканин людини.

Означений вище науковий напрямок в Україні розроблявся фрагментарно і недостатньо. Зважаючи на це комплексні наукові дослідження П'ятковського Тараса Івановича є своєчасними, актуальними і стратегічно важливими для національної системи охорони здоров'я.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами:

Дисертаційна робота П'ятковського Т. І. є частиною науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України на тему «Особливості формування резистентності у представників умовно-патогенної флори в умовах здоров'я і патології» (номер держреєстрації 0122U000035), в якій дисертант зазначений як співвиконавець даної науково-дослідної роботи.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації:

Дана дисертаційна робота характеризується поетапним викладенням матеріалу, використанням сучасних методів лабораторних досліджень, статистичного аналізу, обговоренням, узагальненням результатів та наявністю достатньої кількості посилань на літературні джерела інформації, що були використані. Всі наукові положення, висновки мають обґрунтовані в експериментальному матеріалі та логічно випливають з отриманих результатів. Підхід, який використано при виконанні наукового дослідження, є раціональним і оптимальним для розв'язання сформульованої мети та завдань, яких було сформульовано у кількості дев'яти. Основні наукові положення, висновки чітко сформульовані автором у дисертації, повністю відповідають меті та завданням дослідження. Вся документація оформлена правильно та достовірно.

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів:

Автором встановлено, що вакуумне охолодження може призводити до бактеріальної контамінації в камерах охолодження та проникнення бактерій у листя зелені. При цьому вперше було з'ясовано, що проникнення бактерій у тканини листя відбувається інтенсивніше при нижчому тиску та повільному поверненні до атмосферного. Встановлено що оптимальна послідовність застосування засобів знезаражування у технології підготовки харчових продуктів є: рідкий дезінфектант, вакуум, газоподібний дезінфектант.

Автором продемонстровано, що короткочасне озонування високою концентрацією, яке супроводжується тривалою обробкою низькою концентрацією озону, має синергічний ефект на інактивацію *E. coli* O157:H7. Комбінація рідкого та газоподібного дезінфектантів продемонструвала адитивний ефект, при цьому зберігаючи товарний вигляд листя шпинату.

У дослідженні обґрунтовано доцільність електролітичної обробки води для генерації розчинів озону, концентрація яких є достатньою для пригнічення автохтонних та забруднюючих мікроорганізмів. Уперше встановлено кінетику процесів утворення й розпаду озону в ході електролізу. Також автором було експериментально підтверджено можливість нанесення сублетальних ушкоджень бактеріям грампозитивної та грамнегативної груп під дією озонованої води.

Автором доведено, що комбінація обробки спор *B. subtilis* помірним електричним полем (300 В/см) і сублетальною температурою (75 °С) суттєво знижує концентрацію спор (інактивація 2,5 lg КУО/мл). Подібна обробка (15,7 В/см і 55 °С) сирих яєць із *E. coli* K12 знижувала популяцію мікроорганізмів та викликала сублетальні пошкодження.

Було вперше встановлено, що електропровідність суспензії *L. innocua*, обробленої гідростатичним тиском, відображає ступінь ушкодження клітин. При цій обробці електропровідність зростала зі збільшенням кількості пошкоджених клітин під час циклів підвищення тиску, але залишалася стабільною при його зниженні. Комбінована обробка гідростатичним тиском та імпульсним електричним полем спричиняла підвищений витік внутрішньоклітинних компонентів, в межах цих експериментів автором уперше підтверджено вихід небілкових речовин при такій обробці.

Автором встановлено, що обробка спор *B. subtilis* гідростатичним тиском спричиняє механічне руйнуванням оболонки спори та її цитоплазматичної мембрани, при чому багаторазова обробка протягом того ж часу виявилася ефективнішою за одноразову.

Теоретичне і практичне значення одержаних результатів:

Результати лабораторних і мікробіологічних досліджень, отримані автором, науково обґрунтовують практичне застосування нетермічних методів для інактивації бактерій та їх спор на листовій зелені та у рідинах. При виконанні досліджень були створені протоколи застосування цих методів.

Основні положення дисертації впроваджено в навчальний процес кафедр Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, зокрема кафедри мікробіології, вірусології та імунології (акт від 20.06.2024 р.) і кафедри загальної гігієни та екології (акт від 2.09.2024 р.), а також у роботу бактеріологічних лабораторій ТОВ «Медична лабораторія Панакея» (акт від 19.09.2024 р.), КНП «Тернопільська комунальна міська лікарня №2» (акт від 18.07.2024 р.) та ДУ «Тернопільський обласний центр контролю та профілактики хвороб МОЗ України» (акт від 1.08.2024 р.).

В рамках мікробіологічних досліджень автор вперше експериментально обґрунтував нову техніку інокуляції мікроорганізмів, що стало підставою для отримання Патенту України на корисну модель (№155668).

Повнота викладу матеріалів дисертації у опублікованих працях:

За матеріалами дисертації опубліковано 50 наукових праць, що повністю відображають основні результати дисертації, з них 16 робіт у наукових фахових виданнях України, 12 – у зарубіжних наукових журналах, які проіндексовані у міжнародній наукометричній базі даних Scopus, а також у 21 збірниках всеукраїнських наукових (9) та закордонних (12) конференцій та конгресів. Крім того за матеріалами дисертації видано один патент України на корисну модель.

Анотація дисертації представлена українською та англійською мовами, яка містить стислий, проте об'єктивний виклад змісту дисертації, основних результатів дослідження та положень, які виносяться на офіційний захист, а також перелік наукових праць, опублікованих за результатами дисертаційної роботи.

Оцінка змісту роботи, її значення в цілому, зауваження щодо оформлення:

Дисертаційне дослідження представлено у вигляді рукопису обсягом 260 сторінок комп'ютерного тексту та містить 55 рисунків. Структура роботи є класичною і включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів, виклад результатів власних досліджень, висновки, додатки, а також анотації українською та англійською мовами. Бібліографія охоплює 336 найменувань, з яких 318 опубліковані латиницею.

Аналіз структури дисертації свідчить про її повну відповідність вимогам пунктів 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук». Зокрема, у вступній частині чітко й академічно коректно окреслено мету, завдання, об'єкт і предмет дослідження, розкрито наукову новизну та практичну цінність результатів, а також відображено особистий внесок здобувача та перелік публікацій. Зміст роботи повністю корелює із викладеними у вступі

положеннями. Сама праця вирізняється чіткою архітектурою та послідовною реалізацією поставлених завдань.

Аналітичний огляд літератури відзначено логічністю та послідовністю викладу. Другий розділ присвячено опису матеріалів та методів, які повністю релевантні меті та завданням роботи. Дотримуючись чіткої методологічної послідовності, дисертант сформував схеми експериментів, залучивши як класичні, так і новітні методики.

Дослідження проведено з дотриманням засад біоетики, що засвідчено відповідними висновками Комісії з питань біоетики Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

Отримані дані піддано коректній статистичній обробці із застосуванням загальноприйнятих методів. Варто додати, що низка використаних методик є оригінальними авторськими розробками, які були оприлюднені у двох наукових публікаціях.

У третьому розділі вивчено методи знезараження листя шпинату, штучно контамінованого *E. coli* O157:H7, та оцінено їхній вплив на ендогенну мікрофлору. Автор порівняв антимікробну дію гіпохлориту натрію, препарату «Pro-San L» та левулінової кислоти за різних способів нанесення: розпилення, занурення та вакуумного просочування.

Встановлено, що при розпиленні всі досліджувані агенти забезпечують зниження титру *E. coli* на 2,3-2,8 lg КУО/г. Водночас виявлено їхню меншу ефективність щодо природної мікрофлори, яка здатна інфільтрувати внутрішні тканинні структури листка. Найвищий рівень інактивації патогену (4,4 lg КУО/г) досягався шляхом занурення сировини у дезінфікуючі розчини. Натомість метод вакуумного просочування виявився малоефективним і призводив до механічного травмування рослинних тканин. Оцінка тривалості експозиції показала, що для збереження товарного вигляду та органолептичних властивостей шпинату тривалість контакту з дезінфектантами не повинна перевищувати 1 годину. Пролонгація цього часу викликала деколорацію та втрату тургору листя.

Четвертий розділ присвячено дослідженню механізмів проникнення *E. coli* K12 у внутрішні структури листка залежно від параметрів вакуумного

охолодження та анатомічних особливостей рослини. Доведено, що за умов швидкого відновлення тиску бактерії інфільтрують тканини лише при 0,6 кПа і виключно через абаксіальну (нижню) сторону листка через вищу щільність продихів. Підвищення тиску до 0,9 кПа нівелювало цей ефект. Навпаки, повільне відновлення тиску зумовлювало інтерналізацію мікроорганізмів з обох поверхонь листка незалежно від глибини вакууму (0,6 або 0,9 кПа).

Також у розділі дано оцінку бактерицидної дії газоподібного озону проти *E. coli* O157:H7. Оптимальний результат (редукція на 2,9 lg КУО/г) зафіксовано при обробці за атмосферного тиску з наступним його підвищенням до 69 кПа. Попереднє створення вакууму знижувало ефективність озону на сухих зразках через інтерналізацію бактерій, проте було доцільним для зволоженого листя, оскільки видаляло надлишкову вологу, що блокувала доступ газу. Продемонстровано, що при високому завантаженні робочої камери ефективність методу падає до 1-2 lg КУО/г внаслідок прискореної деструкції озону.

Під час тридобових експериментів (за температури 4 °С) збільшення концентрації озону з 0,032 до 0,211 г/м³ посилило інактивацію патогену з 1 до 3,7 lg КУО/г. Максимальний синергізм виявлено при комбінованому режимі: первинна вакуумна «ударна» доза (1,5 г/м³) із подальшим підтриманням низької концентрації газу (0,106 г/м³). Проте тривалий контакт з озоном негативно впливав на якість продукту, спричиняючи в'янення та побліднення листя.

У п'ятому розділі представлено результати поєднання рідкого засобу «Pro-San L» та газоподібного озону. Ключовим чинником досягнення синергічного ефекту визначено послідовність етапів обробки. Попередня дія озону з наступним застосуванням рідкого агента продемонструвала низьку ефективність (інактивація 2,7 lg КУО/г), оскільки вакуумування сприяло проникненню бактерій всередину рослини. Натомість виражений синергізм спостерігався за зворотного алгоритму: первинна хімічна обробка розчином з наступним озонуванням знижувала популяцію бактерій на 3,9 lg КУО/г.

Шостий розділ присвячений оцінці ефективності електролітичної обробки для очищення води у поєднанні з мікробіологічною валідацією процесу. Досліджено деконтамінацію та параметри зберігання води різного походження

(водопровідної, джерельної, води відкритої водойми. Результати місячного моніторингу джерельної води засвідчили, що 2-хвилинна обробка стримує її псування, тоді як режими тривалістю 5 та 10 хвилин гарантують абсолютну стерильність і прозорість, запобігаючи утворенню осаду за незначного зниження мінералізації.

У цьому розділі вивчено дію водного розчину озону на полірезистентні штами бактерій, виділені з ран військовослужбовців. Встановлено, що 15-хвилинна експозиція викликає сублетальні ушкодження грамнегативних та грампозитивних бактерій. Це сприяє відновленню їхньої чутливості до антибіотиків, що підтверджено розширенням зон затримки росту при оцінюванні диско-дифузійним методом.

Клінічний ефект електролітично озонованої води оцінено у комплексному лікуванні 27 пацієнтів із бойовими травмами. У раневому вмісті переважали моноінфекції, зумовлені стійкими штамами *A. baumannii* та *S. aureus*. Озонований розчин застосовували для зрошення ран, імпульсного промивання під тиском, а також у комбінації з вакуумною терапією для профілактики анаеробної інфекції. Метод продемонстрував високу ефективність: стимулював грануляцію тканин, мінімізував ризик вторинного інфікування, забезпечив приживлення трансплантатів та загоєння ран без септичних ускладнень на тлі системної антибіотикотерапії.

Восьмий розділ присвячено вивченню впливу помірного електричного поля (ПЕП) у комбінації з термічним фактором на спори *Bacillus subtilis*. Ізольована дія ПЕП, як і самостійна термічна обробка не дали суттєвого результату. Проте їх поєднання виявило виражений синергізм. Тести з термічним шоком та конфокальна мікроскопія підтвердили, що ПЕП за помірних температур викликає пряме незворотне пошкодження кортексу та внутрішніх мембран спор, а не стимулює їх проростання.

У заключному розділі власних досліджень проведено моніторинг інактивації *Listeria innocua* під дією високого гідростатичного тиску шляхом вимірювання електропровідності суспензії в місці обробки.

Також у цьому розділі детально вивчено синергічні ефекти комбінування високого гідростатичного тиску з іншими фізичними методами: імпульсним електричним полем та ультразвуком, стосовно тест-культури *Listeria innocua*.

Дисертаційна робота завершується дев'ятьма висновками, які відповідають меті та завданням, логічно витікають з результатів проведених досліджень.

Результати кожного розділу дисертації оприлюднено у публікаціях автора, більшість яких написані англійською мовою та опубліковані у міжнародних виданнях та фахових виданнях України.

Відомості щодо відсутності порушень академічної доброчесності:

У дисертаційній роботі П'ятковського Тараса Івановича на тему «Мікробіологічне обґрунтування ефективності альтернативних методів інактивації мікроорганізмів на основі комбінування нетермічних і термічних факторів впливу» не встановлено ознак академічного плагіату. Текст є оригінальним, всі цитати коректно позначені та відображені у списку використаних джерел. Усі ідеї та положення, викладені в дисертаційній роботі, належать автору.

Зауваження та рекомендації, запитання до автора:

Під час роботи над оцінкою дисертаційної роботи П'ятковського Т. І. виникли деякі зауваження щодо оформлення роботи. Зокрема зустрічаються поодинокі стилістичні та орфографічні помилки. Проте, це не впливає на загальну позитивну оцінку роботи та не зменшує її наукову новизну.

Крім зауважень, до дисертанта є наступні запитання:

1. Вибір тест-штаму ентерогеморагічної *E. coli* O157:H7 сумнівів не викликає, проте чому Ви обрали *Listeria innocua*, адже цей штам є непатогенним та не викликає спалахів захворювань?

2. Чим обумовлений вибір Вами для досліджень рідкого дезінфектанту на основі аніонного детергенту? Адже катіонні детергенти мають вищий рівень протимікробної активності.

3. Яким доступним в Україні рідким дезінфектантом можна замінити Pro-San L у розроблених Вами технологіях?

4. Як обробка рідким дезінфектантом Pro-San L впливала на смакові характеристики листків шпінату.

5. Ви застосовували обробку газоподібним озоном після застосування дезінфектанту з лимонною кислотою. Як окислення органічної кислоти озоном впливає на досягнення сануючого ефекту і чи не впливає така взаємодія на якість продуктів, що підлягають знезараженню?

6. Більшість Ваших експериментів були проведені за кордоном. Чи розроблені Вами конкретні алгоритми чи технічні умови для впровадження результатів Ваших досліджень в Україні?

Відповідність дисертації вимогам, які пред'являються до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук:

Дисертаційна робота П'ятковського Тараса Івановича на тему «Мікробіологічне обґрунтування ефективності альтернативних методів інактивації мікроорганізмів на основі комбінування нетермічних і термічних факторів впливу» на здобуття ступеня доктора медичних наук в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, є самостійною завершеною науковою працею, в якій отримані нові, науково обґрунтовані дані. Основні результати дисертаційної роботи повністю висвітлені в наукових працях, опублікованих у достатній кількості для захисту. Дисертаційна робота оформлена у відповідності до вимог, результати досліджень обґрунтовані і їх достовірність не викликає сумнівів. У роботі зустрічаються поодинокі стилістичні помилки, які не мають принципового значення і не зменшують теоретичного та практичного значення роботи.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота П'ятковського Тараса Івановича на тему: «Мікробіологічне обґрунтування ефективності альтернативних методів інактивації мікроорганізмів на основі комбінування нетермічних і термічних факторів впливу», виконана на сучасному методологічному рівні і за актуальністю теми, обсягом виконаного дослідження та отриманих результатів, достовірністю висновків та положень, науковою новизною, теоретичною та

практичною цінністю повністю відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», пп. 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 р., а дисертант, П'ятковський Тарас Іванович, має необхідний рівень наукової кваліфікації і заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Офіційний опонент:

доктор медичних наук, професор,
завідувач кафедри мікробіології
Вінницького національного
медичного університету
ім. М.І. Пирогова МОЗ України

Валентин КОВАЛЬЧУК