

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора медичних наук, професора **Грузевського Олександра Анатолійовича**, професора кафедри загальної та клінічної епідеміології та біобезпеки з курсом мікробіології та вірусології Одеського національного медичного університету, на дисертаційну роботу **П'ятковського Тараса Івановича** на тему «**Мікробіологічне обґрунтування ефективності альтернативних методів інактивації мікроорганізмів на основі комбінування нетермічних і термічних факторів впливу**», подану до захисту до спеціалізованої вченої ради Д 05.600.03 Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія (22 «Охорона здоров'я»)

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Гострі кишкові інфекції, викликані патогенними мікроорганізмами, створюють серйозні проблеми для системи охорони здоров'я та призводять до значних економічних втрат у світі. Ці інфекції спричиняють бактерії, віруси, патогенні найпростіші та грибки, які можуть контамінувати питну воду та продукти харчування на різних етапах їх виробництва, обробки та розповсюдження. Розуміння механізмів поширення цих мікроорганізмів є важливим для розробки ефективних методів їх інактивації та підвищення безпеки харчових продуктів і води. Традиційні термічні методи давно є основою медичної та харчової безпеки, адже ефективно інактивують широкий спектр патогенів. Проте такі методи неможливо застосувати для обробки інфікованих ран, а у харчовій промисловості вони часто впливають на органолептичні та поживні якості продуктів. Зі зростанням попиту на свіжі, мінімально оброблені продукти, зростає також потреба в альтернативних методах обробки, які забезпечують мікробіологічну безпеку без зниження якості харчових продуктів. Нетермічні методи стали перспективною альтернативою традиційній термічній обробці для інактивації мікроорганізмів у харчових продуктах і воді. До них належать: обробка високим гідростатичним тиском, вплив помірним або імпульсним електричним полем, ультрафіолетове опромінення, ультразвукова обробка, а також використання газоподібного озону або його водного розчину. Ці методи ефективно інактивують мікроорганізми, водночас зберігаючи смак, текстуру й поживну цінність продуктів. Вони можуть застосовуватися до різних харчових і фармацевтичних продуктів, від рідких до твердих, що робить їх універсальними для медицини, фармації та харчової промисловості. Деякі з цих технологій також ефективно знищують мікроорганізми та біоплівки на поверхнях медичних інструментів і обладнання.

Таким чином, дисертаційна робота П'ятковського Т.І. на тему «Мікробіологічне обґрунтування ефективності альтернативних методів інактивації мікроорганізмів на основі комбінування нетермічних і термічних факторів впливу», яка містить поглиблені відомості щодо особливостей розповсюдження мікроорганізмів при вакуумному

охолодженні та ефективних методах їх знешкодження із застосуванням різних нетермічних методів, є актуальною з наукової та практичної точки зору.

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

Більшість досліджень дисертантом було виконано під час наукового стажування у США, 2012-2020 рр. за грантами від United States Department of Agriculture, National Institute of Food and Agriculture, Agriculture and Food Research Initiative. На кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України дисертаційні дослідження були фрагментом ініціативної науково-дослідної роботи «Особливості формування резистентності у представників умовно-патогенної флори в умовах здоров'я і патології» (№ держреєстрації 0122U000035).

Ступінь обґрунтованості отриманих результатів, наукових положень та висновків сформульованих у дисертації.

Мета та завдання дослідження чітко та лаконічно сформульовані автором дисертації і відповідають темі роботи. Основні методи дослідження, які П'ятковський Т.І. використав у роботі, відповідають меті та завданням. Результати дисертації отримані із застосуванням сучасних лабораторних методів досліджень та продемонстрували ефективність запропонованих методів інактивації мікроорганізмів та їх комбінації. Статистичний аналіз був проведений належним чином. Це підтверджує достовірність отриманих результатів у дисертаційній роботі і надає можливість використовувати їх для подальших обговорень та узагальнень. Дисертаційна робота відзначається точністю та системністю в методологічному виконанні. Основні положення та висновки, сформульовані автором, є логічним наслідком результатів власних досліджень і підтверджують належний науковий рівень поданої на рецензування дисертації. Це свідчить про актуальність виконаної роботи та вагомість отриманих результатів.

Достовірність і новизна наукових положень і висновків, наукове та практичне значення

У цілому, дисертація є науково обґрунтованою та оригінальною працею, у роботі використані достатні для адекватного вивчення поставлених завдань методи досліджень, а отримані результати статистично оброблені та достатньо проаналізовані.

Проведенню власних досліджень передувало проведеною автором ґрунтовний аналіз достатньої кількості літературних джерел (понад 300 найменувань), що дозволило встановити сучасний стан застосування нетермічних методів інактивації мікроорганізмів в Україні та світі, визначити невирішені питання та сформулювати завдання власного дослідження.

Автором проведено достатній об'єм досліджень, при виконанні яких отриманий достатній масив експериментальних даних. Всі дослідження відповідали вимогам норм та принципів біоетики. Наукові положення і висновки, сформульовані в дисертації, відповідають вимогам до такого виду досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів дослідження.

Наукова новизна проведених дисертантом досліджень полягає в наступному:

Встановлено, що вакуумне охолодження може спричиняти бактеріальну контамінацію в камерах охолодження та проникнення бактерій у листя зелені. Вперше з'ясовано, що бактерії інтенсивніше проникають у тканину листя при нижчому тиску та повільнішому відновленні до атмосферного. Ефективність озонування проти *E. coli* O157:H7 зростала після вакуумного охолодження, оскільки це видаляло рідину з поверхні продукту, сприяючи глибшому проникненню озону. Натомість використання рідких дезінфектантів після вакуумного охолодження виявилось менш ефективним через інтерналізацію бактерій у тканини.

Вперше показано, що короткочасне озонування високою концентрацією з подальшою тривалою обробкою низькою концентрацією озону має синергічний ефект на інактивацію *E. coli* O157:H7. Комбінація рідкого та газоподібного дезінфектантів дала адитивний ефект, особливо при застосуванні газоподібного озону після рідкого дезінфектанта під час вакуумного охолодження. Новий підхід, який включає розпилення рідкого дезінфектанта з подальшим тривалим озонуванням, знижував концентрацію *E. coli* O157:H7 більш ніж на 6 lg КУО/мл на перший день та менше впливав на вигляд листя шпинату.

Показана летальна та сублетальна дія електролітично обробленої води на клінічні штами *S. aureus* та *E. coli*. Продемонстровано, що електролітично озонована вода може бути використана як ад'ювант для місцевого лікування ранових поверхонь.

Доведено, що комбінація обробки спор *B. subtilis* помірним електричним полем (300 В/см) і помірною температурою значно знижує концентрацію спор. Поєднання з термічною обробкою при 75 °С дозволило знизити концентрацію на 2,5 lg КУО/мл. Також обробка помірним електричним полем (15,7 В/см) і температурою 55 °С знижувала популяцію *E. coli* K12 у яйцях, спричиняючи сублетальні пошкодження.

Вперше встановлено, що електропровідність суспензії *L. innocua*, обробленої гідростатичним тиском до 500 МПа, корелює зі ступенем пошкодження клітин. Електропровідність зростала разом із кількістю ушкоджених клітин під час підвищення тиску, проте не змінювалася під час процесу зниження тиску. Поєднання гідростатичного тиску з імпульсним електричним полем збільшувало витік внутрішньоклітинних компонентів, що вперше підтвердило витік небілкових речовин.

Багаторазова обробка спор *B. subtilis* гідростатичним тиском виявилася ефективною за одноразову, досягаючи інактивації 5,8 lg КУО/мл при 500 МПа і 60 °С за три цикли по 3 хвилини. Інактивація при цьому була спричинена механічним руйнуванням оболонки спори та цитоплазматичної мембрани.

Практичне значення отриманих результатів.

Під час виконання роботи були розроблені інноваційні протоколи комбінованого використання рідких і газоподібних дезінфектантів, а також високого гідростатичного тиску й імпульсного електричного поля. Отримані результати лабораторних і

мікробіологічних досліджень підтверджують наукову доцільність практичного використання нетермічних методів інактивації бактерій і спор на харчових продуктах та у рідинах. У ході мікробіологічних досліджень автор обґрунтував експериментально нову техніку інокуляції, що стало основою для отримання Патенту України на корисну модель (Пат. №155668).

Основні матеріали та положення дисертації впроваджено в навчальний процес на профільних кафедрах Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, зокрема на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології та кафедрі загальної гігієни та екології. Крім того, розробки застосовуються в практиці бактеріологічних лабораторій ТОВ «Медична лабораторія Панакея», КНП «Тернопільська комунальна міська лікарня №2» та ДУ «Тернопільський обласний центр контролю та профілактики хвороб МОЗ України».

Повнота викладу матеріалів дисертації у опублікованих працях.

Основний зміст дисертаційної роботи викладений у 50 наукових працях, із них 16 робіт у наукових фахових виданнях України, 12 у зарубіжних наукових журналах, які проіндексовані у міжнародній наукометричній базі даних Scopus. Результати дисертаційного дослідження апробовані на 21 наукових всеукраїнських (9) та закордонних (12) конференціях та конгресах та висвітлені в матеріалах цих конференцій і конгресів. Додатково за матеріалами дисертації видано один патент України на корисну модель.

Результати досліджень, наведені у публікаціях, відповідають даним, висвітленим у дисертаційній роботі.

Дисертація містить анотації українською та англійською мовами, ідентичні за змістом та оформлені згідно вимог. Після анотації наведений перелік наукових праць, опублікованих за результатами дисертаційної роботи.

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

Представлена дисертація є рукописом, викладеним на 260 сторінках у традиційному стилі і складається з титульного аркушу, оформленого відповідно до чинних вимог, анотації (українською та англійською мовами), переліку умовних скорочень, вступу, 9 розділів (у т.ч., огляду літератури, матеріалів і методів, 7 розділів власних досліджень, висновків, списку використаних джерел, та додатків. Усі розділи написані грамотно, стиль та оформлення роботи легко сприймаються. Список використаних джерел складено згідно з чинними вимогами. Розділи та висновки повністю відповідають меті та завданням дослідження, є обґрунтованими та логічно впливають із отриманих результатів.

Анотація містить стислий виклад основних положень дисертаційної роботи. Оформлена згідно вимог.

У *вступі* здобувач обґрунтував актуальність проведеного дослідження, сформував мету та завдання дослідження, описав об'єкт та предмет дослідження, вказав наукову новизну одержаних результатів та їх практичне значення, особистий внесок,

відомості про апробацію результатів дослідження та наукові публікації за темою дисертації.

Перший розділ присвячений огляду світової літератури. Він має п'ять підрозділів, де автор послідовно та аргументовано навів сучасні дані наукових досліджень з вивчення нетермічних методів інактивації мікроорганізмів та механізмів їх дії. Огляд написаний доступно, логічно, грамотною літературною мовою. До огляду долучено чотири статті автора написані англійською мовою, дві з яких виконані одноосібно (позиції 201-204 списку літератури). З недоліків можна зазначити нечисленні стилістичні неточності, які не впливають на загальну позитивну оцінку розділу.

У другому розділі описані матеріали та методи дослідження. Детально описані використані штами мікроорганізмів, наведені схеми експериментів, описане використання обладнання та методи досліджень. До цього розділу автором опубліковано одну працю у фаховому виданні України і один патент на корисну модель. До розділу зауважень немає.

Розділи 3-9 роботи містять результати власних досліджень.

Розділ 3 містить матеріали щодо інактивації мікроорганізмів на поверхні листя шпинату рідкими дезінфектантами. Автор показав, що різні застосовані рідкі дезінфектанти мали приблизно однакову ефективність. Окрім інактивації нанесених збудників оцінювалася також інактивація природньої мікрофлори. Матеріали, викладені у розділі, висвітлені у англійській статті П'ятковського Т.І. опублікованій у співавторстві (позиція 3 списку літератури).

У розділі 4 описані фактори проникнення *E. coli* в товщу листя шпинату під дією вакууму. Показано, що повільніше відновлення вакууму до атмосферного тиску сприяє більшому проникненню мікроорганізмів. Крім того проаналізовано можливості використання газоподібного озону для інактивації *E. coli* O157:H7 на поверхні та у товщі листя. За рахунок газоподібної обробки автору вдалося на порядок знизити кількість інтерналізованих мікроорганізмів. Матеріали, викладені у розділі, висвітлені у двох наукових статтях англійською мовою у співавторстві.

У розділі 5 показано і проаналізовано результати комбінованого застосування рідкого та газоподібного дезінфектантів при короткотривалій та довготривалій обробках для інактивації *E. coli* O157:H7 на поверхні та у товщі листя. Зокрема розпилення рідкого дезінфектанта з подальшим тривалим озонуванням, знижувало концентрацію *E. coli* O157:H7 більш ніж на 6 lg КУО/мл. Матеріали, викладені у розділі, опубліковані у наукових статтях англійською мовою у співавторстві.

Розділ 6 присвячено електролітичній обробці води для інактивації мікроорганізмів. Показано, що навіть короткотривала обробка води електролізом (2-5 хв) забезпечує інактивацію автохтонної мікрофлори та її тривалу мікробіологічну чистоту. Частина розділу присвячено використанню цієї технології у польових умовах, що важливо враховуючи сучасні реалії прифронтових регіонів України. Крім того у розділі

автором досліджена кінетика електролітичного утворення та розкладання озону у прісній воді. Показано, що чим вища мінералізація – тим вища продукція озону у такій воді, а присутність органічного вмісту, в тому числі бактерій, навпаки прискорює розпад вже утвореного озону. Основні результати, отримані у цьому розділі, опубліковано у статтях автора українською та англійською мовами у співавторстві.

У розділі 7 продемонстровано результати медичного застосування електролітично озонованої води. Автором показано, що електролітично утворений водний розчин озону летально та сублетально пошкоджує клінічно значимі мікроорганізми, що може бути використано при місцевому лікуванні інфікованих ран. Матеріали, викладені у розділі, опубліковані у наукових статтях англійською мовою у співавторстві.

У розділі 8 вивчалось застосування помірною електричного поля для інактивації *E. coli* та спор *B. subtilis*. У цьому розділі П'ятковський Т.І. продемонстрував, що комбінована термічна обробка та обробка помірним електричним полем спричиняють сублетальні пошкодження у клітинах *E. coli*. Резистентні до термічної обробки спори *B. subtilis* при додатковій обробці помірним електричним полем протягом години втрачали 2,5 lg КУО/мл життєздатних одиниць за рахунок пошкодження цитоплазматичної мембрани. Матеріали, викладені у розділі, опубліковані у наукових статтях англійською мовою у співавторстві (позиції 303 та 304 списку літератури).

Розділ 9 висвітлює інактивацію *L. innocua* та спор *B. subtilis* високим гідростатичним тиском, імпульсним електричним полем та ультразвуком. Показана вища ефективність інактивації бактеріальних спор імпульсною (триразовою) обробкою високим тиском у порівнянні із разовою, що за тривалістю дорівнювала імпульсній. У розділі також продемонстрована можливість оцінювання ефективності інактивації бактерій за допомогою вимірювання електропровідності бактеріальної суспензії. Автором показано, що електрична провідність зростала із кількістю інактивованих мікроорганізмів. Результати, отримані у цьому розділі, опубліковано у статтях автора англійською мовою у співавторстві (позиції 16, 154, 317 списку літератури).

Із зауважень до розділів із результатами власних досліджень можна вказати стилістичну неоднорідність рисунків, що не впливає на загальне позитивне враження від дисертаційної роботи.

Висновки у кількості 9, які сформулював П'ятковський Т.І. у своїй дисертаційній роботі є науково обґрунтованими та відповідають меті та завданням дослідження, побудовані за змістом дисертації. Вони логічно підсумовують результати дисертаційного дослідження, їх достовірність та об'єктивність, аргументовані статистичними даними.

Список використаних джерел оформлений згідно встановлених вимог, свідчить про те, що під час роботи було проаналізовано сучасні результати наукових досліджень.

У додатку А наведені додаткові таблиці та рисунки до розділів дисертації.

У додатку Б наведена повна інформація про апробацію матеріалів дисертації із зазначенням місця і часу проведення наукових форумів та конференцій, а також форми участі автора у них.

Додаток В містить скан-копію патенту України на корисну модель, отриманого автором.

У додатку Г наведені скан-копії актів про впровадження результатів дисертаційного дослідження у практику закладів охорони здоров'я та у навчальний процес підготовки здобувачів вищої медичної освіти.

Додаток Д містить список публікацій здобувача.

Відомості щодо наявності/відсутності порушень академічної доброчесності

За результатами експертної перевірки дисертаційної роботи П'ятковського Т.І. встановлено коректність посилань на першоджерела для текстових та ілюстративних запозичень; ознак академічної недоброчесності, плагіату, самоплагіату, навмисних спотворень не виявлено.

Зауваження та рекомендації, запитання до автора

Принципових зауважень до роботи немає. Нечисленні несуттєві одруківки в тексті були виправлені автором в ході рецензування дисертаційної роботи і не вплинули на загальне позитивне враження від дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота оформлена згідно з вимогами, затвердженими наказом Міністерства освіти та науки України № 40 від 12.01.17 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації».

У ході рецензування роботи до дисертанта виникли наступні запитання:

1. Яким чином проводився моніторинг концентрації мікроорганізмів на листі шпинату під час довгострокових експериментів? З матеріалів і методів зрозуміло що установка закривалася герметично на початку експерименту і відкривалася після термальної деструкції озону.

2. Чому моделлю листової зелені був обраний саме шпинат, а не якийсь інший вид салату чи взагалі інші культурні рослини?

3. У дисертації наведені дані по інактивації мікроорганізмів різними нетермічними методами, озоном зокрема. Чому у Вас не було досліджень по інактивації бактеріальних токсинів?

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», представлена на здобуття наукового ступеня доктора наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, галузі знань 22 «Охорона здоров'я», є самостійною завершеною науковою працею, в якій наведено теоретичне обґрунтування і нове вирішення актуального наукової про-

блеми мікробіології щодо застосування нетермічних методів інактивації вегетативних та споротворних мікроорганізмів на підставі отриманих автором результатів досліджень. Наукові результати і висновки дисертаційної роботи достатньо обґрунтовані і підкріплені аналізом даних, отриманих у ході дослідження, їх достовірність не викликає сумнівів. Наукові положення, результати та висновки дисертації повною мірою висвітлені у наукових публікаціях у виданнях, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних досліджень. Дисертація оформлена відповідно до чинних вимог.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота П'ятковського Тараса Івановича на тему «Мікробіологічне обґрунтування ефективності альтернативних методів інактивації мікроорганізмів на основі комбінування нетермічних і термічних факторів впливу» повністю відповідає вимогам, передбаченими пп. 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 р., (зі змінами, внесеними згідно з постановами Кабінету Міністрів України № 502 від 19 травня 2023 р. та № 507 від 3 травня 2024 р.) і наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», а її автор П'ятковський Тарас Іванович заслуговує на присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Опонент:

Професор кафедри загальної
та клінічної епідеміології та
біобезпеки з курсом мікробіології
та вірусології Одеського
Національного медичного
університету,
доктор медичних наук, професор

Олександр ГРУЗЕВСЬКИЙ