

**В диссертационный совет по защите
диссертаций на соискание ученой степени
кандидата наук,
на соискание ученой степени
доктора наук
24.1.515.01 при ФГАНУ «ВНИМИ»
Всероссийский
научно-исследовательский институт
молочной промышленности
г. Москва ул. Люсиновская 35**

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата технических наук Федоровой Татьяны Васильевны
на диссертационную работу Кишиловой Светланы Анатольевны на тему:
«Разработка методических подходов к оптимизации контроля *Pseudomonas aeruginosa* на
молочных производствах», представленную на соискание ученой степени кандидата
технических наук по специальностям 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и
биологически активных веществ и 4.3.3 – Пищевые системы

Актуальность темы

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) — серьезная проблема для пищевой промышленности, включая молокоперерабатывающую отрасль, так как она активно образует биопленки на оборудовании, устойчива к дезинфицирующим средствам и способна расти при низких температурах.

P. aeruginosa часто вызывает порчу молочных продуктов, придавая им горький вкус и гнилостный запах, что требует жесткого микробиологического контроля на всех этапах производства. Токсикоинфекции, ассоциированные с *P. aeruginosa*, возникают после употребления контаминированных высокобелковых продуктов животного происхождения и протекают в виде тяжелой диареи.

Синегнойная палочка входит в группу лидирующих бактерий-оппортунистов, объединенных термином «ESKAPE», и включающих шесть самых проблемных с точки зрения антибиотикорезистентности микроорганизмов.

В настоящее время активно разрабатываются различные подходы для контроля нежелательных микроорганизмов, входящих в состав биопленок. Они включают в себя фототермическое воздействие, инактивацию биопленок *P. aeruginosa* плазмой, обработку инфицированных поверхностей дезинфицирующими средствами, способными разрушать биопленки (например, на основе активного кислорода, четвертичных аммонийных соединений, хлора). Однако из-за высокой резистентности *P. aeruginosa* необходим комплекс научно-обоснованных санитарно-гигиенических мероприятий по снижению микробной контаминации производственных помещений и оборудования пищевых предприятий и поддержания требуемого санитарно-гигиенического состояния. В связи с этим создание новых дезинфицирующих средств, обладающих высокой антимикробной активностью и широким спектром действия, а также обеспечивающих долговременную защиту производственных помещений и оборудования, является актуальным для пищевых предприятий. Одним из путей решения данного вопроса является применение современных высокоэффективных технологий обеззараживания с использованием экологически безопасных биоцидных средств нового поколения. В этом аспекте изучаются антимикробные свойства растительных эфирных масел, использование бактериофагов и молочнокислых бактерий. При этом важно понимать, что биоцидные средства и процедуры для пищевых предприятий должны соответствовать требованиям безопасности, установленным соответствующими регулирующими органами и никоим

образом не влиять на вкусовые и питательные свойства продуктов, что особенно актуально для молочной промышленности.

Поиск эффективных средств для противодействия *P. aeruginosa*, в целом, остается непростой задачей. Способность микроорганизма использовать разнообразный арсенал механизмов устойчивости к антимикробным воздействиям требует участия специалистов разного профиля, для разработки комбинаций различных стратегий, способных привести к эффективному контролю и снижению угроз общественному здоровью, связанных с *P. aeruginosa*.

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

При определении цели и задач исследований Кишиловой С.А. был принят во внимание обширный научный опыт таких известных ученых в области санитарной микробиологии молока, как Шевелева С.А., Ефимочкина Н.Р., Королева Н.С., Рожкова И.В., Семенихина В.Ф., Свириденко Г.М., Харитонов В.Д. и др. Анализ большого количества зарубежных литературных источников свидетельствует о всесторонней проработке вопроса в области микробиологической безопасности пищевых продуктов, а также возникновения пороков и порчи молочных продуктов бактериального происхождения, вызванных присутствием синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*.

На первом этапе работы проведен санитарно-гигиенический мониторинг на молочных производствах с подозрением на контаминацию *P. aeruginosa*. В результате чего выделены и идентифицированы штаммы, персистирующие на предприятии и выявлены возможные источники контаминации. Далее последовательно проведена комплексная характеристика выделенных изолятов *P. aeruginosa*, включающая изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств; определение чувствительность изолятов *P. aeruginosa* к действию химических и биологических антимикробных агентов; исследование эффективности элиминации *P. aeruginosa* в зависимости от температурно-временных параметров среды при испытании технологически значимых режимов пастеризации и хранения молока.

Комплексный и структурированный подход, а также грамотная методическая база в итоге позволили диссертанту разработать СТО ВНИМИ (МР) № 00419785-084-2025 «Оптимизация контроля *Pseudomonas aeruginosa* при производстве молочной продукции» и провести апробацию разработанного СТО на производственных площадках предприятий молочной промышленности ООО «Итальянские традиции», ОАО «Брянский молочный комбинат» и АО «Зеленоградское».

Автореферат и печатные работы Кишиловой С.А. полностью отражают основные положения и содержание диссертационной работы. По теме диссертационной работы опубликовано 14 печатных работ, из которых 6 в журналах Перечня рецензируемых научных журналов ВАК РФ (К1 и К2), 4 статьи – в изданиях, индексируемых в международных базах научного цитирования Scopus и Web of Science.

Научные положения, представленные в диссертации, обоснованы и подтверждены экспериментальными данными, выводы отражают поставленные задачи и реализованную цель исследований.

Достоверность и новизна исследований, полученных результатов и выводов диссертации

Достоверность результатов, полученных при проведении исследований, определена количеством поставленных опытов, в которых использовались общепринятые стандартные микробиологические и биохимические методы и методики исследований. Научные исследования проведены на сертифицированном оборудовании, полученные экспериментальные данные обработаны с использованием методов математической статистики с использованием современных компьютерных программ не менее чем с трех-

пятикратной повторностью проведения опытов; корреспондируется с данными, полученными экспериментальным путем автором и другими исследователями.

В диссертационной работе Кишиловой С.А. получен ряд новых важных результатов, которые можно рассматривать как научную новизну. Так, установлены: зависимость выживаемости штаммов *P. aeruginosa* от температурно-временных параметров при испытании режимов пастеризации и хранения молока; варибельность и штаммоспецифичность свойств, выделенных на молочных производствах изолятов *P. aeruginosa*, при использовании химических и биологических антимикробных агентов. Доказана необходимость корректировки режимов пастеризации при риске контаминации *P. aeruginosa*; важность мониторинга реактивации патогенов при хранении; перспективность применения молочнокислых культур как дополнительного барьера против *P. aeruginosa*; необходимость подтверждения эффективности рабочих концентраций используемых дезинфицирующих средств и их ротации для недопущения формирования резистентности у бактерий.

В целом, представленные в работе научные положения обоснованы и подтверждены результатами экспериментальных исследований и производственных испытаний. Экспериментальные данные с достаточной степенью точности согласуются с общетеоретическими концепциями, принятыми в данной области исследований.

Анализ содержания работы

Диссертационная работа Кишиловой С.А. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание организации работы, объектов и методов исследований, изложения результатов и их обсуждения, а также выводов, списка использованной литературы и приложений. Основные положения диссертационной работы изложены на 141 странице, включают 9 таблиц, 50 рисунков и 5 приложений. Список литературы содержит 189 источников, из них 57 отечественных и 132 зарубежных. Диссертационная работа Кишиловой С.А. выполнена в соответствии с требованиями ВАК РФ.

Во введении изложена актуальность диссертационной работы, цель и задачи исследования, научная новизна, практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, представлены степень достоверности, методология, публикационная активность, апробации и данные по структуре и объему диссертации.

В первой главе представлен анализ научно-технической литературы по теме диссертации. Дана общая характеристика бактерии *P. aeruginosa*, проанализированы ее особенности как патогена и бактерии, вызывающей порчу пищевых, в том числе молочных продуктов. Проанализированы риски персистенции микроорганизма на молочных производствах, с учетом способности противостоять технологическим воздействиям и санитарным процедурам. Обоснована необходимость поиска средств для противодействия бактерии *P. aeruginosa* и предотвращения рисков контаминации молочной продукции.

Во второй главе «Объекты и методы исследований» приведена организация работы, объекты исследований, методы, схема проведения исследований. Объектами исследований являлись:

- молоко, контаминированное штаммами *P. aeruginosa* и подвергнутое обработке при различных температурно-временных параметрах при испытании технологически значимых режимов пастеризации молока;
- исследуемые образцы молока в хранении;
- штаммы *P. aeruginosa*, выделенные при мониторинге санитарно-гигиенического состояния на молочных производствах и референсный тест-штамм *P. aeruginosa* 25668, полученный в Государственной коллекции микроорганизмов и клеточных культур;

- штаммы молочнокислых бактерий и грибковая кефирная закваска из коллекции молочнокислых и пробиотических микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ».

При проведении экспериментальной части использованы микробиологические и биохимические методы; а также методы выделения и идентификации *P. aeruginosa*.

Обработку полученных экспериментальных данных осуществляли с помощью пакета программ «Microsoft Office» по результатам 3-х повторностей.

В третьей главе «Экспериментальная часть» изложены результаты экспериментальных исследований.

На первом этапе был проведен мониторинг санитарного состояния ряда молочных предприятий и выделены 4 штамма, идентифицированные как *P. aeruginosa*. Изучены морфологические, культуральные, биохимические свойства выделенных штаммов; выявлен более высокий уровень пигментообразования и разная чувствительность к ряду антибиотиков. Исследование ферментативной активности показало, что культуры в целом обладают высокой эстеразной активностью, что, по литературным данным, обеспечивает высокую выживаемость в неблагоприятных условиях. Изучение протеолитической активности при различных температурах культивирования показало, что её проявление является как штаммо-, так и температурозависимым. У всех штаммов протеолитическая активность наблюдалась при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$, у 50% штаммов сохранялась незначительная протеолитическая активность при температуре $(6\pm 1)^\circ\text{C}$, подтверждающая риски при холодильном хранении.

На втором этапе исследовали эффективность действия антимикробных биологических агентов на рост *P. aeruginosa*. Показано, что бактерии *P. aeruginosa*, в том числе циркулирующие на одном предприятии, обладают разной фагочувствительностью, вплоть до резистентности, что показывает нецелесообразность применения синегнойного фага, т.к. процедуры элиминации *P. aeruginosa* с использованием бактериофагов требуют всякий раз оценки эффективности препарата.

Показана различная степень антагонистической активности разных видов молочнокислых бактерий и грибковой кефирной закваски и их метаболитов относительно штаммов *P. aeruginosa*. Полученные результаты позволяют рассматривать молочнокислые бактерии и грибковую кефирную закваску в качестве перспективных антимикробных агентов относительно *P. aeruginosa*. Исходя из установленной высокой антагонистической активности штамма *Lactobacillus helveticus* NK1, представляло интерес изучение возможных механизмов его ингибирующего действия на *P. aeruginosa*. Сравнительный протеомный и метаболомный анализ образцов монокультуры *L. helveticus* NK1 и при сокультивировании с *P. aeruginosa* 25668 показал различия в белковых и метаболитных профилях лактобациллы. Активно синтезировались белки, влияющие на защиту от стресса, усиливались метаболические пути. Это подтверждает снижение рисков развития *P. aeruginosa* при использовании заквасочных микроорганизмов.

На третьем этапе изучали эффективность элиминации *P. aeruginosa* в зависимости от температурно-временных параметров среды при исследовании пастеризации и хранения молока. Изучали 3 температурных режима пастеризации молока: $(76\pm 2)^\circ\text{C}$ – для питьевого молока; $(72\pm 2)^\circ\text{C}$ применяемый в сыроделии и $(85\pm 2)^\circ\text{C}$ – при производстве кисломолочных продуктов. Подтверждены литературные данные о способности отдельных клеток *P. aeruginosa* выдерживать тепловую обработку, предусмотренную технологическими режимами. Показана возможность реактивации покоящихся форм *P. aeruginosa* при холодильном хранении при режиме пастеризации $(76\pm 2)^\circ\text{C}$ 20 сек. Установлена эффективность элиминации клеток *P. aeruginosa* при температуре $(72\pm 2)^\circ\text{C}$ и выдержке 15 мин, при температуре $(76\pm 2)^\circ\text{C}$ и выдержке 5 мин и более, при температуре $(85\pm 2)^\circ\text{C}$ и выдержке 10 мин. Доказано, что наиболее высокие риски существуют для сыроделия – температура $(72\pm 2)^\circ\text{C}$ недостаточно эффективна для элиминации *P. aeruginosa*; а психротрофность позволяет ей развиваться при холодильном хранении. Менее значимы риски при производстве кисломолочных продуктов.

На четвертом этапе изучали чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к действию биоцидных препаратов. Установлена разная чувствительность штаммов к средствам на основе дихлоризоцианурата натрия (ДХЦН). Эффективное биоцидное действие отмечено только при повышенной концентрации. Показана высокая выживаемость клеток *P. aeruginosa* в растворе ПАВ – аминоксида, сопровождавшаяся изменениями в характере роста и морфологии клеток. Эту особенность *P. aeruginosa* необходимо учитывать при разработке санитарных мероприятий для недопущения рисков вторичного обсеменения.

Таким образом, основные положения диссертации подтверждены результатами проведенных экспериментов и получили обоснование в тексте работы.

Практическая значимость диссертационной работы

Диссертация Кишиловой С.А. имеет несомненную практическую значимость. На основании проведенных исследований разработан СТО ВНИМИ (МР) № 00419785-084-2025 «Оптимизация контроля *Pseudomonas aeruginosa* при производстве молочной продукции» и предложен дополнительный контроль критических точек при риске контаминации синегнойной палочкой. Проведена апробация разработанного СТО на ряде предприятий молочной промышленности, в том числе ООО «Итальянские традиции», ОАО «Брянский молочный комбинат» и АО «Зеленоградское». В Приложении представлены титульный лист разработанной документации СТО ВНИМИ (МР) № 00418785-084-2025 и Акты апробации разработанного СТО на предприятиях молочной промышленности.

Апробация работы

Основные положения и результаты работы представлены и доложены на 4-х всероссийских и международных научно-практических конференциях.

По результатам работы опубликовано 14 работ, в том числе 6 из списка ВАК и 4 в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus. Диссертация и автореферат соответствуют требованиям положения «О порядке присуждения ученых степеней».

Вопросы и замечания при анализе диссертации

В целом, впечатление от диссертационной работы Кишиловой С.А. положительное, в то же время к рассматриваемой диссертационной работе можно высказать несколько незначительных замечаний и пожеланий.

1. В настоящее время для точной видовой идентификации микроорганизмов применяют сочетание стандартных микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов. В работе для идентификации выделенных бактериальных изолятов было бы желательно провести генетическое подтверждение видовой принадлежности по гену 16S рРНК.

2. В подразделе работы 3.2 «Изучение, морфологических, культуральных, биохимических свойств выделенных штаммов» представлены только качественные и полуколичественные характеристики с использованием визуальной оценки полученных результатов. Проводилось ли определение количественных характеристик ферментативных активностей бактериальных изолятов с использованием соответствующих субстратов? Определяли ли значения МИК для разных классов антибиотиков при тестировании антибиотикорезистентности выделенных изолятов *P. aeruginosa*? Проводилось ли изучение скорости роста изолятов *P. aeruginosa* при разных температурах? В случае отрицательного ответа необходимо пояснение.

3. На рисунке 6 (стр. 60) представлено фото только 2-х выделенных изолятов (#42 и #47) в сравнении с референсным штаммом синегнойной палочки АТСС 25668, а не всех 4-х исследованных в работе (#42, 47, М1 и В2). На фото также отсутствует расшифровка лунок с антибиотиками.

4. Рисунок 7 с результатами исследования ферментативной активности полученных изолятов *P. aeruginosa* с использованием коммерческой тест-системы API[®]ZYM было бы логичнее представить в Приложении, или же представить рисунок на отдельной странице без нарушения его целостности (стр. 61-62).

5. В тексте при описании результатов протеолитической активности изолятов *P. aeruginosa*, представленных на рисунках 8–10 (стр. 63-64), используются термины протеазная (протеазы) и пептидазная (пептидазы) активности/ферменты. Однако в условиях проводимого эксперимента (визуальная оценка зон просветления на молочном агаре) нельзя точно определить тип активности – протеазная или пептидазная, можно лишь говорить об общей протеолитической активности бактерий в отношении казеина молока.

6. Результаты изучения действия синегнойного бактериофага на изоляты *P. aeruginosa*, представленные на рисунках 11–20, по сути, иллюстрируют результаты таблиц 5 и 6 (стр. 66 и 71 соответственно) и их логичнее было бы представить в Приложении. Оценка чувствительности изолятов к литическому действию бактериофага также дается качественная. Проводилось ли изучение кривых роста изолятов *P. aeruginosa* в присутствии бактериофага?

7. Необходимо пояснить, почему в работе была изучена антимикробная активность разных штаммов *Lactobacillus helveticus* (рис. 21), *Lacticaseibacillus paracasei* (рис. 22), *Streptococcus thermophilus* (рис. 23) и *Lactococcus lactis* (рис. 24) только в отношении референсного тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 25668. Далее антимикробная активность лактобактерий в отношении выделенных в работе 4-х изолятов (#42, 47, M1 и B2) изучалась только на примере наиболее активных штаммов лактобактерий в отношении тест-штамма синегнойной палочки (#25668). Между тем как показаны отличия фенотипических и биохимических свойств выделенных изолятов и референсного штамма *P. aeruginosa*, что может показать отличия и в антимикробной активности лактобактерий в отношении разных изолятов синегнойной палочки. Более того штаммоспецифичность действия лактобактерий в отношении разных изолятов *P. aeruginosa* показана в данной работе на примере со-культивирования с *Lactobacillus helveticus* NK1 (рис. 29-30). *L. helveticus* NK1 показал более выраженную антимикробную активность в отношении штамма *P. aeruginosa* 47 (рис. 30), между тем как в отношении тест-штамма *P. aeruginosa* 25668 наибольшую эффективность продемонстрировал штамм *L. helveticus* Ббп4 (рис. 21). В связи с чем не совсем очевиден выбор пары *P. aeruginosa* 25668 и *L. helveticus* NK1 для более детального изучения молекулярного механизма антимикробного действия лактобациллы с использованием протеомики и метаболомики.

8. На стр. 81 и 82 нумерация рисунков повторяется – оба рисунка имеют нумерацию #29.

Однако отмеченные недостатки носят частный характер или являются пожеланиями и ни в коей мере не снижают общей положительной оценки диссертации.

Использованные в работе Кишиловой С.А. современные методы исследований подтверждают высокий научно-методический уровень рассматриваемой диссертации. Результаты, полученные диссертантом, достоверны, сформулированные положения и выводы обоснованы. Данные, представленные в диссертации, неоднократно докладывались на представительных научных конференциях. Опубликованные печатные работы и автореферат правильно отражают содержание рассматриваемой диссертации.

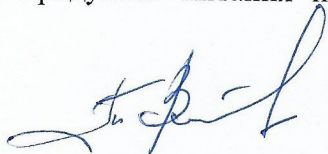
Заключение

Таким образом, можно сделать заключение, что диссертация Кишиловой Светланы Анатольевны «Разработка методических подходов к оптимизации контроля *Pseudomonas aeruginosa* на молочных производствах», представленная на соискание ученой степени кандидата технических наук, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для

области пищевых производств, касающейся обеспечения безопасности продуктов питания, а именно разработке средств для противодействия бактерии *P. aeruginosa* и выявлению критических точек для предотвращения рисков контаминации молочной продукции синегнойной палочкой.

По актуальности, объёму проведенных исследований, научно-методическому уровню, новизне и практической значимости полученных результатов настоящая работа полностью соответствует требованиям ВАК РФ п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальностям 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ и 4.3.3. Пищевые системы.

Официальный оппонент
Федорова Татьяна Васильевна

 24.03.2026

Адрес: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2.

Раб. тел.: +7 (495) 952-87-99; моб. 8(905)506-99-77;

факс 8(495)954-27-32; эл. почта: fedorova_tv@mail.ru

Федеральное государственное учреждение

«Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН),

Заведующий лабораторией молекулярных основ биотрансформаций,

Кандидат технических наук по специальности 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ (сейчас 2.7.1.).

Подпись Федоровой Т.В. заверяю

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН

К.б.н. Орловский Александр Федорович

Тел.: 8(495)954-40-07; эл. почта: orlovsky@inbi.ras.ru



