

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського  
Міністерства охорони здоров'я України  
Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**П'ЯТКОВСЬКИЙ ТАРАС ІВАНОВИЧ**

УДК 579.61:616-008.97:614.48

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ**  
**АЛЬТЕРНАТИВНИХ МЕТОДІВ ІНАКТИВАЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ НА**  
**ОСНОВІ КОМБІНУВАННЯ НЕТЕРМІЧНИХ І ТЕРМІЧНИХ ФАКТОРІВ**  
**ВПЛИВУ**

03.00.07 – мікробіологія

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Т.І. П'ятковський

Вінниця-2026

Присвячується моєму батькові.

Автор хоче висловити подяку професорам Sudhir Sastry, Ahmed Yousef, а також другу та науковцю Миколі Шинкарику.

## АНОТАЦІЯ

*П'ятковський Т.І.* Мікробіологічне обґрунтування ефективності альтернативних методів інактивації мікроорганізмів на основі комбінування нетермічних і термічних факторів впливу. – Кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія (22 «Охорона здоров'я»). – Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, Тернопіль, 2025; Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Вінниця, 2026.

Дисертація присвячена вирішенню актуальної наукової проблеми оптимізації застосування нетермічних методів інактивації мікроорганізмів та бактеріальних спор на основі пілотних та мікробіологічних досліджень.

На основі аналізу наукової літератури показано, що нетермічні методи інактивації мікроорганізмів привертають все більшу увагу в різних галузях промисловості, зокрема в медицині, косметології та харчовій промисловості. Ці методи пропонують ряд переваг у порівнянні з традиційними, включаючи ефективність проти антибіотикорезистентних штамів, підвищену безпеку та краще збереження якості харчових продуктів, а також екологічність. Актуальними є розробка нових методик застосування нетермічних методів інактивації мікроорганізмів, дослідження щодо оптимізації комбінування цих методів та вдосконалення підходів до їх застосування.

З метою вивчення ефективності рідких дезінфектантів проти *E. coli* O157:H7, збудника гемолітико-уремічного синдрому та тяжких харчових отруєнь у людей, та епіфітних бактерій листя шпинату інокулювали бактеріальною суспензією та протягом 30 хвилин обробляли інокульовані та неінокульовані зразки розчином гіпохлориту натрію та дезінфектантами, які містять органічні кислоти. Дезінфектанти застосовували шляхом розпилення, занурення та вакуумного просочення. Було виявлено, що дезінфікуючі засоби були менш ефективними

проти епіфітної флори листків шпинату порівняно з інокульованими мікроорганізмами, зменшуючи кількість епіфітних бактерій на 1,4-1,7 lg КУО/г. Тип дезінфікуючого засобу не впливав на результат знезараження листя шпинату при обприскуванні, даючи приблизно однаковий ефект. Це можна пояснити наявністю інтерналізованої популяції мікроорганізмів, що підтверджується експериментами з поверхневою дезінфекцією листків. Найефективнішим у знешкодженні *E. coli* O157:H7 виявився метод занурення з використанням дезінфікуючого засобу Pro-San L, цим методом вдалося інактивувати 4,4 lg КУО/г, що знижує інфекційний ризик для споживача, враховуючи низьку інфікуючу дозу цього патогену. Розпилення цього ж дезінфектанта знешкоджувало 2,6 lg КУО/г, тоді як метод вакуумного просочення був менш ефективним ніж занурення (3,3 lg КУО/г) через посилення інтерналізації бактерій і пошкодження тканини листків, що може сприяти збереженню життєздатності збудника в глибоких тканинах продукту. Подовження часу дії дезінфікуючого засобу Pro-San L до 3 діб не підвищувало ефективності дезінфекції, але призводило до прогресуючого пошкодження листя шпинату.

На підставі досліджень ефекту вакууму на поширення мікроорганізмів всередині вакуумної камери доведено, що під час вакуумного охолодження можливе бактеріальне забруднення камер і проникнення бактерій у товщу листків зелені. Бактерії, що знаходяться зовні вакуумної камери у сухому стані, можуть переноситися всередину камери і поширюватися під час відновлення тиску до атмосферного, що створює умови для неконтрольованого епідемічного поширення патогенів у промислових масштабах. Крім того, встановлено, що кипіння вологої органічної речовини у камері, спричинене вакуумом, може поширювати контамінацію на інші ділянки камери. Інтерналізація бактерій у товщу листків зелені відбувається інтенсивніше при нижчому тиску та повільнішому відновленні тиску до атмосферного. Так, при досягненні вакууму 0,6 кПа та відновленні тиску до атмосферного зі швидкістю 0,351 стандартних літра за хвилину у листок шпинату інтерналізувалися 2,64 lg КУО/г з початкових 6,92 lg КУО/г *E. coli* K12. Така інтерналізація становить особливу небезпеку для громадського здоров'я,

оскільки мікроорганізми всередині рослинних тканин захищені від дії поверхневих антисептиків та шлункового бар'єру людини, що підвищує ризик інфікування.

Доведено, що ефективність застосування газоподібного озону залежить від співвідношення маси продукту до об'єму газу. Його ефективність проти *E. coli* O157:H7 підвищується після вакуумного охолодження, яке видаляє рідину з поверхні продукту і дозволяє озону проникнути глибше. Середня інактивація *E. coli* O157:H7 після вакуумного охолодження становила 2,5 lg КУО/г, у порівнянні з 1,9 lg КУО/г ( $p < 0,05$ ), які досягалися при застосуванні газоподібного озону при атмосферному тиску. Продемонстровано, що застосування озону на етапі вакуумного охолодження дозволяє йому проникнути глибше у пори та щілини на листках, значно зменшуючи популяцію життєздатних інтерналізованих бактерій. Після такої обробки газоподібним озonom початкову кількість інтерналізованих бактерій, яка становила 3,3 lg КУО/г, вдалося зменшити до 2,2 lg КУО/г ( $p < 0,05$ ). Встановлено, що короткочасна обробка високою концентрацією озону з подальшою тривалою обробкою низькою концентрацією озону має синергічний ефект на інактивацію *E. coli* O157:H7, досягнувши інактивації на 3,8 lg КУО/г більшої ( $p < 0,05$ ) на третю добу обробки у порівнянні з тривалою обробкою низькою концентрацією без початкової бустерної обробки.

Встановлено, що для досягнення ефективності рідкий дезінфікуючий засіб потрібно застосовувати у достатній кількості (~ 23 % від ваги листа шпинату) та витримувати не менше 30 хвилин. Така обробка дозволила знешкодити 2,3 lg КУО/г *E. coli* K12 і збільшення кількості дезінфектанта до 47 % ваги продукту не дозволило статистично достовірно збільшити кількість інактивованих бактерій. При комбінуванні рідких і газоподібних дезінфектантів майже у всіх випадках спостерігався негативний синергічний ефект. Найменш ефективним серед досліджуваних комбінованих протоколів обробки було застосування спрею Pro-San L після обробки озonom, введеним під вакуумом, з наступним негайним підвищенням тиску системи до 68,9 кПа. Показано, що ефективність цієї комбінованої обробки була приблизно такою ж (зменшення популяції бактерій на 2,7 lg КУО/г), як і одноразове застосування рідкого дезінфікуючого засобу ( $p >$

0,05). Спостережувана негативна синергія пов'язана з індукованою вакуумом інтерналізацію бактерій глибше в тканину листя, після якої такі бактерії менше піддаються впливу дезінфікуючої рідини. Обприскування Pro-San L з наступною обробкою озоном при атмосферному тиску з тиском у ємності 68,9 кПа протягом 30 хвилин призвело до зменшення популяції *E. coli* O157:H7 на 3,4 lg КУО/г, що було значно більшим, ніж окреме застосування одного дезінфікуючого засобу ( $p < 0,05$ ), але набагато меншим, ніж сума кількості інактивованих бактерій, отриманих при індивідуальному застосуванні рідких і газоподібних дезінфікуючих засобів. Ця негативна синергія пов'язана з утворенням плівки на поверхнях продуктів рідким дезінфікуючим засобом, що запобігає контакту озону з бактеріями. Адитивний ефект обох дезінфектантів (газоподібного озону та рідкого Pro-San L) спостерігався лише тоді, коли після обробки рідким засобом застосовувався газоподібний озон під час вакуумного охолодження. Підвищення тиску в ємності для обробки до 68,9 кПа покращувало ефективність, сприяючи проникненню газу до збудника. Така обробка дозволила інактивувати 3,9 lg КУО/г *E. coli* O157:H7. Доведено, що поєднання розпилення рідкого дезінфектанта з подальшою довготривалою обробкою газоподібним озоном зменшувало кількість *E. coli* O157:H7 нижче рівня детекції (інактивація понад 6 lg КУО/мл) після першого дня застосування та забезпечувало кращий вигляд листя шпинату порівняно з довготривалим застосуванням рідких та газоподібних дезінфікуючих засобів окремо.

Дослідження показали, що обробка 500 мл джерельної води електролітичним методом протягом двох і п'яти хвилин створює водні розчини озону з концентраціями 0,74 та 1,72 мг/л відповідно. Ефективність дезінфекції води при такій обробці залежала від початкової концентрації мікроорганізмів у воді та тривалості їх контакту з озоном та активними формами кисню. Найменш забруднена мікроорганізмами (до 1,5 lg КУО/мл) водопровідна вода була повністю очищена. Джерельна вода з середньою концентрацією мікроорганізмів 2,7 lg КУО/мл була ефективно дезінфікована за допомогою 5-хвилинної обробки з додатковою 5-хвилинною експозицією. У воді з відкритої водойми, яка містила 3,8

1g КУО/мл, не вдалося нейтралізувати всі бактерії. Після 5 хвилин обробки та додаткової 10-хвилинної експозиції було інактивовано 1,9 1g КУО/мл. Довготривалий ефект обробки джерельної води протягом 5 хвилин показав відсутність бактеріального росту чи зміни кольору води протягом місяця після обробки, що запобігає ризику виникнення спалахів кишкових інфекцій при її тривалому зберіганні.

Концентрація озону була достовірно вищою у водопровідній воді  $((2,98 \pm 0,59)$  мг/л), ніж у джерельній  $((2,00 \pm 0,42)$  мг/л), що пов'язано з вищим вмістом мінералів, які покращують електроліз. У присутності бактерій спостерігалось прискорене зниження концентрації озону, що свідчить про його активний розпад у присутності мікроорганізмів та органічних речовин.

Після обробки озонованою водою (до 4 мг/л) клінічних штамів *S. aureus* та *E. coli* протягом 15 хвилин виявляли сублетальні пошкодження бактеріальних клітин у цих культурах. До 89,2 % популяції *S. aureus* та до 98,6 % *E. coli* були сублетально пошкодженими. Такий стан бактеріальної популяції є важливим для клінічної практики, оскільки сублетально пошкоджені патогени втрачають здатність до ефективної колонізації слизових оболонок та ранових поверхонь, та стають вразливими до дії факторів гуморального імунітету і антибактеріальних препаратів.

Для оцінки впливу помірного електричного поля на суспензію спор *B. subtilis* її піддали обробці при 300 В/см у скляній камері  $1 \times 0,9$  см з електродами діаметром 0,9 см. Підтверджено, що обробка суспензії спор помірним електричним полем у поєднанні з помірною сублетальною термічною обробкою при 55, 65 і 75 °С може достовірно знизити концентрацію спор *B. subtilis*. Обробка помірним електричним полем самостійно була малоефективною, продемонструвавши інактивацію 0,6 1g КУО/мл при початковій концентрації спор у суспензії  $\sim 7$  1g КУО/мл. Комбінована обробка електричним полем і термічною обробкою при 55 °С тривалістю 20, 40 та 60 хвилин знижувала концентрацію спор на 0,7 1g КУО/мл, 1,3 1g КУО/мл та 1,8 1g КУО/мл відповідно. Така ж обробка при 65 °С дала результат у 0,8 1g КУО/мл, 1,4 1g КУО/мл та 2,0 1g КУО/мл інактивованих спор. Підвищення температури до 75 °С

дозволило інактивувати 0,9 lg КУО/мл, 1,9 lg КУО/мл та 2,5 lg КУО/мл спор протягом 20, 40 та 60 хвилин відповідно, що вказує на потенціал методу в розробці режимів «холодної стерилізації» для запобігання важким харчовим інтоксикаціям та госпітальним інфекціям.

Також встановлено, що обробка сирих курячих яєць, інокульованих *E. coli* K12, помірним електричним полем при 15,7 В/см та температурі 55 °С, знижує популяцію мікроорганізмів всередині яєць і спричиняє сублетальні пошкодження бактеріальних клітин, що значно полегшує їхню наступну елімінацію імунною системою людини при випадковому споживанні. Для цього яйця поміщали між двома електродами розміром 8,9 × 9,3 см, розташованими на відстані 7,6 см один від одного, заповнювали водяну баню водопровідною водою, обробку проводили протягом 28 хвилин. При початковій концентрації популяції 5,5-6 lg КУО/г така обробка знешкоджувала ~ 4,4 lg КУО/г, що на 0,9 lg КУО/г більше порівняно з термічною обробкою при 55 °С у водяній бані. Таке зниження бактеріального навантаження є важливим для профілактики сальмонельозу та інших антропоозоозів, зберігаючи поживну цінність курячих яєць.

Було вперше доведено, що вимірювання електропровідності суспензії *Listeria innocua* при її обробці високим гідростатичним тиском 300, 400 та 500 МПа можна використовувати для оцінки ступеня пошкодження клітин. Для цього суспензію штаму *Listeria innocua* ATCC 33090 у кількості ~ 10 lg КУО/мл, уникаючи утворення бульбашок повітря, герметично запаювали у обробну камеру. Камера була обладнана двома титановими електродами з платиновим покриттям 0,5 × 0,8 см та мала гнучку поліетиленову частину, яка забезпечувала передачу тиску до зразка. Результати досліджень засвідчили, що електропровідність бактеріальної суспензії зростає зі збільшенням кількості летально ушкоджених клітин. Під час циклу зниження тиску збільшення електропровідності не спостерігалось, що свідчить про те, що пошкодження клітин *Listeria innocua* відбувалося переважно під час підвищення тиску та його утримання.

Встановлено, що ефективність обробки імпульсним електричним полем залежить від його напруженості, причому вища напруга призводить до швидшої

інактивації. Так, при 10 В/см зменшення популяції мікроорганізмів на один логарифм тривало 0,5 с. Збільшення напруги до 20 В/см зменшило час для досягнення інактивації 1 lg КУО/мл у суспензії *Listeria innocua* до 1 мс. При 30 кВ/см для цього було потрібно лише 0,1 мс. Послідовне застосування високого гідростатичного тиску та імпульсного електричного поля здебільшого демонструвало адитивні ефекти. Однак при одночасному застосуванні високого гідростатичного тиску та імпульсного електричного поля спостерігали синергічний ефект із понад 3 lg КУО/мл інактивації. Можливим поясненням може бути синергізм між механічними стискаючими та електричними силами, які одночасно діють на клітинну мембрану, що призводить до летального пошкодження клітини. Одночасна обробка цими методами найбільше збільшувала електропровідність, що свідчило про значний витік внутрішньоклітинних небілкових компонентів і підтверджувало пошкодження мембрани бактерійних клітин. Комбінація обробки високим гідростатичним тиском і ультразвуком демонструвала синергічний ефект, коли обробка ультразвуком проводилася після високого гідростатичного тиску (понад 3 lg КУО/мл інактивації), і адитивний ефект, коли ультразвукова обробка передувала гідростатичному тиску (до 2 lg КУО/мл інактивації).

Підтверджено, що триразова обробка суспензії спор високим гідростатичним тиском ефективніше інактивує спори *B. subtilis*, у порівнянні з одноразовою обробкою за тривалістю трьох коротких обробок. Для цього суспензії спор у кількості ~ 7 lg КУО/мл герметично запаювали у поліетиленові пакети об'ємом по 3 мл і піддавали обробці високим гідростатичним тиском 200 та 500 МПа тривалістю 3 та 10 хвилин. Найбільшої інактивації, а саме 5,8 lg КУО/мл було досягнуто при 500 МПа та 60 °С протягом трьох циклів по 3 хвилини кожен. Одноразова обробка при 500 МПа та 60 °С протягом 10 хвилин знешкодила на 1,2 lg КУО/мл менше. Встановлено, що інтенсивніша інактивація спор *B. subtilis* при багаторазовій обробці високим гідростатичним тиском не пов'язана з інактивацією літичних ферментів кортексу чи деградацією малих кислоторозчинних білків, а зумовлена механічним руйнуванням оболонки спори та цитоплазматичної мембрани.

**Ключові слова:** інактивація мікроорганізмів, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, ендоспори, дезінфектанти, озон, високий гідростатичний тиск, помірне електричне поле, імпульсне електричне поле, ультразвук.

## SUMMARY

*Pyatkovskyy T.I.* Microbiological validation of the effectiveness of alternative methods for inactivating microorganisms using a combination of non-thermal and thermal factors. – Manuscript of qualifying research work.

Dissertation for the degree of Doctor of Medical Sciences, specialty 03.00.07 – Microbiology (22 "Health Care") – I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2025; National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, 2026.

The dissertation is devoted to solving the actual scientific problem of optimizing the use of non-thermal methods of inactivation of microorganisms and bacterial spores based on pilot and microbiological studies.

Based on the analysis of scientific literature, non-thermal methods of microbial inactivation are attracting increasing attention in various industries, including medicine, cosmetics, and food. These methods offer several advantages over conventional methods, such as efficacy against antibiotic-resistant strains, increased safety, better preservation of food quality, and environmental friendliness. It is important to develop new methods of non-thermal microbial inactivation and conduct research to optimize the combination of these methods and improve approaches to their application.

To study the effectiveness of liquid disinfectants against *E. coli* O157:H7, the causative agent of hemolytic-uremic syndrome and severe food poisoning in humans, and epiphytic bacteria, spinach leaves were inoculated with a bacterial suspension. Both inoculated and uninoculated samples were treated for 30 minutes with a solution of sodium hypochlorite and disinfectants containing organic acids. The disinfectants were applied by spraying, immersion, and vacuum impregnation. It was found that the disinfectants were less effective against the epiphytic flora of spinach leaves compared to

inoculated microorganisms, reducing the number of epiphytic bacteria by 1.4-1.7 lg CFU/g. The type of disinfectant did not affect the result of disinfection during spraying, yielding approximately the same effect. This can be explained by the presence of an internalized population of microorganisms, as confirmed by experiments with surface disinfection of leaves. The most effective method for neutralizing *E. coli* O157:H7 was immersion using Pro-San L disinfectant, which inactivated 4.4 lg CFU/g, reducing the risk of infection for consumers, given the low infectious dose of this pathogen. Spraying the same disinfectant neutralized 2.6 lg CFU/g, while the vacuum impregnation method was less effective than immersion (3.3 lg CFU/g) due to increased bacterial internalization and damage to leaf tissue, which may contribute to the preservation of the pathogen's viability in the deep tissues of the product. Extending the action time of Pro-San L disinfectant to 3 days did not increase disinfection efficiency but led to progressive damage to the spinach leaves.

Based on studies of the effect of vacuum on the spread of microorganisms inside the vacuum chamber, it has been proven that during vacuum cooling, bacterial contamination of the chambers and the penetration of bacteria into the thickness of green leaves are possible. Bacteria that are outside the vacuum chamber in a dry state can be transferred to the inside of the chamber and spread when the pressure is restored to atmospheric levels, creating conditions for uncontrolled epidemic spread of pathogens on an industrial scale. In addition, it was found that vacuum-induced boiling of moist organic matter in the chamber can spread contamination to other areas of the chamber. Internalization of bacteria into the leaves occurs more intensively at lower pressure and with slower recovery of pressure to atmospheric levels. Thus, upon reaching a vacuum of 0.6 kPa and restoring the pressure to atmospheric at a rate of 0.351 standard liters per minute, 2.64 lg CFU/g from the initial 6.92 lg CFU/g of *E. coli* K12 were internalized into a spinach leaf. This internalization poses a particular danger to public health, as microorganisms inside plant tissues are protected from the effects of surface antiseptics and the human gastric barrier, which increases the risk of infection.

It has been proven that the efficiency of using gaseous ozone depends on the ratio of the mass of the product to the volume of the gas. Its effectiveness against *E. coli*

O157:H7 increases after vacuum cooling, which removes liquid from the surface of the product and allows ozone to penetrate deeper. The average inactivation of *E. coli* O157:H7 after vacuum cooling was 2.5 lg CFU/g, compared to 1.9 lg CFU/g ( $p < 0.05$ ) achieved with the use of gaseous ozone at atmospheric pressure. It has been demonstrated that the application of ozone during vacuum cooling allows it to penetrate deeper into the stomata and crevices of the leaves, significantly reducing the population of viable internalized bacteria. After this treatment with gaseous ozone, the initial amount of internalized bacteria, which was 3.3 lg CFU/g, was reduced to 2.2 lg CFU/g ( $p < 0.05$ ). It was established that short-term treatment with a high concentration of ozone followed by long-term treatment with a low concentration of ozone has a synergistic effect on the inactivation of *E. coli* O157:H7, achieving an inactivation of additional 3.8 lg CFU/g ( $p < 0.05$ ) on the third day of treatment compared to long-term low-concentration treatment without initial booster treatment.

It has been established that, to be effective, the liquid disinfectant must be applied in sufficient quantity (~23 % of the weight of the spinach leaves) and for at least 30 minutes. Such treatment neutralized 2.3 lg CFU/g of *E. coli* K12, and increasing the amount of disinfectant to 47 % of the product weight did not result in a statistically significant increase in the number of inactivated bacteria. When combining liquid and gaseous disinfectants, a negative synergistic effect was observed in almost all cases. The least effective of the combination treatment protocols studied was the application of Pro-San L spray after treatment with ozone injected under vacuum followed by an immediate system pressurization to 68.9 kPa. It was shown that the effectiveness of this combined treatment was approximately the same (2.7 lg CFU/g reduction in bacterial population) as a single application of a liquid disinfectant ( $p > 0.05$ ). The observed negative synergy is due to the vacuum-induced internalization of bacteria deeper into the leaf tissue, making them less exposed to the liquid disinfectant. Spraying Pro-San L followed by ozone treatment at atmospheric pressure with a vessel pressure of 68.9 kPa for 30 minutes resulted in a 3.4 lg CFU/g reduction in the population of *E. coli* O157:H7, which was significantly greater than a single application of single disinfectant ( $p < 0.05$ ), but much less than the sum of the inactivated bacteria obtained by individual applications of liquid

and gaseous disinfectants. This negative synergy is due to the formation of a film on the surfaces of the products by the liquid disinfectant, which prevents the contact of ozone with bacteria. The additive effect of both disinfectants (gaseous ozone and liquid Pro-San L) was observed only when gaseous ozone was applied during vacuum cooling after liquid sanitizer treatment. Increasing the pressure in the treatment vessel to 68.9 kPa improved efficiency by facilitating gas penetration to the pathogen. This treatment made it possible to inactivate 3.9 lg CFU/g of *E. coli* O157:H7. The combination of liquid disinfectant spraying followed by long-term treatment with gaseous ozone has been shown to reduce the number of *E. coli* O157:H7 below the level of detection (inactivation of more than 6 lg CFU/ml) after the first day of application and to provide a better appearance of spinach leaves compared to long-term application of liquid and gaseous ozone disinfectants separately.

The studies have shown that electrolytic treatment of 500 ml of spring water for two and five minutes produces aqueous ozone solutions with concentrations of 0.74 and 1.72 mg/L, respectively. The effectiveness of water disinfection by electrolytic treatment depended on the initial concentration of microorganisms in the water and the duration of their contact with ozone. The least contaminated tap water (up to 1.5 lg CFU/ml) was completely purified. Spring water with an average concentration of microorganisms of 2.7 lg CFU/ml was effectively disinfected using 5-minute treatment with an additional 5-minute exposure. In water from an open reservoir, which contained 3.8 lg CFU/ml, it was not possible to neutralize all bacteria. After 5 minutes of treatment and an additional 10-minute exposure, 1.9 lg CFU/ml was inactivated. The long-term effect of treating spring water for 5 minutes showed no bacterial growth or color change of the water for a month after treatment, preventing the risk of outbreaks of intestinal infections during long-term storage.

Ozone generation was significantly higher in tap water ( $(2.98 \pm 0.59)$  mg/L) compared to spring water ( $(2.00 \pm 0.42)$  mg/L), likely due to higher mineral content enhancing electrolysis efficiency. In decomposition experiments, ozone degraded faster in the presence of *S. aureus*, confirming that microbial and organic presence accelerates ozone consumption.

After treating clinical strains of *S. aureus* and *E. coli* with ozonated water (up to 4 mg/L) for 15 minutes, sublethal damage to bacterial cells was observed. Up to 89.2% of the *S. aureus* population and up to 98.6% of *E. coli* cells were affected. This state of the bacterial population is important for clinical practice, since sublethally damaged pathogens lose their ability to effectively colonize mucous membranes and wound surfaces and become vulnerable to the effects of humoral immunity and antibacterial drugs.

To evaluate the effect of a moderate electric field on the spore suspension of *B. subtilis*, it was treated at 300 V/cm in a 1 × 0.9 cm glass chamber with electrodes of 0.9 cm diameter. It was confirmed that the treatment of the spore suspension with a moderate electric field, in combination with moderate sublethal heat treatment at 55, 65, and 75 °C, could significantly reduce the concentration of *B. subtilis* spores. Treatment with a moderate electric field alone was ineffective, showing an inactivation of 0.6 lg CFU/ml at an initial spore concentration of ~7 lg CFU/ml. Combined electric field and heat treatment at 55 °C for 20, 40, and 60 minutes reduced the spore concentration by 0.7 lg CFU/ml, 1.3 lg CFU/ml, and 1.8 lg CFU/ml, respectively. The same treatment at 65 °C resulted in inactivation of 0.8 lg CFU/ml, 1.4 lg CFU/ml, and 2.0 lg CFU/ml. Increasing the temperature to 75 °C enabled the inactivation of 0.9 lg CFU/ml, 1.9 lg CFU/ml, and 2.5 lg CFU/ml spores within 20, 40, and 60 minutes, respectively, indicating the potential of the method in developing “cold sterilization” modes to prevent severe food poisoning and hospital infections.

It has also been found that treatment of raw chicken eggs inoculated with *E. coli* K12 with a moderate electric field at 15.7 V/cm and a temperature of 55 °C reduces the population of microorganisms inside the eggs and causes sublethal damage to bacterial cells, which greatly facilitates their subsequent elimination by the human immune system in case of accidental consumption. For this, the eggs were placed between two electrodes measuring 8.9 × 9.3 cm, located at a distance of 7.6 cm from each other. The water bath was filled with tap water, and the treatment was carried out for 28 minutes. At an initial population concentration of 5.5-6 lg CFU/g, this treatment neutralized approximately 4.4 lg CFU/g, which is 0.9 lg CFU/g more compared to heat treatment at 55 °C in a water

bath. This reduction in bacterial load is important for the prevention of salmonellosis and other anthroozoonoses while preserving the nutritional value of chicken eggs.

It was demonstrated for the first time that the measurement of the electrical conductivity of the suspension of *Listeria innocua* during its treatment with high hydrostatic pressure of 300, 400, and 500 MPa could be used to assess the degree of cell damage. To accomplish this, the suspension of the *Listeria innocua* ATCC 33090 strain, amounting to approximately 10 lg CFU/ml was hermetically sealed in the processing chamber avoiding the formation of air bubbles. The chamber was equipped with two platinum-coated titanium electrodes measuring 0.5 × 0.8 cm and had a flexible polyethylene part that provided pressure transfer to the sample. The research results showed that the electrical conductivity of the bacterial suspension increases with an increase in the number of lethally damaged cells. No increase in electrical conductivity was observed during the depressurization cycle, suggesting that damage to *Listeria innocua* cells occurred primarily during the pressurization and holding periods.

It was established that the effectiveness of treatment with a pulsed electric field depends on its strength, with higher voltages leading to faster inactivation. For instance, at 10 V/cm, reducing the population of microorganisms by one logarithm took 0.5 seconds. Increasing the voltage to 20 V/cm reduced the time to achieve 1 lg CFU/ml inactivation in a *Listeria innocua* suspension to 1 millisecond. At 30 kV/cm, this required only 0.1 milliseconds. The sequential application of high hydrostatic pressure and a pulsed electric field mostly showed additive effects. However, when high hydrostatic pressure and a pulsed electric field were applied simultaneously, a synergistic effect was observed with more than 3 lg CFU/ml inactivation. A possible explanation could be the synergism between mechanical compressive and electrical forces acting simultaneously on the cell membrane, resulting in lethal cell damage. Simultaneous treatment with these methods increased electrical conductivity the most, indicating significant leakage of intracellular non-protein components and confirming damage to the bacterial cell membranes. The combination of high hydrostatic pressure and sonication showed a synergistic effect when sonication was performed after high hydrostatic pressure

(resulting in more than 3 lg CFU/ml inactivation) and an additive effect when sonication preceded hydrostatic pressure (up to 2 lg CFU/ml inactivation).

It has been confirmed that triple treatment of spore suspension with high hydrostatic pressure more effectively inactivates *B. subtilis* spores compared to a single treatment of the same total duration. For this, spore suspensions of approximately 7 lg CFU/ml were hermetically sealed in polyethylene bags with a volume of 3 ml and subjected to high hydrostatic pressure treatment of 200 and 500 MPa for 3 and 10 minutes. The highest inactivation of 5.8 lg CFU/ml was achieved at 500 MPa and 60 °C for three cycles of 3 minutes each. A single treatment at 500 MPa and 60 °C for 10 minutes resulted in 1.2 lg CFU/ml less inactivation. It was established that the more intensive inactivation of *B. subtilis* spores during repeated treatment with high hydrostatic pressure is not related to the inactivation of lytic enzymes of the cortex or the degradation of small acid-soluble proteins, but is caused by the mechanical destruction of the spore coat and cytoplasmic membrane.

**Keywords:** inactivation of microorganisms, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, endospores, disinfectants, ozone, high hydrostatic pressure, moderate electric field, pulsed electric field, ultrasound.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:*

1. Климнюк СІ, Покришко ОВ, **П'ятковський ТІ**, Ткачук НІ. Персистенція *S.aureus* у студентів медичного університету та їх чутливість до антибіотиків. Biomedical and biosocial anthropology. 2010;15:14-15 [**фахове видання України, 222-Медицина**] (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, участь у підготовці рукопису*)
2. Ковальчук АО, **П'ятковський ТІ**. Динаміка змін мікробіологічних показників експериментальних опікових ран при проведенні ранньої некректомії з використанням ліофілізованих ксенодермотрансплантатів вторинного зрізу. Вісник наукових досліджень. 2010(2):46-9. [**фахове видання України, 222-Медицина**] (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання*

*мікробіологічних експериментів, написання частини рукопису, підготовка статті до друку)*

3. **П'ятковський ТІ**, Чорній НВ, Покришко ОВ. Застосування септофіту для лікування захворювань пародонта у хворих на хронічний панкреатит. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2011;2:108-110 [**фахове видання України, 222-Медицина**] (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання мікробіологічних експериментів, написання частини рукопису, підготовка статті до друку*)
4. Манащук НВ, Покришко ОВ, **П'ятковський ТІ**. Етіологічна структура захворювань пародонту у хворих на неспецифічний виразковий коліт. Клінічна та експериментальна патологія. 2012;1(39):110-3 [**фахове видання України, 222-Медицина**] (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання мікробіологічних експериментів, написання частини рукопису*)
5. **П'ятковський ТІ**, Чорній НВ, Покришко ОВ. Мікробіоценоз ясенних щілин та пародонтальних кишень при гінгівіті та пародонтиті І ст. на фоні хронічного панкреатиту. Український медичний альманах. 2012;15(5): 263-4 [**фахове видання України, 222-Медицина**] (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання мікробіологічних експериментів, написання частини рукопису, підготовка статті до друку*)
6. Shynkaryk MV, **Pyatkovskyy T**, Mohamed HM, Yousef AE, Sastry SK. Physics of fresh produce safety: role of diffusion and tissue reaction in sanitization of leafy green vegetables with liquid and gaseous ozone-based sanitizers. Journal of food protection. 2015 Dec 1;78(12):2108-16. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-290>. [**SCOPUS (Q2), Medicine; SCOPUS (Q3) Microbiology**] (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання мікробіологічних експериментів, написання частини рукопису*)
7. **П'ятковський Т**, Покришко О. Порівняння ергономічності методів інокуляції мікроорганізмів на щільні живильні середовища. Аналі Мечниковського Інституту. 2023 Jun 16(2):45-8. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8048366>. [**фахове видання України, 222-Медицина**] (*Особистий внесок здобувача:*

*концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку)*

8. **Ryatkovskyu T.** Application of gaseous ozone and its aqueous solution for inactivation of pathogenic microorganisms: A literature review. Bulletin of Medical and Biological Research. 2023 17(3):47-57. <https://doi.org/10.61751/bmbr.2706-6290.2023.3.47>. [фахове видання України, 222-Медицина]
9. **П'ятковський ТІ, Покришко ОВ, Данилков СО.** Оцінка ефективності використання озонування для знезараження прісної води. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 19, Грудень 2023;(4):113-8. <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2023.v.i4.14189> [фахове видання України, 222-Медицина] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку*)
10. **Ryatkovskyu T.** Inactivation of microorganisms by high hydrostatic pressure: A literature review. Bulletin of Medical and Biological Research. 2023 5(4), 53-61. <https://doi.org/10.61751/bmbr/4.2023.53>. [фахове видання України, 222-Медицина]
11. **Ryatkovskyu T, Pokryshko O, Danylkov S.** Exploring water disinfection through electrolytic ozonation for application in wartime conditions. Bulletin of Medical and Biological Research. 2024 6(1), 43-51. <https://doi.org/10.61751/bmbr/1.2024.43> [фахове видання України, 222-Медицина] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку*)
12. **Ryatkovskyu T, Pokryshko O, Bilyk O, Danylkov S.** The use of aqueous ozone solution in the treatment of mine blast injury with extensive soft tissue defects: A case study. Int J Med Med Res. 2024;10(1):47–55. <https://doi.org/10.61751/ijmbr/1.2024.47> [фахове видання України, 222-Медицина] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання мікробіологічних експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку*)

13. **Pyatkovskyy T**, Pokryshko O. Antimicrobial activity of ozonated oils and their applications in medicine – a narrative review. Eur J Clin Exp Med 2025;23 (2):512–7. <https://dx.doi.org/10.15584/ejcem.2025.2.28> [**SCOPUS (Q4), Medicine**] *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, пошук та опрацювання літератури, написання рукопису, підготовка статті до друку)*
14. **Pyatkovskyy T**, Pokryshko O, Markowski A, Chernyshova A, Danylko S. Topical ozone application for severe acne with immunological evidence of Herpes zoster exposure after unsuccessful antibiotic and corticosteroid treatment: a case report. J Med Case Rep. 2025 Jul 12;19(1):337. <https://doi.org/10.1186/s13256-025-05386-w> [**SCOPUS (Q2), Medicine**] *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання рукопису, підготовка статті до друку)*
15. Pokryshko O, **Pyatkovskyy T**. Alcohol-based hand sanitizers in Ukraine: a comparative evaluation of their effectiveness. Перспективи та інновації науки 2025;6(52):1683-96 [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-6\(52\)-1683-1696](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-6(52)-1683-1696) [**фахове видання України, 222-Медицина**] *(Особистий внесок здобувача: написання рукопису, підготовка статті до друку)*
16. **Pyatkovskyy T**, Pokryshko O, Zahrychuk H, Danylko S. Kinetics of electrolytic ozone generation and decomposition in fresh water: influence of bacterial contamination and water source. Medical and Clinical Chemistry. 2025;(2):50–55. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2025.i2.15525> [**фахове видання України, 222-Медицина**] *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку)*
17. **Pyatkovskyy T**, Pokryshko O, Krasii N, Danylko S. Synergistic potential of aqueous ozone: Sublethal bacterial damage and enhanced antibiotic susceptibility. Int J Med Res. 2025;11(1):6–13. <https://doi.org/10.63341/ijmrr/1.2025.06> [**фахове видання України, 222-Медицина**] *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку)*
18. **Pyatkovskyy T**, Pokryshko O, Bilyk O, Danylko S. Ozonated water as an adjunct in the management of combat-induced wounds: a prospective study. Шпитальна

хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука. 2025; (2):54-60. <https://doi.org/10.11603/2414-4533.2025.2.15271> [фахове видання України, 222-Медицина] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання рукопису, підготовка статті до друку)

19. Volch I, Mykhailyshyn H, Kravets N, Pyatkovskyy T, Bukata V. Biofilm formation and antibiotic resistance of clinical isolates from diabetic foot ulcers. Bull Med Biol Res. 2025;7(3):46–53. <https://doi.org/10.63341/bmbr/3.2025.46> [фахове видання України, 222-Медицина] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання рукопису, підготовка статті до друку)

#### Патенти:

1. Патент України на корисну модель №155668 Україна, МПК С12N 1/20 (2006.01) А61К 35/66 (2015.01) Спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища / П'ятковський Т., Покришко О.; володілець: Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського. – № u202302947, заявл. 16.06.2023, опубл. 27.03.2024, Бюл. № 13. [патент України на корисну модель] (Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту)

#### Публікації, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Pyatkovskyy T.**, Shynkaryk M., Yousef A. and Sastry S. Postharvest ozone gas and liquid sanitizer combinational treatment of baby spinach for inactivation of *E. coli* O157:H7. (2013) IFT Annual Meeting & Food Expo, July 13-16, Chicago, IL, USA (Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка стенду, стендова доповідь)
2. Shynkaryk, M., **Pyatkovskyy T.**, Yousef A., Sastry, S. Electrical conductivity: an indicator of high hydrostatic pressure-induced bacterial cell damage. (2014) Conference of Food Engineering (CoFE 2014), April 7-9, Omaha, NE, USA (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем)

3. **Pyatkovskyy T.**, Shynkaryk, M., Yousef A., Sastry, S. Baby spinach combinational treatment with gaseous ozone and liquid sanitizers for inactivation of *E. coli* O157:H7. (2014) Conference of Food Engineering (CoFE 2014), April 7-9, Omaha, NE, USA (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка стенду, стендова доповідь*)
4. Shynkaryk, M., **Pyatkovskyy T.**, Yousef A., Sastry S. Pathogen Inactivation in Fresh Produce by Incorporation of Sanitizers into Existing Operations Within the Produce Chain. (2014) National Integrated Food Safety Initiative (NIFSI) Project Director Meeting, May 8, Washington, DC, USA (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка стенду, стендова доповідь*)
5. **Pyatkovskyy T.**, Shynkaryk M., Yousef A., Sastry S. Gaseous ozone treatment of baby spinach inoculated with *E. coli* O157:H7. (2014) IFT Annual Meeting & Food Expo, June 21-24, New Orleans, LA, USA (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка стенду, стендова доповідь*)
6. Shynkaryk, M., **Pyatkovskyy T.**, Yousef A., Sastry, S. Pilot scale combinational treatment of baby spinach with ozone gas and liquid sanitizer for inactivation of *E. coli* O157:H7. (2015) IFT Annual Meeting & Food Expo, July 11-14, Chicago, IL, USA (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем*)
7. Shynkaryk M. V., Mohamed H. M., **Pyatkovskyy T.**, Yousef A. E., Sastry S. K. Engineering Aspects of Fresh Produce Safety. (2016) Conference of Food Engineering (CoFE 2016), September 12-14, Columbus, OH, USA (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем*)
8. **Pyatkovskyy T.**, Shynkaryk M., Yousef A., Sastry S. Baby spinach sanitation by combination of gaseous ozone and liquid sanitizer. (2016) Conference of Food Engineering (CoFE 2016), September 12-14, Columbus, OH, USA (*Особистий*

*внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка презентації, усна доповідь)*

9. Shynkaryk M., **Pyatkovskyy T.** and Sastry S. Diffusion of a sanitizer gas through leaf stomata with volumetric and surface breakdown reactions. (2017) The 28th International Symposium on Transport Phenomena, September 22-24, Peradeniya, Sri Lanka (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем*)
10. **Pyatkovskyy T.**, Heskitt B., Sastry S. Possible ways of fresh produce contamination during vacuum cooling. (2018) IFT Annual Meeting & Food Expo, July 15-18, Chicago, IL, USA (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка стенду, стендова доповідь*)
11. **Pyatkovskyy T.**, Heskitt B., Sastry S. Effect of vacuum cooling on *E. coli* K 12 infiltration in fresh baby spinach. (2018) Conference of Food Engineering (CoFE 2018), September 9-12, Minneapolis, MN, USA (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка презентації, усна доповідь*)
12. **П'ятковський, Т.**, Покришко, О., Данилков, С., Використання озонованої води для інактивації мікроорганізмів *in vitro*. Здобутки клінічної та експериментальної медицини: матеріали підсумкової LXV наук.-практ. конф., 9 червня 2022 р., м. Тернопіль: Терноп. нац. мед. ун-т ім. І. Горбачевського, 2022. С. 96–97. (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез*)
13. **П'ятковський, Т.**, Покришко, О., Використання методу Копакабана для інокуляції суспензії мікроорганізмів на щільні живильні середовища. Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині: матеріали підсумкової III наук.-практ. міжнар. дистанц. конф., 24 березня 2023 р., м. Харків: Національний фармацевтичний університет, 2023. С. 52–53. (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез*)

14. **П'ятковський ТІ**, Покришко ОВ, Данилков СО. Знезараження прісної води електролітичним озонуванням. Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині: матеріали підсумкової IV наук.-практ. міжнар. дистанц. конф., 22 березня 2024 р., м. Харків: Національний фармацевтичний університет, 2024. С. 147-9. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез)*
15. Покришко ОВ, Красій НІ, **П'ятковський ТІ**. Скринінгове вивчення ефективності спиртовмісних антисептичних засобів для рук. Довкілля і здоров'я: матеріали XXIII Всеукраїнської наук.-практ. конф. з міжнародною участю., 25-27 квітня 2024 р., м. Тернопіль: Терноп. нац. мед. ун-т ім. І. Горбачевського, 2024. С. 98-100. *(Особистий внесок здобувача: участь у виконанні експериментів та написанні тез)*
16. **П'ятковський ТІ**, Покришко ОВ, Данилков СО. Озон як засіб дезінфекції харчових продуктів (на прикладі листя шпинату) і води. Здобутки клінічної та експериментальної медицини: матеріали підсумкової LXVII наук.-практ. конф., 13-14 червня 2024 р., м. Тернопіль: Терноп. нац. мед. ун-т ім. І. Горбачевського, 2024. С. 155-7. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка презентації, усна доповідь)*
17. **Pyatkovskyy T.**, Pokryshko O., Krasii N., Danylkov S. Activity of aqueous ozone against multiresistant isolates and its impact on antibiotic sensitivity in surgical patients. (2025) 20th Jubilee RECOOP Bridges in Life Sciences Conference, April 2-3, Prague, Czech Republic, ISBN 978-615-6006-06-6, P. 22. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання частини експериментів, написання тез, підготовка презентації, усна доповідь)*
18. **П'ятковський ТІ**, Покришко ОВ, Загричук ГЯ, Данилков СО. Динаміка концентрації озону у водному розчині в присутності бактерій. VII національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 180-річчю з дня народження Іллі Мечникова: матеріали наук.-практ. конф., 15-16 травня 2025 р., м. Харків: ДУ «Інститут мікробіології

та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», 2025. С. 75-6. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез)*

19. **П'ятковський ТІ**, Покришко ОВ, Красій НІ, Данилков СО. Сублетальні пошкодження мікроорганізмів, спричинені водним розчином озону. Актуальні питання біології та медицини: матеріали ХХІ всеукраїнської наук. конф., 29-30 травня 2025 р., м. Лубни: ДЗ «Луганський національний університет імені Тараса Шевченка», 2025. С.43-45. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез)*
20. Покришко ОВ, Красій НІ, **П'ятковський ТІ**. Етіологія гнійно-запальних інфекцій м'яких тканин у учасників бойових дій та цивільних осіб. Матеріали ХVІ з'їзду Товариства мікробіологів України імені С. Виноградського, 2-6 червня 2025 р., м. Тернопіль: Терноп. нац. мед. ун-т ім. І. Горбачевського, 2025. С. 199. *(Особистий внесок здобувача: участь у виконанні експериментів та написанні тез)*
21. Волч ІР, Михайлишин ГІ, Кравець НЯ, **П'ятковський ТІ**. (2025). Оцінка антибіотикочутливості та здатності до формування біоплівки клінічних штамів, виділених з виразок діабетичної стопи. Практична медицина військового часу: Матеріали науково-практичної конференції, 6 грудня 2025 р., м. Харків: ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», 2025. С. 12-13. *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання тез)*

*Додаткові публікації, що висвітлюють результати дисертації:*

1. Shynkaryk MV, **Pyatkovskyy TI**, Yousef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Engineering. 2016 Dec 1;191:10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025>. [SCOPUS (Q1) **Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, статистичний аналіз результатів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку)*

2. **Pyatkovskyy T**, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Fresh produce sanitization by combination of gaseous ozone and liquid sanitizer. *Journal of Food Engineering*. 2017 Oct 1;210:19-26. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.031>. [**SCOPUS (Q1) Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку*)
3. **Pyatkovskyy T**, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 population on baby spinach leaves by liquid sanitizers. *Journal of Food Process Engineering*. 2017 Jun;40(3):e12479. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12479>. [**SCOPUS (Q2) Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку*)
4. **Pyatkovskyy TI**, Shynkaryk MV, Mohamed HM, Yousef AE, Sastry SK. Effects of combined high pressure (HPP), pulsed electric field (PEF) and sonication treatments on inactivation of *Listeria innocua*. *Journal of Food Engineering*. 2018 Sep 1;233:49-56. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.002>. [**SCOPUS (Q1) Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку*)
5. Kasler DR, **Pyatkovskyy T**, Yousef AE, Sastry SK. Effect of moderate electric field pretreatment in combination with ozonation on inactivation of *Escherichia coli* K12 in intact shell eggs. *Lwt*. 2020 Jun 1;127:109338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109338> [**SCOPUS (Q1) Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання частини експериментів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку*)
6. Wang LH, **Pyatkovskyy T**, Yousef A, Zeng XA, Sastry SK. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation induced by moderate electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2020 Jun 1;62:102349. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102349> [**SCOPUS (Q1) Agricultural and**

- Biological Sciences: Food Science]** (*Особистий внесок здобувача: планування експериментів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку*)
7. Shynkaryk MV, **Pyatkovskyy T**, Yousef AE, Sastry SK. In-situ monitoring of inactivation of *Listeria innocua* under high hydrostatic pressure using electrical conductivity measurement. Journal of Food Engineering. 2020 Nov 1;285:110087. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110087>. [**SCOPUS (Q1) Agricultural and Biological Sciences: Food Science]** (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, статистичний аналіз результатів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку*)
  8. **Pyatkovskyy T**, Ranjbaran M, Datta AK, Sastry SK. Factors affecting contamination and infiltration of *Escherichia coli* K12 into spinach leaves during vacuum cooling. Journal of Food Engineering. 2021 Dec 1;311:110735. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110735>. [**SCOPUS (Q1) Agricultural and Biological Sciences: Food Science]** (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання частини експериментів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку*)
  9. Mok JH, Sun Y, **Pyatkovskyy T**, Hu X, Sastry SK. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore inactivation by single-and multi-pulse high hydrostatic pressure (MP-HHP). Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2022 Oct 1;81:103147. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103147>. [**SCOPUS (Q1) Agricultural and Biological Sciences: Food Science]** (*Особистий внесок здобувача: планування експериментів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку*)

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	31
ВСТУП.....	33
РОЗДІЛ 1 (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	43
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	64
2.1 Матеріали.....	64
2.1.1 Штами бактерій.....	64
2.1.2 Листя молодого шпинату.....	65
2.1.3 Курячі яйця.....	65
2.1.4 Зразки води.....	65
2.1.5 Дезінфікуючі засоби.....	66
2.2 Методи.....	66
2.2.1 Культивування штамів бактерій, приготування суспензій вегетативних клітин та спор.....	66
2.2.2 Оцінка впливу стерильної деіонізованої води на <i>L. innocua</i> .....	68
2.2.3 Обробка поверхні листя шпинату.....	69
2.2.4 Інокуляція молодого листя шпинату.....	69
2.2.5 Інокуляція курячих яєць.....	69
2.2.6 Порівняльні дослідження ефективності рідких дезінфікуючих засобів.....	70
2.2.7 Порівняння способів застосування рідких дезінфектантів.....	70
2.2.8 Вивчення довгострокового ефекту дезінфікуючого засобу Pro- San L.....	72
.	72
2.2.9 Вакуумне охолодження та застосування газоподібного озону.....	
2.2.10 Вплив різних протоколів застосування вакууму та тиску під час обробки листя шпинату газоподібним озonom.....	74

2.2.11 Вплив різної кількості листя шпинату під час вакуумного охолодження та озонування на розкладання газоподібного озону та інактивацію бактерій.....	75
2.2.12 Вплив застосування вакууму під час обробки листя шпинату на інтерналізацію мікроорганізмів у товщу листків.....	76
2.2.13 Вплив водної плівки на поверхні листя та вологи у камері на обробку газоподібним озоном.....	76
2.2.14 Вплив дозування газоподібного озону та тривалість його застосування під час імітованого транспортування шпинату.....	77
2.2.15 Комбінована обробка рідким дезінфектантом та високою концентрацією газоподібного озону.....	78
2.2.16 Обробка води електролізом.....	79
2.2.17 Застосування обробки води електролізом у «польових умовах» волонтерами на Півдні України для забезпечення потреб у питній воді...	80
2.2.18 Вимірювання концентрації озону у водному розчині.....	80
2.2.19 Вимірювання мінералізації води.....	81
2.2.20 Аналіз зміни кольору.....	82
2.2.21 Обробка високим гідростатичним тиском.....	
2.2.22 Вимірювання електропровідності у суспензії під час обробки ВГТ	83
2.2.23 Обробка помірним електричним полем суспензії спор.....	84
2.2.24 Обробка помірним електричним полем інокульованих курячих яєць.....	85
2.2.25 Обробка імпульсним електричним полем.....	85
2.2.26 Обробка бактеріальних суспензій ультразвуком.....	
2.2.27 Комбінована обробка ВГТ, ІЕП та УЗ.....	86
2.2.28 Виявлення білків аналізом з біцинхоніновою кислотою .....	86
2.2.29 Оцінка цілісності цитоплазматичної мембрани за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії.....	88
2.2.30 Підрахунок кількості мікроорганізмів.....	88

2.2.31 Спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища.....	89
2.2.32 Підрахунок сублетально пошкоджених бактерій.....	90
2.2.33 Забір клінічного матеріалу.....	
2.2.34 Ідентифікація клінічних штамів.....	92
2.2.35 Визначення антибіотикочутливості виділених штамів.....	99
2.2.36 Методи статистичної обробки отриманих результатів.....	
РОЗДІЛ 3 Інактивація <i>Escherichia coli</i> O157:H7 рідкими дезінфектантами.....	99
РОЗДІЛ 4 Інактивація <i>Escherichia coli</i> газоподібним озonom.....	102
4.1 Фактори які впливають на проникнення <i>Escherichia coli</i> у тканину листків шпинату.....	117
4.2 Застосування газоподібного озону для інактивації <i>Escherichia coli</i> O157:H7 на поверхні та у товщі листків шпинату.....	124
РОЗДІЛ 5 Застосування рідких та газоподібних дезінфектантів у комбінації для інактивації <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	128
РОЗДІЛ 6 Застосування озону для знезараження води.....	
6.1 Інактивація автохтонної флори води при її обробці електролізом....	136
6.2 Дослідження знезараження води за допомогою обробки електролізом для застосування в умовах воєнного часу.....	140
6.3 Кінетика електролітичного утворення та розкладання озону у прісній воді: вплив бактеріального забруднення та джерела води.....	141
РОЗДІЛ 7 Медичне застосування озонованої води.....	146
7.1 Синергічний потенціал водного розчину озону: сублетальні пошкодження бактерій та підвищена чутливість до антибіотиків.....	
7.2 Озонована вода як допоміжний засіб при лікуванні поранень, спричинених бойовими діями.....	150
РОЗДІЛ 8 Знешкодження мікроорганізмів та бактеріальних спор помірним електричним полем самостійно та у комбінації з обробкою газоподібним озonom.....	157

8.1 Інактивація спор <i>Bacillus subtilis</i> помірним електричним полем.....	
8.2 Інактивація <i>Escherichia coli</i> K12 помірним електричним полем у комбінації з обробкою газоподібним озоном.....	161
РОЗДІЛ 9 Знешкодження мікроорганізмів та бактеріальних спор високим гідростатичним тиском, ультразвуком, імпульсним електричним полем та їх комбінацією.....	161
9.1 Моніторинг знешкодження <i>Listeria innocua</i> високим гідростатичним тиском.....	170
9.2 Інактивація спор <i>Bacillus subtilis</i> високим гідростатичним тиском...	176
9.3 Комбінація високого гідростатичного тиску, ультразвуку та імпульсного електричного поля для інактивації <i>Listeria innocua</i> .....	181
ВИСНОВКИ.....	221
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	
ДОДАТКИ.....	

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

БУО – бляшкоутворюючі одиниці

КУО – колонієутворюючі одиниці

УФ – ультрафіолетовий

ТСБ – триптичний соєвий бульйон

ТСА – триптичний соєвий агар

ТСАДЕ – триптичний соєвий агар з додаванням 0,6 % дріжджового екстракту

ЖСА – жовтково-сольовий агар

ПЕТ – поліетилентерефталат

ВГТ – високий гідростатичний тиск

ПЕП – помірне електричне поле

ІЕП – імпульсне електричне поле

УЗ – ультразвук

SDS – додецилсульфат натрію

DPA – дипіколінова кислота

SASP – малі кислоторозчинні білки

ЕГКП – ентерогеморагічна кишкова паличка

ГУС – гемолітико-уремічний синдром

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

NPWT – терапія ран негативним тиском

БЛРС – бета-лактамази розширеного спектру дії

ОР-ВГТ – одноразова обробка високим гідростатичним тиском

БР-ВГТ – багаторазова обробка високим гідростатичним тиском

УЗ→ВГТ – ультразвукова обробка з подальшим використанням обробки високим гідростатичним тиском

ВГТ→УЗ – обробка високим гідростатичним тиском з подальшою обробкою ультразвуком

ІЕП→ВГТ – обробка імпульсним електричним полем з подальшим застосуванням високого гідростатичного тиску

ВГТ→ІЕП – обробка високим гідростатичним тиском з подальшою обробкою імпульсним електричним полем

ІЕП+ВГТ – одночасна обробка імпульсним електричним полем та високим гідростатичним тиском

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження.

Спалахи гострих кишкових інфекцій, спричинені патогенними мікроорганізмами, створюють значні проблеми для системи охорони здоров'я та призводять до значних економічних втрат у всьому світі [1]. Ці спалахи спричинені різними мікроорганізмами, включаючи бактерії, віруси, патогенні найпростіші та грибки, які контамінують питну воду чи харчові продукти на різних етапах виробництва, обробки та розповсюдження [2,3]. Такі збудники як *Salmonella spp.*, патогенні штами *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* і *Campylobacter spp.*, є одними з найпоширеніших причин гострих кишкових інфекцій [1]. Ці мікроорганізми можуть розмножуватися в різноманітних середовищах і часто виявляють стійкість до багатьох стресових факторів, що ускладнює їх інактивацію. Розуміння природи поширення цих збудників має важливе значення для розробки ефективних заходів їх інактивації з підвищенням безпеки харчових продуктів і питної води.

Традиційні термічні методи, такі як пастеризація та стерилізація, вже давно є наріжним каменем протоколів безпеки харчових продуктів завдяки їхній ефективності в інактивації широкого спектру шкідливих мікроорганізмів. Однак ці методи часто негативно впливають на органолептичні та поживні якості харчових продуктів. Оскільки споживчий попит на свіжі продукти з мінімальною обробкою продовжує зростати, збільшується й потреба в альтернативних методах обробки, які можуть забезпечити мікробіологічну безпеку без зниження якості харчових продуктів [4,5].

Чиста вода є необхідним ресурсом як для людської життєдіяльності, так і для різних галузей промисловості [6,7]. Природні катастрофи, техногенні аварії та військові дії можуть мати значний і згубний вплив на якість води для мешканців у таких зонах внаслідок руйнування інфраструктури водопостачання та водовідведення, включаючи водоочисні споруди, розподільчі системи та каналізаційні споруди [8]. Забезпечення чистою водою цивільних, військових,

рятувальників та волонтерів, які знаходяться у зонах із зруйнованою цивільною інфраструктурою, є надзвичайно важливим [9].

Нетермічні методи з'явилися як багатообіцяюча альтернатива звичайним термічним обробкам для інактивації мікроорганізмів у харчових продуктах та воді [10–12]. Ці методи включають обробку під високим гідростатичним тиском (ВГТ) [13–15], обробку помірним чи імпульсним електричним полем (ПЕП, ІЕП) [16–19], опромінення ультрафіолетовим (УФ) світлом [20,21], обробку ультразвуком (УЗ) [22–24] та застосування газоподібного озону [3,25,26] чи його водного розчину [27–29]. Вони пропонують потенціал для ефективної інактивації мікроорганізмів, з одночасним збереженням смаку, текстури та поживної цінності харчових продуктів [22]. Крім того, нетермічні методи можна застосовувати до різноманітних харчових та фармацевтичних матриць, від рідин до твердих речовин, що робить їх універсальними інструментами в арсеналі медицини, фармації та харчової промисловості проти бактеріальних контамінантів. Деякі з цих методів можуть ефективно інактивувати мікроорганізми та сформовані ними біоплівки на поверхнях медичних інструментів та обладнання [30–32].

Оскільки медицина, фармація та харчова промисловість продовжують впроваджувати інновації, розуміння та використання цих нетермічних технологій матиме вирішальне значення для бактеріологічної безпеки у цих галузях.

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

Дисертаційна робота виконана згідно плану науково-дослідних робіт кафедри мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, крім того дослідження виконувалися на кафедрі харчових наук та технологій Університету штату Огайо, США (Department of Food Science and Technology at the Ohio State University), кафедрі харчової, сільськогосподарської та біологічної інженерії Університету штату Огайо, США (Department of Food, Agricultural and Biological Engineering at the Ohio State University).

Більшу частину досліджень виконано під час наукового стажування (США, 2012-2020 рр.) за грантами від United States Department of Agriculture, National

Institute of Food and Agriculture, Agriculture and Food Research Initiative (USDA NIFA Grant No. 2009-51110-05902, USDA NIFA Grant No. 2014-70003-22357, USDA NIFA Grant No. 2015-67017-23087) та індивідуальними комерційними грантами. На кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України дослідження виконувалися у межах ініціативної науково-дослідної роботи «Особливості формування резистентності у представників умовно-патогенної флори в умовах здоров'я і патології» № державної реєстрації 0122U000035. Дисертант є співвиконавцем даної теми.

**Мета та завдання дослідження.** *Метою* роботи було вдосконалення профілактики гострих кишкових та ранових інфекцій шляхом обґрунтування ефективності альтернативних методів інактивації мікроорганізмів на основі комбінування нетермічних і термічних факторів впливу.

Для досягнення цієї мети поставлено такі **завдання**:

1. Визначити фактори, які впливають на проникнення *Escherichia coli* у тканину листків шпинату.
2. Вивчити можливості інактивації *Escherichia coli* O157:H7 на поверхні листків шпинату рідкими дезінфектантами.
3. Дослідити застосування газоподібного озону для інактивації *Escherichia coli* O157:H7 на поверхні та у товщі листків шпинату.
4. Обґрунтувати доцільність комбінованого застосування рідких та газоподібних дезінфектантів для інактивації *Escherichia coli* O157:H7.
5. Оцінити ефективність електролітичної обробки для дезінфекції води та дослідити антимікробні властивості отриманої озонованої води.
6. Дослідити ефективність знешкодження грам-негативних бактерій та бацилярних спор помірним електричним полем.
7. Довести можливість моніторингу інактивації бактерій під час обробки високим гідростатичним тиском на прикладі *Listeria innocua*.
8. Дослідити ефективність комбінації високого гідростатичного тиску, ультразвуку та імпульсного електричного поля для інактивації *Listeria innocua*.

9. Оцінити ефективність обробки високим гідростатичним тиском для інактивації спор *Bacillus subtilis*.

**Об'єкт дослідження:** інтерналізація бактерій, антибактеріальна дія нетермічних методів інактивації, моніторинг інактивації, знезараження води.

**Предмет дослідження:**

Фактори, які впливають на інтерналізацію бактерій, параметри застосування нетермічних методів для ефективною інактивації бактерій та їх спор, механізми інактивації спор, електрична провідність бактеріальної суспензії, загальне мікробне число води.

**Методи дослідження.** В роботі було застосовано набір загальноприйнятих методів досліджень, зокрема:

- інформаційно-аналітичний (систематизація та узагальнення даних літератури щодо сучасного стану застосування нетермічних методів інактивації мікроорганізмів у медицині, фармації та харчовій промисловості);

- бактеріологічні методи досліджень (культивування мікроорганізмів, отримання їх суспензій, отримання та очищення бактеріальних спор, дослідження протимікробних властивостей нетермічних методів та їх комбінації, оцінка сублетальних пошкоджень бактерій, вивчення механізмів інактивації спор);

- мікроскопічний (оцінка цілісності цитоплазматичної мембрани за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії, оцінка чистоти суспензії спор за допомогою фазово-контрастної мікроскопії);

- біохімічні (визначення концентрації позаклітинних білків після обробки високим гідростатичним тиском);

- математико-статистичний (обґрунтована інтерпретація результатів з використанням тестів Шапіро-Вілка, t-критерію Стьюдента, одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA), пост-хок-аналізу Тьюкі за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Excel та Statistica 8.0).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Доведено, що бактеріальна контамінація камер вакуумного охолодження та проникнення бактерій в товщу листків зелені можливі під час процесу вакуумного охолодження. Вперше

встановлено, що інтерналізація бактерій у товщу листя зелені відбувається інтенсивніше при нижчому тиску та повільнішому відновленню тиску до атмосферного. Разом з тим доведено, що ефективність застосування газоподібного озону проти *E. coli* O157:H7 збільшувалася після вакуумного охолодження, яке видаляє рідину з поверхні продукту та дозволяє газоподібному дезінфектанту проникнути глибше, що забезпечує інактивацію збудника у важкодоступних зонах, де він захищений від дії традиційних дезінфектантів. Показано, що застосування рідких дезінфікуючих засобів після вакуумного охолодження є менш ефективним через інтерналізацію інокульованих бактерій у тканину продукту, яка відбувається під час процесу вакуумного охолодження. Вперше показано, що короткочасна обробка високою концентрацією озону з подальшою тривалою обробкою низькою концентрацією озону має синергічний ефект на інактивацію *E. coli* O157:H7.

Вперше продемонстрована комбінація рідкого/газоподібного дезінфектанта, яка давала адитивний ефект обох дезінфектантів. Такий ефект спостерігали тільки коли за обробкою рідким дезінфікуючим засобом слідувало застосування газоподібного озону під час вакуумного охолодження продукції. Підвищення тиску у ємності для обробки покращувало ефективність, сприяючи проникненню газу до збудника.

Розроблена нова комбінація застосування розпилення рідкого дезінфектанта з наступною довгостроковою обробкою газоподібним озоном зменшувала кількість *E. coli* O157:H7 на понад 6 lg КУО/мл після першого дня застосування, що фактично нівелює ризик виникнення харчових спалахів навіть при високому вихідному рівні забруднення сировини. Окрім того, такий підхід менше впливав на вигляд листків шпинату, у порівнянні з довгостроковим застосуванням рідких та газоподібних дезінфікуючих засобів окремо, що дозволяє поєднати високі вимоги епідеміологічної безпеки зі збереженням біологічної цінності продукту.

Встановлений довгостроковий ефект електролітичної обробки джерельної води із відсутністю бактеріального росту чи зміни кольору води протягом місяця після обробки, що запобігає ризику виникнення спалахів кишкових інфекцій при тривалому зберіганні питної води. Доведена летальна та сублетальна дія озонованої

води на клінічні штами *S. aureus* та *E. coli*. При обробці протягом 15 хвилин озонованою водою (до 4 мг/л) виявляли сублетальні пошкодження бактеріальних клітин у 89,2 % популяції *S. aureus* та у 98,6 % популяції *E. coli*.

Доведено, що обробка суспензії спор *B. subtilis* помірним електричним полем при 300 В/см у поєднанні з помірною сублетальною термічною обробкою призводить до помітного зменшення концентрації спор *B. subtilis*. У комбінації з термічною обробкою при 75 °С вдалося інактивувати 2,5 lg КУО/мл спор. Також встановлено, комбінація помірного електричного поля (15,7 В/см) та термічної обробки при температурі 55 °С, зменшує популяцію *E. coli* K12 всередині яєць та спричиняє сублетальні пошкодження бактеріальних клітин. При початковій концентрації популяції 5,5-6 lg КУО/г такою обробкою вдалося знешкодити 4,4 lg КУО/г, що мінімізує бактеріальне навантаження до рівнів, безпечних для споживання особами з груп ризику.

Вперше встановлено, що вимірювання електропровідності при обробці суспензії *Listeria innocua* високим гідростатичним тиском до 500 МПа можна використовувати для моніторингу ступеня пошкодження клітин. Отримані результати показали, що електропровідність бактеріальної суспензії зростає зі збільшенням кількості летально ушкоджених клітин. Зростання електропровідності під час циклу скидання тиску не спостерігали, що свідчило про те, що пошкодження клітин *L. innocua*, в основному, відбувалося під час періодів підвищення тиску та його утримання. Вперше показано, що одночасна обробка високим гідростатичним тиском та імпульсним електричним полем збільшувала електропровідність найбільше, що свідчило про найбільший витік внутрішньоклітинних компонентів. Разом з цим вперше показано, що при такій обробці відбувається витік небілкових речовин.

Доведено, що багаторазова обробка суспензії спор *B. subtilis* високим гідростатичним тиском була більш ефективною в їх інактивації, ніж одноразова обробка тиском протягом такого ж часу. Найбільшої інактивації у 5,8 lg КУО/мл було досягнуто при 500 МПа та 60 °С протягом трьох циклів по 3 хвилини кожен. Одноразова обробка при 500 МПа та 60 °С протягом 10 хвилин інактивувала на 1,2

Ig КУО/мл менше. Продемонстровано, що інтенсивніша інактивація спор *B. subtilis* при багаторазовій обробці високим гідростатичним тиском спричинена механічним руйнуванням оболонки спори та цитоплазматичної мембрани, що є важливим для гарантування безпечності продуктів з епідеміологічної точки зору.

**Практичне значення отриманих результатів.** У ході виконання роботи розроблені унікальні протоколи комбінованого застосування рідких та газоподібних дезінфектантів, високого гідростатичного тиску та імпульсного електричного поля.

Отриманні результати лабораторних та мікробіологічних досліджень є науковим обґрунтуванням практичного застосування нетермічних методів інактивації бактерій чи бактеріальних спор на харчових продуктах та в рідинах. Впровадження розроблених комбінованих режимів дозволяє підвищити рівень інфекційної безпеки харчових продуктів. Крім того запропоновані підходи мають потенціал для дезінфекції лікарняного середовища та ведення ранових інфекцій, що є важливим для боротьби з госпітальною інфекцією та антибіотикорезистентними штамми.

При виконанні мікробіологічних досліджень автором вперше експериментально обґрунтовано застосування нової техніки інокуляції мікроорганізмів – на ці результати автор отримав Патент України на корисну модель (Пат. №155668).

Основні матеріали і положення дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес профільних кафедр: кафедри мікробіології, вірусології та імунології і кафедри загальної гігієни та екології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України), а також в роботу бактеріологічних лабораторій ТОВ «Медична лабораторія Панакея», КНП «Тернопільська комунальна міська лікарня №2» та ДУ «Тернопільський обласний центр контролю та профілактики хвороб Міністерства охорони здоров'я України».

**Особистий внесок здобувача.** Роботи здобувача, представлені в цій дисертації, засновані на результатах отриманих ним особисто, або за його

безпосередньої участі чи під його керівництвом. Дисертантом самостійно обрано напрям дослідження, мету сформульовано за консультативною участю проф. Sudhir Sastry (Department of Food, Agricultural and Biological Engineering at the Ohio State University) та проф. Ahmed Yousef (Department of Food Science and Technology at the Ohio State University), завдання визначено спільно з Миколою Шинкариком, PhD (Department of Food, Agricultural and Biological Engineering at the Ohio State University) та к.мед.наук, доц. Оленою Покришко (кафедра мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України). Автор особисто провів інформаційно-патентний пошук та аналіз літературних джерел щодо мікробіологічних аспектів застосування нетермічних методів інактивації мікроорганізмів.

Здобувач з допомогою Миколи Шинкарика, PhD, обрав методи дослідження та з ним виконував лабораторні експерименти з газоподібним озоном, високим гідростатичним тиском, обробкою ультразвуком та імпульсним електричним полем. Дослідження з помірним електричним полем виконано разом з Brian Heskitt (Department of Food, Agricultural and Biological Engineering at the Ohio State University) та David Kasler (Department of Food Science and Technology at the Ohio State University). Експерименти зі спорами *B. subtilis* проведено з Yaxin Sun та Lang-Hong Wang (запрошені науковці Department of Food, Agricultural and Biological Engineering at the Ohio State University). Дослідження обробки води електролізом та її антибактеріальної дії проведено разом з к.мед.наук, доц. Оленою Покришко. Більшість клінічних штамів отримано з бактеріологічного підрозділу клініко-діагностичної лабораторії Тернопільської обласної клінічної лікарні (к.мед.наук Наталія Красій). Здобувач самостійно виконав мікробіологічні та біохімічні дослідження. Статистичний аналіз отриманих результатів проведений автором, на основі чого ним же сформульовано висновки.

Автор висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу в проведенні досліджень.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертації доповідалися та обговорювалися на IFT Annual Meeting & Food Expo 2013 (Чикаго, 2013); Conference of Food Engineering 2014 (Омаха, 2014); National Integrated Food Safety Initiative (NIFSI) Project Director Meeting (Вашингтон, 2014); IFT Annual Meeting & Food Expo 2014 (Новий Орлеан, 2014); IFT Annual Meeting & Food Expo 2015 (Чикаго, 2015); Conference of Food Engineering 2016 (Колумбус, 2016); The 28th International Symposium on Transport Phenomena (Переаденія, 2017); IFT Annual Meeting & Food Expo 2018 (Чикаго, 2018); Conference of Food Engineering 2018 (Міннеаполіс, 2018); Підсумковій LXV науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2022); Підсумковій III міжнародній науково-практичній дистанційній конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (Харків, 2023); Підсумковій IV міжнародній науково-практичній дистанційній конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (Харків, 2024); XXIII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Довкілля і здоров'я» (Тернопіль, 2024); Підсумковій LXVII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2024); 20th Jubilee RECOOP Bridges in Life Sciences Conference (Прага, 2025); Науково-практичній конференції «VII національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 180-річчю з дня народження Іллі Мечникова» (Харків, 2025); XXI всеукраїнській науковій конференції «Актуальні питання біології та медицини» (Лубни, 2025); XVI з'їзді Товариства мікробіологів України імені С. Виноградського (Тернопіль, 2025); Науково-практичній конференції «Практична медицина військового часу» (Харків, 2025).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 50 наукових робіт, із них 16 робіт у наукових фахових виданнях України, 12 у зарубіжних наукових журналах, проіндексованих в міжнародних наукометричних базах даних Scopus і Web of Science, 21 тез доповідей на вітчизняних (9) та закордонних (12) наукових конференціях і 1 патент України на корисну модель.

**Структура й обсяг дисертації.** Дисертаційна робота є кваліфікаційною науковою працею на правах рукопису, викладена на 260 сторінках друкованого тексту. Дисертація складається з наступних структурних елементів: анотації, вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів досліджень, 7 розділів власних досліджень, висновків, переліку використаних джерел та додатків. Список використаної літератури включає 336 позицій. Робота містить 55 рисунків і 9 таблиць.

## РОЗДІЛ 1 (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Бактеріальна контамінація є серйозною проблемою в різних галузях, включаючи медицину, фармацію, ветеринарію та харчову промисловість. Традиційні методи інактивації мікроорганізмів, такі як термічна обробка, хоч і є ефективними, але часто мають обмеження, такі як зміна властивостей речовин, погіршення якості продукції, а також потенційний розвиток термостійких штамів [33]. Як наслідок, зростає інтерес до нетермічних методів інактивації, які можуть ефективно знищувати мікроорганізми, зберігаючи при цьому властивості та якість речовин чутливих до термічної обробки [12]. Нетермічні методи інактивації відносяться до способів, які використовуються для знищення патогенних мікроорганізмів або непатогенних для людини мікроорганізмів, що викликають зміни або псування лікарської сировини, харчових продуктів, води та інших речовин без використання високих температур [11]. Дослідження нетермічних методів тривають і в міру розвитку технологій ми можемо очікувати їх ширшого впровадження в цих критично важливих галузях промисловості. Причинами з яких ці методи набувають все більшого значення є їх енергоефективність та екологічність. Нетермічні методи зазвичай вимагають менше енергії порівняно з традиційною термічною обробкою, що робить їх більш екологічними та економічно ефективними [2,34]. Крім того нетермічні методи загалом дозволяють зберегти поживну якість, смак і текстуру харчових продуктів чи властивості речовин, які змінюються при традиційній термічній обробці [4].

Приклади нетермічних методів інактивації включають застосування рідких та газоподібних дезінфектантів (йодофори, спиртомісткі та хлормісткі розчини, озон, діоксид хлору та ін.), використання високого гідростатичного тиску (ВГТ), помірного електричного поля (ПЕП), імпульсного електричного поля (ІЕП) і ультразвукової обробки.

### *Озон*

Українська наука донедавна розглядала озон в основному як один із засобів очищення води. Зокрема це відображено у роботі Хірної Т.В., яка серед способів знезараження води описала використання озону як самостійно, так і у комбінації з ультрафіолетовим опроміненням [35]. У праці Шмичкової О. та ін. продемонстровано використання озону для очищення стічних вод від фармацевтичних препаратів. Було показано повне руйнування молекул антибіотиків шляхом окиснення [36].

Озон є потужним окисником і тому перспективним засобом дезінфекції завдяки своїй високій реакційній здатності та можливості у газовій формі проникати глибше ніж рідкі дезінфектанти [37]. Озонування передбачає використання озону як у газоподібній, так і у водній формах для інактивації мікроорганізмів. Газоподібний озон особливо ефективний для стерилізації поверхонь і дезінфекції повітря, що робить його цінним у медичних установах для стерилізації медичних пристроїв і приміщень, знижуючи ризики інфікування [38,39]. Водний розчин озону, з іншого боку, може використовуватися для догляду за ранами через його здатність сприяти загоєнню, знешкоджуючи патогенні антибіотикорезистентні мікроорганізми та таким чином відіграючи вирішальну роль у зниженні мікробного навантаження під час медичних [40,41], стоматологічних [32,42] чи ветеринарних процедур [28]. У харчовій промисловості газоподібний озон використовується для подовження терміну зберігання продуктів шляхом інактивації поверхневих мікроорганізмів на фруктах, овочах і пакувальних матеріалах [43]. Водний розчин озону в цій галузі використовується для миття та дезінфекції харчових продуктів, обладнання та робочих поверхонь, не залишаючи шкідливих залишків [44,45]. Озонування води може використовуватися також як спосіб її очищення від мікроорганізмів та органічних залишків [46–48]. Таке застосування озону як у газоподібній, так і у водній формах підкреслює його універсальність та ефективність як методу нетермічної інактивації мікроорганізмів у різних галузях промисловості.

Окремим способом застосування озону є озоновані олії. Такі препарати є насиченими озоном оліями, які пропонують широкий спектр застосування завдяки

своїм протимікробним, протигрибковим і протизапальним властивостям [49]. Їх застосовують в медицині для лікування ран і шкірних захворювань [50], при інфекційних захворюваннях очей [51–53], гінекологічних [54] та проктологічних [55] захворюваннях, у стоматології [56–58], в косметології для догляду за шкірою [59], а також у ветеринарії для лікування інфекційних шкірних захворювань у тварин бактеріальної та грибової етіології [60].

Як сильний окисник, озон ефективно інактивує бактерії, пошкоджуючи їх клітинну структуру та порушуючи життєво важливі метаболічні процеси. Серед механізмів інактивації мікроорганізмів озоном можна виділити наступні: окислення жирних кислот та порушення структури клітинної мембрани зі збільшенням її проникності [61], окислення амінокислот та сульфгідрильних груп білків і ферментів із їх денатурацією та інактивацією [62,63], пошкодження нуклеїнових кислот [64], утворення реактивних форм кисню та як результат створення оксидативного стресу для клітин мікроорганізмів, а також вірусів [65].

**Інактивація бактерій озоном.** За рахунок описаних вище механізмів як газоподібний, так і водний озон ефективно застосовувався для інактивації багатьох грам-негативних мікроорганізмів включаючи таких патогенів як *Escherichia coli* [66,67], *Salmonella spp.* [26,68], *Pseudomonas aeruginosa* [67,69], *Legionella pneumophila* [70,71], *Vibrio cholerae* [72,73] та *Shigella spp.* [72,74]. Доведена ефективність знешкодження озоном і грам-позитивної флори, зокрема *Staphylococcus aureus* [69,75,76], *Streptococcus spp.* та *Enterococcus spp.* [77–79], *Listeria spp.* [80,81]. Заявлена інактивація також і грам-позитивних споротворних мікроорганізмів як вегетативних клітин *Bacillus spp.* [82], *Clostridium spp.* [83], так і їх спор [83–85]. Оскільки використовувалися різні способи обробки різного контамінованого субстрату, порівняти чутливість мікроорганізмів до озону за результатами з різних джерел неможливо. Для ілюстрації ефективності озону проти різних мікроорганізмів дані з вибраних публікацій зібрано у Таблиці 1.1 (додаток А1). В більшості вибраних випадків використовувалася насичена озоном вода. У випадках представлення даних у оглянутих публікаціях у вигляді кінетичних

кривих обиралися максимальні значення інактивації виражені у логарифмах колонієтворних одиниць (lg КУО) на грам чи мілілітр субстрату.

Таким чином, продемонстрована ефективність, як газоподібного, так і водного озону проти широкого спектру, як грам-негативних, так і грам-позитивних збудників, включаючи спори бацил та клостридій.

**Інактивація грибків та найпростіших.** Озон використовувався для інактивації спор грибків. G. Wen *et al.* [86] продемонстрували ефективність води, озонованої барботуванням із концентрацією 2 мг/л при температурі 20 °С, проти *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum* та *Trichoderma harzianum*. Газоподібний озон у концентрації 10 мг/л при температурі 20 °С протягом 15 хвилин використовувався для інактивації *Candida albicans* та *Aspergillus fumigatus* на поверхні щільних та пористих матеріалів. Е.І. Epelle *et al.* [87] порівнювали ефективність озонування з опроміненням ультрафіолетовим світлом. Показана більша ефективність озонування, яку автори пояснюють кращою проникністю газоподібного озону у пористі матеріали незалежно від орієнтації субстрату відносно джерела дезінфектанта. Ці ж автори показали, що за таких же умов вони могли досягти кращої інактивації бактеріальних штамів *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*, стосовно чого автори припускають, що товстіша та міцніша клітинна стінка грибів, порівняно з бактеріями ускладнює проникнення (і в подальшому окислення компонентів клітини) газоподібного озону. Навіть, якщо грибки не знищуються повністю, озонування сповільнює їх ріст. Так, О.І. Sujayasree *et al.* [88] довели, що при обробці газоподібним озоном у концентрації 0,3-1 мг/л при температурі 20 °С протягом 4-9 тижнів цитрусових, штучно інокульованих культурами *Penicillium digitatum* та *Penicillium italicum*, розвиток цвілі на фруктах настав пізніше на тиждень у порівнянні з контролем. Ця ж обробка сповільнила або зупинила споруляцію грибків без помітної фітотоксичності для фруктів.

Озонування дозволяє знешкоджувати не лише спори чи вегетативні клітини грибків, а й мікотоксини. Так, наприклад, L. Afsah-Hejri *et al.* [63] було вивчено застосування газоподібного та водного озону для деградації ряду мікотоксинів

(афлатоксини, охратоксин А, фумонізини, дезоксиніваленол, зеараленон, патулін) у різних харчових продуктах.

Даних щодо успішного використання озону проти найпростіших небагато, оскільки оболонки цист роблять їх стійкими до дезінфектантів. Наприклад, К.Е. Wainwright *et al.* [89] і А. Dumetre *et al.* [90] було продемонстровано, що озонуванням не вдалося досягти інактивації ооцист *Toxoplasma gondii* при концентрації озону 6 мг/л протягом 12 хвилин та 9,4 мг×хв/л. Проте озон таки може використовуватися для інактивації деяких найпростіших, які мають медичне значення. Результати досліджень Z. Ran *et al.* [91] показали, що озонована вода з концентрацією озону від 0,5 до 5 мг/л протягом 5 хвилин знешкоджує ооцисти *Cryptosporidium*. Більш недавнє дослідження А.Р. Ogura *et al.* [92] показало знешкодження 3.44 Ig *Cryptosporidium parvum* озонованою водою з концентрацією озону 10 мг/л протягом 5 хвилин при температурі 25 °С. Озон у концентрації 5 мг/л був застосований у спробі інактивувати цисти *Giardia duodenalis* у питній воді. Результати L.Y. Nakada *et al.* [93] показали, що хоча цієї концентрації озону і не було достатньо для інактивації усіх цист, проте озонування знизило здатність цист викликати захворювання у лабораторних тваринах, а також знизило реактивність природніх органічних речовин у оброблених зразках води.

В цілому оглянута література з інактивації грибків та найпростіших показала помірну ефективність озону проти цих мікроорганізмів. Це може бути пов'язане з тим, що еукаріотичні клітини мають складнішу будову та є більш резистентними до дії озону за рахунок товстішої клітинної стінки та здатності формувати цисти, які є досить стійкими у зовнішньому середовищі.

**Інактивація вірусів озоном.** Озон використовувався для інактивації вірусів протягом кількох десятиліть. Перші дослідження протівірусних властивостей озону датуються 1960-ми роками. Відтоді озон вивчали та використовували його здатність інактивувати широкий спектр патогенних для людини вірусів, які викликають як кишкові [94], так і респіраторні інфекції [39], а також їх сурогатів [25]. З початком пандемії спричиненої вірусом SARS-Cov-2 інтерес до протівірусної дії озону значно підвищився [39]. Дані з інактивації вірусів озоном

зібрані у Таблиці 1.2 (додаток А2). Значення інактивації виражалися у логарифмах бляшкотворних одиниць на мілілітр субстрату ( $\lg$  БУО/мл) та/або присутність вірусу після обробки підтверджувалася за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Слід відмітити, що у публікаціях кінця 1980х та початку 1990х років наводилися дані про ефективну інактивацію ( $2,7-5 \log$ ) озоном вірусу гепатиту А (не включені у даний огляд). Для експериментів використовувався водний розчин озону концентрацією 0,25-1 мг/л, субстратом служила суспензія вірусу у фосфатному буферному розчині [43,95]. Проте у більш недавніх публікаціях продемонстрована, як ефективність водного озону проти вірусу гепатиту А нанесеного на зелену цибулю (табл. 1.2), так і неспроможність його у газовому стані у концентрації 5 мг/л досягти значимого зменшення концентрації ( $<0,6 \log$ ) вірусу гепатиту А на плодах малини під час обробки протягом 3 хвилин [96].

В цьому контексті продовження досліджень інактивації вірусів озоном має важливе значення для оптимізації та підвищення ефективності методів дезінфекції, забезпечення чистоти води та продуктів харчування, а також можливе попередження спалахів вірусних захворювань.

**Інактивація пріонів озоном.** У той час як озон широко вивчався на предмет його дезінфікуючих властивостей проти широкого кола мікроорганізмів, включаючи бактерії, віруси та гриби, публікацій про його ефективність щодо пріонів є менше. Це є цілком закономірним, враховуючи, що ці збудники викликають нейродегенеративні розлади які є досить рідкісними і самі дослідження з інактивації цих патогенних білків є непростими та дорогавартісними. Кількість змінених білків визначали методом вестерн-блот, якісні зміни спостерігали за розвитком захворювання у лабораторних тварин. Пріони стійкі у зовнішньому середовищі та резистентні до таких традиційних методів дезінфекції, як термічна обробка, хімічні дезінфектанти, ультрафіолетове-випромінювання, що ускладнює їх інактивацію [97]. Ефективне знезараження пріонів можливе при гідролізі цих білків чи руйнуванні третинної структури білка [98]. Дослідження N. Ding *et al.* продемонстрували використання озону як дезінфікуючого засобу проти пріонів

[99]. Було показано, що озон розчинений у воді барботуванням у концентрації 13,7 мг/л може ефективно використовуватися для дезінфекції контамінованої пріонами PrP<sup>Sc</sup> чистої води та стічних вод при тривалості обробки 5 хв. Ті ж дослідники у іншій публікації продовжили демонструвати ефективність озону для очистки стічних вод. Вони показали, що інактивація 2,8 Ig досягалася озонуванням з початковою концентрацією 43,4 мг/л протягом 5 хвилин, а попереднє відстоювання стічної води з позбавленням її частини органічних речовин дозволяло збільшити інактивацію PrP<sup>Sc</sup> до понад 4 Ig [97]. Ефективність газоподібного озону також вивчалася для інактивації пріонів, зокрема на поверхні нержавіючої сталі. Встановлено, що у мишей, яким внутрішньомозково імплантували контаміновані пріонами дроти з нержавіючої сталі, оброблені газоподібним озоном (25000 мг/л, протягом 3 хвилин), пріонне захворювання розвинулася пізніше, ніж у контрольній групі мишей, що вказує на те, що обробка озоном зменшує інфекційність пріонів на нержавіючій сталі [98].

Хоча обробка пріонів озоном є багатообіцяючою в лабораторних дослідженнях, її практичне застосування для знешкодження цих патогенних білків все ще вивчається. Дослідження інактивації пріонів озоном можуть представляти труднощі через унікальні властивості пріонів, проте потенційні переваги для безпеки громадського здоров'я роблять цей напрямок досліджень цінним.

**Ефективність озону проти бактеріальних біоплівок.** Бактерії можуть утворювати біоплівки на різних поверхнях людського тіла, включаючи зуби, слизові оболонки, дихальні шляхи, сечовивідні шляхи, а також на таких медичних пристроях як катетери, контактні лінзи та медичні імпланти [32,100]. Біоплівками можуть покриватися різні штучні поверхні, зокрема труби систем водопостачання та водовідведення, вентиляційних систем, різне обладнання таких галузей, як медична (включаючи стоматологію), фармацевтична, харчовий та рекреаційний сектор [32,101]. Біоплівки створюють захисний бар'єр для бактерій, який може перешкоджати проникненню різних дезінфікуючих засобів [30,102]. Хоча озон продемонстрував певну ефективність проти біоплівки, його здатність проникати та інактивувати бактерії всередині біоплівки, як правило, нижча порівняно з його

ефективністю проти планктонних бактерій [32,81]. Однак варто зазначити, що озон все ж може мати певний вплив на біоплівки. Обробка озоном може порушити структуру біоплівки, пошкодити матрицю з позаклітинних полімерів та зменшити загальну біомасу біоплівки. Це може зробити біоплівку більш чутливою до наступних антимікробних обробок і полегшити видалення бактерій з поверхонь [31,32]. Для ілюстрації ефективності озону проти біоплівок дані з вибраних публікацій зібрано у Таблиці 1.3 (додаток А3).

Загалом, продовження досліджень у цьому напрямку є перспективним, вони можуть призвести до відкриття нових підходів або комбінацій методів обробки, які збільшать ефективність знищення біоплівок або попередження їх утворення на поверхнях.

**Проблеми, пов'язані з використанням озону.** Озон знаходить широке застосування в різних галузях, проте необхідно згадати певні обмеження обробки цим засобом. За рахунок сильних окислювальних властивостей озон не тільки знешкоджує мікроорганізми, але і пошкоджує все з чим контактує. Таким чином, виникають обмеження у виборі ефективної дози озону та часу обробки ним. У медицині та стоматології ідеться про обмеження дози для попередження пошкодження тканин пацієнтів. Зокрема P.S. Subiksha у своїй праці по застосуванню озону у стоматології вказує, що навіть низькі концентрації озону можуть викликати головний біль, подразнення або сухість носа, горла та очей [42]. Існують обмеження щодо впливу озону і для працівників інших сфер, де його застосовують. При комерційному застосуванні озону перевірка людей, які можуть контактувати з озоном у промисловості, є обов'язковою, оскільки він впливає на дихальні шляхи людини. Згідно з P. Wolkoff *et al.*[103] перебування у приміщенні з озоном у повітрі може викликати подразнення очей, а вдихання озону може викликати подразнення та пошкодження дихальних шляхів. Люди з наявними респіраторними захворюваннями, такими як астма чи хронічне обструктивне захворювання легень, можуть бути більш сприйнятливими до респіраторного впливу озону [104,105]. Токсичність озону в першу чергу пояснюється його сильними окисними властивостями. Вплив високого рівня озону може призвести

до оксидативного стресу, запалення та пошкодження клітин і тканин. За результатами досліджень С. Michaudel *et al.* [106] було продемонстровано, що однократний вплив озону викликав швидке руйнування епітеліального бар'єру з підвищеним залученням нейтрофілів, виробництвом активних форм кисню, гіперчутливістю дихальних шляхів та експресією IL-33 в епітеліальних і міелоїдних клітинах у мишей. У іншому експерименті *in vivo* G. Valacchi *et al.* [107] продемонстрували, що при концентраціях у 0,8 мг/л протягом 6 днів (експозиція 6 годин на добу) озон здатний впливати як на легені, так і на шкіру, викликаючи виснаження  $\alpha$ -токоферолу та індуючи реакції, пов'язані зі стресом, як в епідермісі шкіри, так і в епітелії дихальних шляхів. Крім того, групою дослідників M.I. Gilmour *et al.* [108] було показано, що вплив озону підвищує сприйнятливність мишей до легеневої бактеріальної інфекції спричиненої *Streptococcus zooepidemicus*, знижує функцію альвеолярних макрофагів та підвищує смертність тварин від інфекції.

У харчовій промисловості обмеження стосується обробки харчових продуктів, особливо свіжих листових овочів. M.V. Shynkaryk *et al.* та T.I. Ryatkovskyy *et al.* у своїх працях [109,110] продемонстрували зміну кольору листків шпинату при тривалій обробці газоподібним озоном у концентрації 0,106 мг/л чи короткотривалій обробці вищою (1,5 мг/л) концентрацією. Озон підходить для обробки приміщень, поверхонь та обладнання [38], але потрібно враховувати, що елементи, які обробляються озоном повинні бути стійкими до корозії [111]. R. Pandiselvam *et al.* [112] показали, що використання озону у концентрації 47-106 мг/л протягом двох місяців може призвести до пошкодження гумових деталей.

Озон розкладається до нетоксичного кисню, проте реагуючи із субстратом він може утворювати побічні продукти та модифікувати біомолекули у ньому. P. Li *et al.* [113] довели, що озон реагує з бромідом розчиненим у воді, утворюючи бромат, який є канцерогеном. T. Manasfi *et al.* [48] продемонстрували, що озонування шляхом окислення поліненасичених жирних кислот утворює альдегіди, кетони та кетокислоти.

Ще одним недоліком є те, що озон не може зберігатися та швидко розкладається, тому виробництво озону на місці є обов'язковим. При виробництві озону потрібно враховувати, що при високих його концентраціях у повітрі він може бути вибухонебезпечним. Проведені К. Koike *et al.* [114] експерименти показали, що озон змішаний з киснем у концентрації понад 10-11 % при кімнатній температурі та атмосферному тиску може призвести до вибухової ланцюгової реакції до повної декомпозиції озону.

Вищеперераховані недоліки та застереження не применшують переваг озону, як антибактеріального засобу. Подолавши ці перешкоди, потенційні переваги озонування можуть бути реалізовані в цих галузях, сприяючи покращенню гігієни, безпеки та якості продуктів і послуг. Щоб пом'якшити потенційні ризики, пов'язані з впливом озону, важливо дотримуватися рекомендованих інструкцій і правил безпеки. Для забезпечення безпеки осіб, які працюють з озоном, встановлені максимально допустимі концентрації озону, для України гранично допустима концентрація озону у повітрі становить 0,1-0,16 мг/м<sup>3</sup>. Крім того, для мінімізації впливу та захисту людей від надмірних концентрацій озону рекомендується запровадити відповідні засоби технічного контролю, такі як системи вентиляції та засоби індивідуального захисту.

### ***Високий гідростатичний тиск***

Обробка високим гідростатичним тиском – це нетермічний метод, який передбачає піддавання харчових продуктів, напоїв або інших матеріалів підвищеному тиску в діапазоні від 100 до 1000 МПа, як правило, при кімнатній або трохи вищій температурі для інактивації мікроорганізмів та ферментів [115–117]. У фармацевтичній та косметичній промисловості цей метод додатково використовується для мікроінкапсуляції лікарських речовин [118], а також для зменшення розміру, змішування та стабілізації дисперсій, емульсій або крапель [119,120].

Обробка високим тиском вважається методом нетермічної обробки речовин, незважаючи на адіабатичне підвищення температури, яке відбувається під час

застосування тиску до фізичних об'єктів. Таке підвищення температури є тимчасовим і локальним, і триває лише протягом періоду застосування тиску. Коли тиск зменшується, температура також знижується і може навіть опускатися нижче початкової, якщо під час обробки відбувається теплообмін між оброблюваним продуктом і елементами камери високого тиску [121]. Крім того, обробку можна проводити із додатковим охолодженням кожуху камери високого тиску [122]. Хоча підвищення температури, викликане тиском, дійсно відбувається, воно не є основним засобом досягнення мікробної інактивації. Такий спосіб обробки мінімізує вплив тепла на чутливі поживні речовини, ароматизатори та інші бажані властивості субстрату, які можуть бути зменшені чи втрачені через тривалий вплив підвищених температур [122,123].

Відомо, що ВГТ інактивує різні мікроорганізми, включаючи бактерії, віруси, дріжджі, цвіль, а також ферменти, зберігаючи при цьому поживні та смакові властивості обробленого продукту [117,122,124]. Зазначається, що обробка ВГТ не руйнує ковалентні зв'язки тому зміни у таких низькомолекулярних сполуках як вітаміни, пігменти та ароматизатори є мінімальними [123].

Механізм мікробної інактивації обробкою ВГТ вивчений не повністю, але вважається, що одним із факторів впливу є денатурація білків та ферментів що призводить до порушення структури та функцій клітин, на які подіяли тиском [125]. Крім того гідростатичні ефекти викликають механічне навантаження на клітинні структури, що призводить до деформацій і пошкоджень клітинних мембран, втрата цілісності останніх спричиняє загибель клітин [116,120]. Пошкодження мембрани бактеріальних клітин високим тиском викликає внутрішньоклітинний окислювальний стрес [126,127]. Крім того не менш важливим фактором є вплив на нуклеїнові кислоти [128]. Хоча вони значно менш чутливі до впливів високого тиску порівняно з гнучкими ліпідними мембранами, водневі зв'язки, які забезпечують їх спіральну структуру можуть бути розірвані під дією високого тиску [129]. Таким чином спричинені тиском структурні зміни в молекулах дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) і рибонуклеїнової кислоти (РНК) можуть перешкоджати реплікації, транскрипції та трансляції ДНК.

Механізми впливу ВГТ особливо ефективні проти вегетативних клітин мікроорганізмів, але обробка ним без додаткової термічної обробки не може повністю інактивувати бактеріальні спори, щільні оболонки яких роблять їх резистентними до багатьох методів обробки [130,131]. Показано, що високий тиск може запускати механізм проростання бактеріальних спор *Bacillus spp.*, роблячи їх сприйнятливими до подальших обробок [132], а обробка з кількома циклами підвищення тиску/зниження тиску у порівнянні з обробкою одним циклом такої ж тривалості має кращу ефективність [16].

**Інактивація збудників, які можуть викликати харчові інфекції за допомогою ВГТ.** За рахунок описаних вище механізмів, ВГТ ефективно застосовувався для інактивації мікроорганізмів, які можуть контамінувати харчові продукти та становити небезпеку для людського здоров'я та життя. Порівняння стійкості до тиску вегетативних клітин показало, що серед харчових патогенів штами *Escherichia coli* O157:H7 були найстійкішими. Міністерство сільського господарства США визнало цей штам індикаторним, а процес обробки ВГТ, який досягає 5 lg інактивації цього штаму – достатнім для забезпечення мікробної безпеки продукту [117].

Для ілюстрації ефективності обробки ВГТ бактеріальних суспензій та різних рідких продуктів харчування контамінованих різними мікроорганізмами, дані з вибраних публікацій зібрано у Таблиці 1.4 (додаток А4).

При обробці бактеріальних культур *S. aureus* початкової концентрації ~9 lg КУО/мл тиском 400 МПа А. Jofré *et al.* [133] продемонстрували, що при повній інактивації 1.55-2.01 lg КУО/мл частина мікроорганізмів (до 1.41 lg КУО/мл) зазнає сублетальних пошкоджень і не росте на селективному середовищі (триптично-соевий агар з дріжджовим екстрактом з 10 % NaCl). J. Kameník *et al.* [134] при інактивації ВГТ *E. coli* нанесеної на татарський біфштекс змогли відновити сублетально пошкоджені бактерії шляхом інокуляції зразків на рідке середовище збагачення незалежно від того який тиск був застосований (400 та 600 МПа протягом 5 хвилин).

Для ілюстрації ефективності обробки ВГТ напіврідких та твердих продуктів харчування контамінованих різними мікроорганізмами, дані з вибраних публікацій зібрано у Таблиці 1.5 (додаток А5).

Проаналізовані дослідження показали, що інактивація тест-штамів є пропорційною до величини гідростатичного тиску та часу обробки, однак важливо зазначити, що реакція бактерій на високий тиск може змінюватися залежно від виду, штаму та фізіологічного стану бактеріальних клітин. Загалом грам-негативні бактерії більш чутливі до обробки ВГТ порівняно з грам-позитивними бактеріями. Це пов'язано з відмінностями в структурі клітинної стінки цих типів бактерій. Зовнішня мембрана грам-негативних бактерій містить ліпополісахариди, які чутливі до високого тиску, тоді як її відсутність та більш товстий шар пептидоглікану в клітинних стінках грам-позитивних бактерій забезпечує їм певну стійкість до пошкоджень, спричинених ВГТ. Проте навіть в межах виду чутливість штамів до ВГТ може відрізнятися. Так, Y. Liu *et al.* [126] показали, що серед 19 штамів *Campylobacter jejuni*, інокульованих у курячий фарш, який було оброблено ВГТ при 300 МПа та температурі 30 °С протягом 3 хвилин дані по інактивації сильно відрізнялися. Чутливі штами були інактивовані в межах приблизно 3 lg КУО/г, тоді як інактивація найрезистентнішого штаму *C. jejuni* HСJ2316 становила лише 0.5 lg КУО/г. Y. Zhou *et al.* [135] провели подібний експеримент з лабораторним штамом *Escherichia coli* JM109 та шістьма штамами *E. coli* O157:H7 інокульованими у яловичий фарш. В той час як обробка високим тиском при 400 МПа та температурі 25 °С протягом 15 хвилин інактивувала лабораторний штам повністю (~8 lg КУО/г), інактивація патогенних штамів коливалася від 1.57 lg КУО/г (штам SEA13B88) до 3.49 lg КУО/г (штам WM98A06026). Ці результати підкреслюють, чому один штам мікроорганізму не слід використовувати в дослідженнях, які оцінюють ефективність процесу інактивації ВГТ.

S.H. Lee *et al.* [136] продемонстрували, що навіть при невисокій інактивації мікроорганізмів обробкою ВГТ спостерігалось сповільнення росту вегетативних клітин *Clostridium perfringens*. Після обробки ВГТ 500 МПа 4-ма циклами тривалістю по 3 хвилини було досягнуто зменшення концентрації бактерій на 1,9

lg КУО/г. Після такої обробки популяція бактерій не зростала протягом двох тижнів при 4 °С.

Незважаючи на позитивні результати експериментів з інактивації різних мікроорганізмів ВГТ, оброблені харчові продукти не є стерильними і повинні зберігатися охолодженими. Сублетально пошкоджені бактеріальні клітини за наявності відповідних умов (наявність поживних речовин, зміна температури, час зберігання продукту) можуть відновлюватися та розмножуватися [137]. Хоча деякі дослідники показали, що при дотриманні температурного режиму при зберіганні оброблених продуктів, сублетально пошкоджені клітини не відновлюються, а гинуть [14]. Так, при обробці суміші із семи штамів *Campylobacter jejuni* інокульованих у курячу печінку ВГТ 250 при МПа та 4 °С протягом 10 хвилин, інактивація становила 1.3 lg КУО. Зберігання при 4 °С протягом 1 тижня призводило до додаткового зменшення популяції *C. jejuni* на 1.6 lg КУО. Таким чином, продемонстрована ефективність обробки ВГТ проти широкого спектру збудників, які передаються через їжу. Технологія обробки ВГТ також може бути поєднана з існуючими методами обробки в харчовій промисловості для потенціювання їх дії.

### ***Електричне поле***

Обробка електричним полем може відбуватися при застосуванні помірного електричного поля або імпульсного електричного поля для інактивації мікроорганізмів за допомогою процесу електропорації – підвищення проникності та руйнування клітинної мембрани бактерій [138,139]. Обробка помірним електричним полем передбачає використання безперервного електричного поля низької інтенсивності (зазвичай в діапазоні 10-200 В/см), тоді як обробка імпульсним електричним полем використовує короткі спалахи електричних полів високої інтенсивності (зазвичай в діапазоні 1-110 кВ/см). Електричні імпульси, що використовуються при ІЕП, є надзвичайно короткими і зазвичай тривають від десятків наносекунд до мілісекунд [138]. Така обмежена тривалість зменшує час впливу електричної енергії, що зводить до мінімуму підвищення температури

оброблюваного матеріалу [140]. Крім того, оскільки імпульси застосовуються з перервами і між ним є інтервали без застосування електричного поля, які дозволяють розсіювати тепло що генерується під час імпульсу [141].

Для обробки електричними полями електропровідний субстрат поміщають між електродами і електричне поле яке виникає між ними створює накопичення зарядів протилежної полярності по обидва боки двошарової клітинної мембрани бактерій чи інших клітин у цьому субстраті. Коли електричне поле досягає певного граничного значення, у цих мембранах утворюються пори, а в подальшому локальні структурні зміни та швидке руйнування клітинної мембрани, яке може бути постійним або тимчасовим, залежно від інтенсивності та умов обробки [142,143].

Технологія обробки електричними полями застосовується у медицині, фармації, косметології та харчовій промисловості. Обидва методи ефективно інактивують широкий спектр мікроорганізмів, що робить їх придатними для стерилізації рідких та напіврідких гомогенних харчових продуктів [144], а також щільних агаризованих субстратів [145]. Крім того ефект електропорації дозволяє використовувати ці методи для екстракції фітокомпонентів [146] та проведення маніпуляцій з раковими клітинами [147]. Ці методи, як правило, є більш енергоефективними завдяки їхнім цілеспрямованим, швидким і мінімальним тепловим механізмам мікробної інактивації, порівняно з традиційними методами нагрівання, які пов'язані зі значними тепловими втратами і довшим часом обробки [148].

Обробку електричними полями легко поєднати із термічною обробкою застосовуючи омичне нагрівання гомогенного субстрату. Омичне нагрівання, також відоме як нагрівання Джоуля, передбачає пропускання електричного струму через провідний матеріал (наприклад, якусь рідину чи харчовий продукт) для рівномірного виділення тепла по всьому матеріалу за рахунок його електричного опору. Тепло генерується внутрішньо, забезпечуючи рівномірний нагрів без появи температурних градієнтів, пов'язаних зі звичайними зовнішніми методами нагрівання [149]. Поєднання обробки електричним полем з омичним нагріванням

забезпечує синергічний підхід до інактивації мікроорганізмів та термічної обробки [150].

### ***Ультразвук***

Ультразвукова обробка, використання ультразвукових хвиль для інактивації мікроорганізмів, є ефективним нетермічним антибактеріальним методом, який працює шляхом генерування високочастотних звукових хвиль (зазвичай від 20 кГц до 1 МГц). Ці звукові хвилі викликають швидкі зміни тиску в рідкому середовищі, що призводить до утворення і руйнування мікроскопічних бульбашок в процесі, відомому як кавітація [151]. Ефект кавітації створює інтенсивні локальні сили зсуву, високі температури і вільні радикали [152], які руйнують клітинні стінки і мембрани бактерій, що призводить до лізису і загибелі їх клітин [153]. Обробка ультразвуком може ефективно поєднуватися з іншими нетермічними методами, такими як обробка високим тиском та імпульсним електричним полем [10,154], а також потенціювати дію таких антибактеріальних речовин як антимікробні пептиди [155,156]. Крім того, така обробка може використовуватися разом з помірними термічними методами для створення синергічного ефекту, зменшуючи термічне навантаження, необхідне для досягнення інактивації бактерій [24,157]. Ультразвукова обробка широко використовується в різних галузях промисловості, включаючи харчову промисловість для обробки напоїв і рідких продуктів [158,159], фармацевтичну промисловість для емульгування, гомогенізації, екстракції біологічно активних сполук, кристалізації, зневоднення, дегазації та піноутворення [152,153,160].

### ***Рідкі дезінфектанти та антисептики***

Рідкі дезінфікуючі засоби охоплюють різні хімічні класи, кожен з яких має свої переваги та обмеження з точки зору їх ефективності та економічної доцільності застосування.

**Йодофори** – це клас дезінфікуючих засобів, які використовують активні іони йоду для інактивації мікроорганізмів шляхом окислення і руйнування клітинних

структур. Вони широко застосовуються в закладах охорони здоров'я завдяки своїй швидкій антимікробній дії та широкому спектру ефективності проти бактерій, грибків і деяких вірусів [161–163]. У харчовій промисловості йодофори зазвичай використовуються на підприємствах з виробництва напоїв та молочних продуктів, де вони служать ефективними дезінфікуючими засобами для обладнання та поверхонь [164]. Антимікробна дія йодофорів спрямована одразу на декілька різних мішеней: він збільшує окисний потенціал, спричиняє денатурацію та втрату функції білків та ферментів, пошкоджує нуклеїнові кислоти в клітинах мікроорганізмів, реагує із фосфоліпідами цитоплазматичної мембрани, збільшуючи її проникність [165]. У порівнянні з дезінфікуючими засобами на основі хлору, йодофори є менш корозивними, відносно економічно вигідними і демонструють більшу стійкість на поверхні, що забезпечує тривалу антимікробну активність [164].

Незважаючи на свої переваги, йодофори можуть викликати подразнення шкіри, очей і дихальних шляхів, що вимагає обережного поводження і відповідних заходів індивідуального захисту [161,166]. Крім того, препарати на основі йоду, як відомо, залишають плями на певних поверхнях [165] і можуть бути корозійно активними щодо металів, зокрема алюмінію та міді, що обмежує їхнє застосування в певних промислових умовах [167,168]. Для забезпечення оптимальної антимікробної ефективності та сумісності з матеріалами йодофори слід використовувати відповідно до інструкцій виробника та галузевих норм.

**Дезінфікуючі засоби на основі хлору** широко використовуються в медицині та харчовій промисловості, переважно у вигляді розчинів гіпохлориту натрію ( $\text{NaOCl}$ ), для забезпечення високого рівня деконтамінації. Ці дезінфікуючі засоби мають широкий спектр антимікробної дії проти бактерій, бактеріальних біоплівоч, вірусів і грибків, що робить їх високоефективними у зниженні ризику передачі різних захворювань [169,170]. За механізмом дії дезінфектанти на основі хлору є подібними до йодофорів і знешкоджують мікроорганізми за рахунок окислення, порушення цілісності мембран, денатурації білків та пошкодження ДНК [171]. Хлор, будучи сильнішим окисником, викликає значніші пошкодження мембран та

денатурацію білків. У медицині та харчовій промисловості гіпохлорит натрію використовують для санітарної обробки поверхонь і обладнання [172], а також для очищення питної води [173,174]. Для використання гіпохлорит натрію зазвичай купують у концентрованій рідкій формі і розводять до відповідної концентрації. Для інактивації мікроорганізмів отриманий розчин наносять на тверді поверхні, включаючи зони контакту з харчовими продуктами.

Гіпохлоритна кислота ( $\text{HOCl}$ ) – ще один дезінфікуючий засіб на основі хлору, який широко використовується в харчовій промисловості для дезінфекції поверхонь, що контактують з харчовими продуктами, і технологічного обладнання. Він демонструє потужну антимікробну дію проти бактерій, дріжджів і цвілі і особливо цінний на птахопереробних підприємствах, де його застосовують для контролю мікробного забруднення [175,176]. Як і гіпохлорит натрію, гіпохлоритну кислоту можна генерувати на місці шляхом електролізу, пропонуючи високоефективну та екологічно чисту альтернативу для контролю мікроорганізмів у харчовій промисловості [177–179]. В умовах застосування дезінфектанту за наявності високого вмісту органічних речовин гіпохлоритна кислота є більш стабільною, ніж гіпохлорит натрію, вона постійно генерує іони хлору. Тому цей засіб може бути більш корисним для обробки забруднених поверхонь навколишнього середовища, наприклад, у лікарнях [180].

Однак неналежне поводження з дезінфікуючими засобами на основі хлору може становити професійну небезпеку, включаючи подразнення дихальних шляхів і шкіри, що вимагає їх використання в добре провітрюваних приміщеннях і суворого дотримання інструкцій виробника [179,181]. Крім того, ці сполуки можуть викликати корозію певних поверхонь, зокрема металів, причому надмірна концентрація вільного хлору призводить до руйнування матеріалу, а недостатня – до зниження антимікробної ефективності [182]. Після розведення розчини гіпохлориту натрію швидко розкладаються, що призводить до поступової втрати ефективності з часом. Також іони хлору з розчинів гіпохлориту можуть вступати в реакцію з білками та органічними речовинами, що призводить до утворення

потенційно шкідливих побічних продуктів, включаючи діоксини та хлоровані органічні сполуки [183].

**Спирт та дезінфікуючі засоби на спиртовій основі.** Етанол, ізопропанол та н-пропанол широко використовуються в харчовій промисловості для дезінфекції поверхонь та обладнання, а також у дезінфікуючих засобах для рук та дезінфікуючих серветках [184]. Дезінфікуючі засоби на спиртовій основі проявляють свою антимікробну дію за рахунок денатурації білка, руйнування мембрани та дегідратацію клітин мікроорганізмів [185]. Антимікробна ефективність дезінфікуючих засобів на спиртовій основі сильно залежить від концентрації, причому оптимальна активність зазвичай спостерігається у водних розчинах з вмістом спирту від 60 % до 90 %. Більш високі концентрації не обов'язково посилюють антимікробні властивості, оскільки для полегшення проникнення мікробних клітин необхідна невелика кількість води. Спирти швидко випаровуються, що робить їх особливо корисними в тих випадках, коли необхідна санітарна обробка без залишків і без ополіскування. Однак їхня ефективність обмежена в присутності органічних речовин, що зумовлює необхідність попереднього очищення сильно забруднених поверхонь перед застосуванням [186].

**Окисники** функціонують переважно через окислення, яке призводить до пошкодження та загибелі мікробних клітин. Їх антимікробна активність обумовлена утворенням активних форм кисню, які викликають окислювальний стрес і структурні пошкодження клітинних компонентів. Перкарбонат натрію, який зазвичай називають кисневим відбілювачем – це стабільний білий кристалічний порошок, який після розчинення у воді розкладається на перекис водню і карбонат натрію. Утворений водний розчин перекису водню має сильні окислювальні властивості, що зумовлює його антимікробну активність широкого спектру дії [187]. Завдяки швидкому розкладанню на нетоксичні побічні продукти, включаючи воду і карбонат натрію, перкарбонат натрію часто розглядається як екологічно чиста альтернатива традиційним хімічним дезінфікуючим засобам [188].

Перекис водню ( $H_2O_2$ ) – це високоактивний окислювач, який зазвичай використовується у водних розчинах або парах стерилізаторів для дезінфекції та

стерилізації. Він має потужні антимікробні властивості проти бактерій, вірусів, грибків і спор, що робить його цінним дезінфікуючим засобом у харчовій, медичній та фармацевтичній галузях [189]. У чистому вигляді розчини перекису водню нестабільні і швидко розкладаються на воду та кисень. Для подовження терміну придатності та підвищення ефективності перекис водню часто хімічно стабілізують або комбінують з іншими дезінфектантами в комерційних рецептурах. Його газоподібна форма особливо корисна для стерилізації закритих приміщень, таких як чисті кімнати та пакувальні приміщення для харчових продуктів чи приміщення у медичних закладах [190,191].

Надоцтова кислота (НОК) – це окислювальний дезінфікуючий засіб широкого спектру дії, який широко використовується в харчовій промисловості та охороні здоров'я завдяки своїй потужній антимікробній ефективності проти бактерій, вірусів і грибків [192]. Його можна застосовувати у вигляді спрею або шляхом занурення для обробки невеликих харчових продуктів, що робить цей засіб універсальним у протоколах санітарної обробки [175]. НОК часто використовується в поєднанні з перекисом водню, посилюючи його окислювальну здатність та ефективність інактивації мікроорганізмів [193,194]. Однією з ключових переваг надоцтової кислоти є її швидке розкладання на екологічно безпечні продукти розпаду, включаючи оцтову кислоту, кисень і воду, що мінімізує вплив на навколишнє середовище порівняно з іншими хімічними дезінфікуючими засобами [195]. Крім того, НОК менш корозійно активна до металів, ніж дезінфікуючі засоби на основі гіпохлориту, що робить її кращим варіантом для дезінфекції поверхонь та обладнання.

**Четвертинні амонієві сполуки (ЧАС)** використовуються у медичних закладах та на харчових підприємствах і в ресторанах як надійні дезінфікуючі засоби завдяки їх широкому спектру антимікробної активності, стабільності та економічній ефективності [196]. Це катіонні поверхнево-активні речовини, які діють як дезінфектанти, руйнуючи мікробні мембрани та денатуруючи білки [197,198]. Їх антимікробна активність в першу чергу пояснюється позитивно зарядженою (катіонною) структурою, яка взаємодіє з негативно зарядженими

поверхніми мікроорганізмів. Найпоширенішим ЧАС є бензалконію хлорид, який демонструє сильну бактерицидну активність проти таких патогенних мікроорганізмів, як кишкова паличка, золотистий стафілокок та інші [198]. Ці сполуки зазвичай застосовуються у водних розчинах шляхом розпилення, протирання або додавання у воду. Деякі дезінфікуючі засоби на основі ЧАС не потребують змивання, оскільки залишкові сліди можуть забезпечувати пролонговану антимікробну дію [199]. Однак ефективність ЧАС залежить від правильної концентрації та достатнього часу контакту, що вимагає суворого дотримання рекомендацій виробника. Незважаючи на свої переваги, ЧАС є неефективними проти бактеріальних спор [200] і демонструють знижену ефективність у присутності органічних речовин або сильного забруднення, що може перешкоджати їх антимікробній дії.

Сучасний стан застосування озону у газоподібному стані, його водному розчині, озонованих олій, обробки високим гідростатичним тиском, а також ефективність спиртовмісних антисептиків детально висвітлені у публікаціях автора [201–205].

Оригінали статей доступні за посиланнями:

<https://doi.org/10.61751/bmbr.2706-6290.2023.3.47>

<https://doi.org/10.61751/bmbr/4.2023.53>

<https://dx.doi.org/10.15584/ejcem.2025.2.28>

[https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-6\(52\)-1683-1696](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-6(52)-1683-1696)

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Відповідно до мети та завдань наукова робота носила експериментальний характер. Експерименти виконувалися на кафедрі харчових наук та технологій Університету штату Огайо, США (Department of Food Science and Technology at the Ohio State University), кафедрі харчової, сільськогосподарської та біологічної інженерії Університету штату Огайо, США (Department of Food, Agricultural and Biological Engineering at the Ohio State University) та кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України.

Комісією з питань біоетики Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України порушень морально-етичних норм під час проведення науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 77 від 18 квітня 2024 року, протокол № 84 від 20 січня 2026 року).

#### 2.1 Матеріали

##### 2.1.1 Штами бактерій

Для експериментів з газоподібним озоном та рідкими дезінфектантами використовувався штам *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43889, отриманий із колекції культур мікроорганізмів кафедри харчових наук та технологій Університету штату Огайо (Department of Food Science and Technology at the Ohio State University).

Для частини експериментів з газоподібним озоном та експериментів з інтерналізації бактерій у листя шпинату під дією вакууму використовувався цей же штам, а також додатково *E. coli* K12 отриманий з тієї ж колекції культур. Штам *E. coli* K12 також використовувався для експериментів з обробкою сирих курячих яєць помірним електричним полем.

Для експериментів із розпадом озону у водному розчині використовували штами *E. coli* ATCC 25922 та *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 отримані з колекції культур Лабораторії мікробіологічних та паразитологічних досліджень ТНМУ. Штам кишкової палички є штамом контролю якості, зокрема в аналізах чутливості антитіл [206]. Даний штам золотистого стафілококу традиційно використовується для перевірки дезінфектантів [207].

Для експериментів з високим тиском було обрано непатогенний штам *Listeria innocua* ATCC 33090 (загальноприйнята модель *Listeria monocytogenes* [208]) отриманий із колекції культур мікроорганізмів кафедри харчових наук та технологій Університету штату Огайо (Department of Food Science and Technology at the Ohio State University). Додатково використовували штам *Bacillus subtilis* 168 (Department of Food Science and Technology at the Ohio State University).

### **2.1.2 Листя молодого шпинату**

Шпинат *Spinacia oleracea*, молоді листки якого використовувалися в експериментах, був вирощений із насіння (Burpee Gardens, Уормінстер, Пенсільванія, США) у теплиці Biological Sciences Greenhouse при Університеті штату Огайо. За потреби додавали упакований молодий шпинат, придбаний у місцевому продуктовому магазині (Kroger, Колумбус, Огайо, США) в день експерименту, щоб отримати необхідну кількість шпинату для обробки.

### **2.1.3 Курячі яйця**

Великі яйця з цільною шкаралупою класу AA (найсвіжіші та найякісніші) були отримані від Hemmelgarn & Sons, Inc. (Колдуотер, Огайо, США) і зберігалися менше ніж 3 тижні в холодильнику перед обробкою.

### **2.1.4 Зразки води**

Для перевірки ефективності знезараження води озоном брали зразки водопровідної (м. Тернопіль, мікрорайон «Центр»), джерельної (с. Гаї-Гречинські, Тернопільський район) та води відкритих водойм (Тернопільський став). Зразки

води відбирали у стерильні флакони в день експерименту та доставляли в лабораторію. При заборі водопровідної води кран стерилізували полум'ям, після чого воду спускали протягом 10 хвилин. Джерельну воду відбирали безпосередньо зі струменя. Проби води з Тернопільського ставу відбирали на відстані 0,4 м від берега та глибині 0,2 м.

### **2.1.5 Дезінфікуючі засоби**

Використовувалися наступні дезінфікуючі засоби: а) 200 мг/л розчину гіпохлориту натрію (Clorox, Окленд, Каліфорнія, США); б) 200 мг/л розчину гіпохлориту натрію з 0,036 % додецилсульфату натрію (Sigma-Aldrich, Сент-Луїс, Міссурі, США); в) Pro-San L, комерційно приготовлений розчин, що містить 0,66 % лимонної кислоти, 0,036 % додецилсульфату натрію (Microcide, Inc., Детройт, Мічиган, США); та г) водний розчин 0,66 % леулінової кислоти (Sigma-Aldrich, Сент-Луїс, Міссурі, США) з додаванням 0,036 % додецилсульфату натрію.

## **2.2 Методи**

### **2.2.1 Культивування штамів бактерій, приготування суспензій вегетативних клітин та спор**

При підготовці до експериментів петлю замороженої (при - 80 ° C) культури *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 інокулювали у бульйон LB (Difco, Vестон-Dickinson, Спаркс, Меріленд, США) та інкубували протягом ночі при 37 ° C. Після цього культуру пересівали у свіжий бульйоні LB для другої інкубації. Вирощену культуру збирали центрифугуванням при 8000 об/хв протягом 10 хв (ІЕС Centra MP4R, Нідхем, Массачусетс, США), а осад ресуспендували в 0,1 % пептонній воді (Difco, Vестон-Dickinson, Спаркс, Меріленд, США). Концентрацію бактеріальної популяції регулювали спектрофотометричним (турбідиметричним) аналізом (спектрофотометр Thermo Spectronic Genesys 5, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), отримуючи концентрацію бактеріальної популяції ~ 10<sup>9</sup> КУО/мл (9 lg КУО/мл).

При використанні *E. coli* K12 бактеріальну суспензію готували так само.

Для приготування суспензій *Listeria innocua* ATCC 33090 петлю замороженої (при - 80 ° C) культури інокулювали у триптичний соєвий бульйон (ТСБ, Difco, Becton Dickinson, Спаркс, Меріленд, США) та інкубували при температурі 35 ° C протягом 24 годин. Після першої добової інкубації культуру пересівали у свіжий ТСБ для другої інкубації перед використанням в експериментах. Отриману культуру центрифугували при 8000 об/хв і температурі 4 ° C протягом 10 хв (ІЕС Centra MP4R, Нідхем, Массачусетс, США), а осад промивали стерильною деіонізованою водою. Процедури центрифугування та промивання повторювали ще раз, а отриманий осад ресуспендували в стерильній деіонізованій воді. Концентрацію бактеріальної суспензії (~ 10<sup>10</sup> КУО/мл) підтверджували шляхом посіву на триптичний соєвий агар з 0,6 % дріжджового екстракту (ТСАДЕ). Всі експерименти проводились протягом 1-2 годин після отримання суспензії бактерій. Обґрунтуванням використання дистильованої води було забезпечення низької фонові електропровідності зразків. Це було важливо з двох причин: 1) низька електропровідність забезпечувала мінімальне нагрівання зразків під час вимірювання електропровідності; 2) це забезпечило б виявлення сигналу (зміни електропровідності внаслідок вивільнення клітинних складових у позаклітинний простір під час обробки) порівняно з фоном.

При роботі із штамом *Bacillus subtilis* 168 культуру відновлювали на живильному бульйоні Nutrient broth (Difco, Becton Dickinson, Спаркс, Меріленд, США) добовою інкубацією при 37 ° C, після чого інокулювали на середовище для спороутворення Difco sporulation medium (DSM) (Difco, Becton Dickinson, Спаркс, Меріленд, США). Інокульовані чашки Петрі інкубували 37 ° C 2-3 дні. Спори акуратно змивали з поверхні агару стерильною деіонізованою водою та відмивали від залишків середовища шляхом кількох циклів центрифугування при 7000 × g протягом 10 хвилин (ІЕС Centra MP4R, Нідхем, Массачусетс, США) та ресуспендування у стерильній деіонізованій воді.

У подальшому непророщені спори відділялися від вегетативних клітин та пророщених спор шляхом центрифугування суспензії у середовищі з різною щільністю. Для цього суспензію спор додавали у 50 мл пробірки заповнені

розчинами сахарози різної концентрації (згори донизу 5 мл 70 %, 5 мл 80 % та 20 мл 90 %). Відділені непророщені спори відмивали від сахарози стерильною деіонізованою водою та центрифугуванням при  $7000 \times g$  протягом 10 хвилин. Чистота суспензії спор підтверджувалася мікроскопічно за допомогою фазово-контрастної мікроскопії (Nikon Eclipse Ti, Nikon Instruments Inc., Токіо, Японія), отримана суспензія мала  $< 5\%$  вегетативних клітин. Відмиті спори зберігали при  $4^\circ C$  до експерименту у суспензії в деіонізованій воді в концентрації  $10^9$  КУО/мл. Перед експериментом суспензію розводили до робочої концентрації  $10^7$  КУО/мл.

При роботі із штамом *S. aureus* ATCC 6538 готували суспензію з добової бульйонної культури (м'ясо-пептонний бульйон). Добові культури осаджували при 3000 об./хв протягом 5 хвилин на центрифугі 80-2 Benchtop Universal Laboratory Centrifuge (Jiangsu Jinyi Instrument Technology Co., Чанчжоу, Китай), осад ресуспендували у стерильному фізіологічному розчині. Процес центрифугування повторювали ще раз для відмивання клітин від залишків живильного середовища, осад ресуспендували повторно. Стандартизацію суспензій здійснювали відповідно до оптичного стандарту мутності 0,5 одиниць за шкалою McFarland ( $\sim 8 \lg$  КУО/мл) за допомогою денситометра Biosan DEN-1 (BioSan SIA, Рига, Латвія).

Кількість мікроорганізмів у всіх суспензіях перевіряли методом серійних розведень з подальшим висіванням на відповідні живильні середовища.

### **2.2.2 Оцінка впливу стерильної деіонізованої води на *L. innocua***

Для оцінки впливу стерильної деіонізованої води на *L. innocua* 50 мл добової культури вирощеної в ТСБ збирали центрифугуванням при 8000 об./хв протягом 10 хв. Частину осаду ресуспендували в 5 мл стерильної деіонізованої води. Початкова концентрація бактерій у цій суспензії становила  $\sim 10 \lg$  КУО/мл. Іншу частину осаду ресуспендували в 5 мл 0,1 % пептонної води (Difco, Vестон Dickinson, Спаркс, Меріленд, США), отримуючи таку ж початкову концентрацію бактерій. Обидві клітинні суспензії витримували протягом 60 хв при кімнатній температурі ( $20^\circ C$ ). Зразки з обох суспензій відбирали при 0 і 60 хв експозиції. Зразки послідовно розводили і висівали на два середовища: неселективне середовище ТСАДЕ

(триптичний соєвий агар з додаванням 0,6 % дріжджового екстракту) (Difco, Becton Dickinson, Спаркс, Меріленд, США) та селективне середовище ТСАДЕ з додаванням 5 % NaCl. Чашки Петрі інкубували протягом 48 год при 35 ° С.

### **2.2.3 Обробка поверхні листя шпинату**

Поверхню листя шпинату дезінфікували, занурюючи кожен листок у 1,2 % розчин гіпохлориту натрію (20 % відбілювач; Clorox Inc., Окленд, Каліфорнія, США) на 30 секунд і витримуючи протягом 10 хвилин у ламінарному боксі при кімнатній температурі. Залишки гіпохлориту натрію видаляли чотирикратним промиванням зразків у 500 мл стерильної дистильованої води. Після цього кожную сторону листків опромінювали ультрафіолетовим світлом протягом 10 хвилин [209]. Ефективність дезінфекції поверхні підтверджували обережним притисканням обробленого листя шпинату до поверхні агару, чашки Петрі інкубувалися при 37 ° С протягом 48 годин. Дезінфекція поверхні вважалася ефективною, коли на інкубованих чашках не спостерігали росту бактерій.

### **2.2.4 Інокуляція молодого листя шпинату**

Зразки шпинату *Spinacia oleracea* по 5 г (приблизно шість листків) були інокульовані 20 краплями по 2,5 мкл (50 мкл для одного зразка) суспензії клітин *E. coli* O157:H7, для отримання початкової концентрації мікроорганізмів  $\sim 10^7$  КУО/г [210]. Перед обробкою зразки витримували в ламінарному боксі протягом 1 години при кімнатній температурі, щоб інокулят висихав. За потреби додавали упакований молодий шпинат, придбаний у місцевому продуктовому магазині (Kroger, Колумбус, Огайо, США) в день експерименту, щоб отримати необхідну кількість шпинату для обробки.

### **2.2.5 Інокуляція курячих яєць**

Яйця клали на бік, і в яєчній шкаралупі проколювали отвір за допомогою ін'єкційної голки калібру 22 (Becton Dickinson, Франклін Лейкс, Нью-Джерсі, США). В білок на глибину 4 мм від зовнішнього боку шкаралупи вносили 10 мкл

9,5-10 lg КУО/г клітинної суспензії *E. coli* K12, утворюючи вихідну концентрацію бактерій від 5,5 до 6 lg КУО/г. Після інокуляції отвори в оболонці герметизували шматком клейкої стрічки на основі політетрафторетилену (Cole-Parmer, Вернон-Гілс, Іллінойс, США) розміром приблизно 9 мм × 12,5 мм [211].

### **2.2.6 Порівняльні дослідження ефективності рідких дезінфікуючих засобів**

Були досліджені наступні дезінфікуючі засоби: а) 200 мг/л розчину гіпохлориту натрію (Clorox, Окленд, Каліфорнія, США); б) 200 мг/л розчину гіпохлориту натрію з 0,036 % додецилсульфату натрію (Sigma-Aldrich, Сент-Луїс, Міссурі, США); в) Pro-San L, комерційно приготовлений розчин, що містить 0,66 % лимонної кислоти, 0,036 % додецилсульфату натрію (Microcide, Inc., Детройт, Мічиган, США); та г) водний розчин 0,66 % леулінової кислоти (Sigma-Aldrich, Сент-Луїс, Міссурі, США) з додаванням 0,036 % додецилсульфату натрію. Ці рідкі дезінфікуючі засоби окремо наносили на інокульовану сторону листа молодого шпинату при кімнатній температурі за допомогою каліброваної пляшки з розпилювачем. Для цього листа шпинату поміщали у пластиковий лоток інокульованою стороною догори, а потім обприскували 32 рази (досягалося збільшення ваги зразка в середньому на 23 %, листки могли утримувати весь розпилений дезінфікуючий засіб без стікання крапель). Після нанесення дезінфікуючого засобу зразки у лотку накривали аркушем алюмінієвої фольги, щоб мінімізувати втрату води, і витримували протягом 30 хвилин з наступним мікробіологічним аналізом. Для контролю інокульовані зразки обприскували стерильною деіонізованою водою та стерильною деіонізованою водою з додаванням 0,036 % додецилсульфату натрію. Експерименти проводилися з використанням *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 і з дослідженням ефекту дезінфектантів на природну мікрофлору шпинату.

### **2.2.7 Порівняння способів застосування рідких дезінфектантів**

У подальших експериментах для порівняння різних методів застосування рідких дезінфікуючих засобів використовувався Pro-San L. Методи нанесення передбачали розпилення, занурення та «сухе» вакуумне просочення (описано нижче) при експозиції протягом 30 хвилин. Для обробки зануренням інокульований молодий шпинат занурювали в Pro-San L і витримували протягом 30 хвилин без перемішування. З метою контролю зразки інокульованого шпинату обприскували стерильною деіонізованою водою та занурювали в неї. Обробку сухим вакуумним просоченням проводили на пілотній установці (рис. 2.1), що складалася з резервуара з нержавіючої сталі об'ємом 0,3 м<sup>3</sup>, оснащеного конденсаційною котушкою (Walker stainless equipment company Inc., Нью-Лісабон, Вісконсин, США), зовнішнім охолоджувачем NESLAB RTE-10 (Thermo Electron Corporation, Ньюїнгтон, Нью-Йорк, США) та вакуумним насосом XDS35i (Edwards, Лутін, Чеська Республіка). Зразки інокульованого листя молодого шпинату поміщали в порожній контейнер і застосовували вакуум. Після досягнення цільового тиску (~800 Па) контейнер зі шпинатом заповнювали дезінфікуючим засобом при 4 °С через поліуретанову трубку, вакуум повільно скидали і зразок витримували протягом попередньо визначеного часу (30 хвилин). Обробку назвали «сухою», оскільки перед введенням дезінфікуючого засобу застосовувався вакуум. Цей метод відрізняється від часто описуваних процедур вакуумного просочування, коли зразок спочатку занурюють у розчин для просочування, а потім піддають вакуумній обробці.

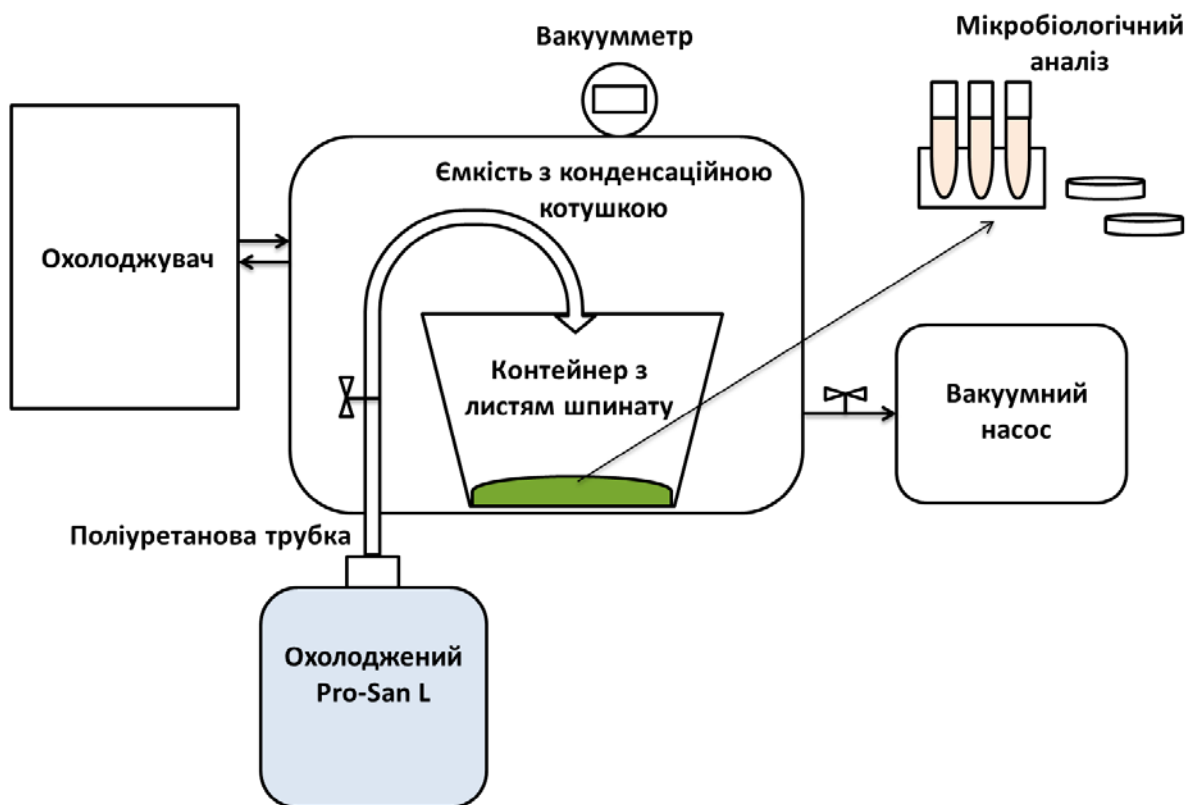


Рис. 2.1. Експериментальна установка для вакуумного просочування листків шпинату рідким дезінфікуючим засобом Pro-San L

### ***2.2.8 Вивчення довгострокового ефекту дезінфікуючого засобу Pro-San L***

Для тривалого експерименту використовували листя молодого шпинату, вирощеного на місці (див. 2.1.2). Pro-San L розпилювали 32 рази, оброблені зразки упаковували (Ziploc, SC Johnson, Расін, Вісконсин, США) і зберігали охолодженими при 4 °С протягом трьох днів. Проби для мікробіологічного аналізу відбирали щодня.

### ***2.2.9 Вакуумне охолодження та застосування газоподібного озону***

Усі експерименти, які включали обробку озonom, проводились в пілотному устаткуванні (рис. 2.2), яке дозволяє застосовувати газоподібний озон для зелених листових овочів під контрольованими тиском, температурою та подачею газоподібного озону. Це обладнання було встановлене у мікробіологічній лабораторії 2 рівня біобезпеки (кафедра харчових наук та технологій, Університет штату Огайо, Колумбус, штат Огайо). Основними компонентами пілотного

устаткування були спеціальна ємкість з нержавіючої сталі об'ємом 0,3 м<sup>3</sup>, оснащена конденсаційною котушкою (Walker stainless equipment company Inc., Нью-Лісабон, Вісконсин, США), зовнішнім охолоджувачем NESLAB RTE-10 (Thermo Electron Corporation, Ньюїнгтон, Нью-Йорк, США), генератором озону CSF-7 (Ozonіa, Елмвуд-Парк, Нью-Джерсі, США), підключеного до балону типу К із 99,6 % сухим киснем (відділ забезпечення Університету штату Огайо, Колумбус, Огайо, США), вакуумним насосом XDS35i (Edwards, Лутін, Чеська Республіка) та пристроєм для термічного руйнування озону (Ozonіa, Елмвуд-Парк, Нью-Джерсі, США).

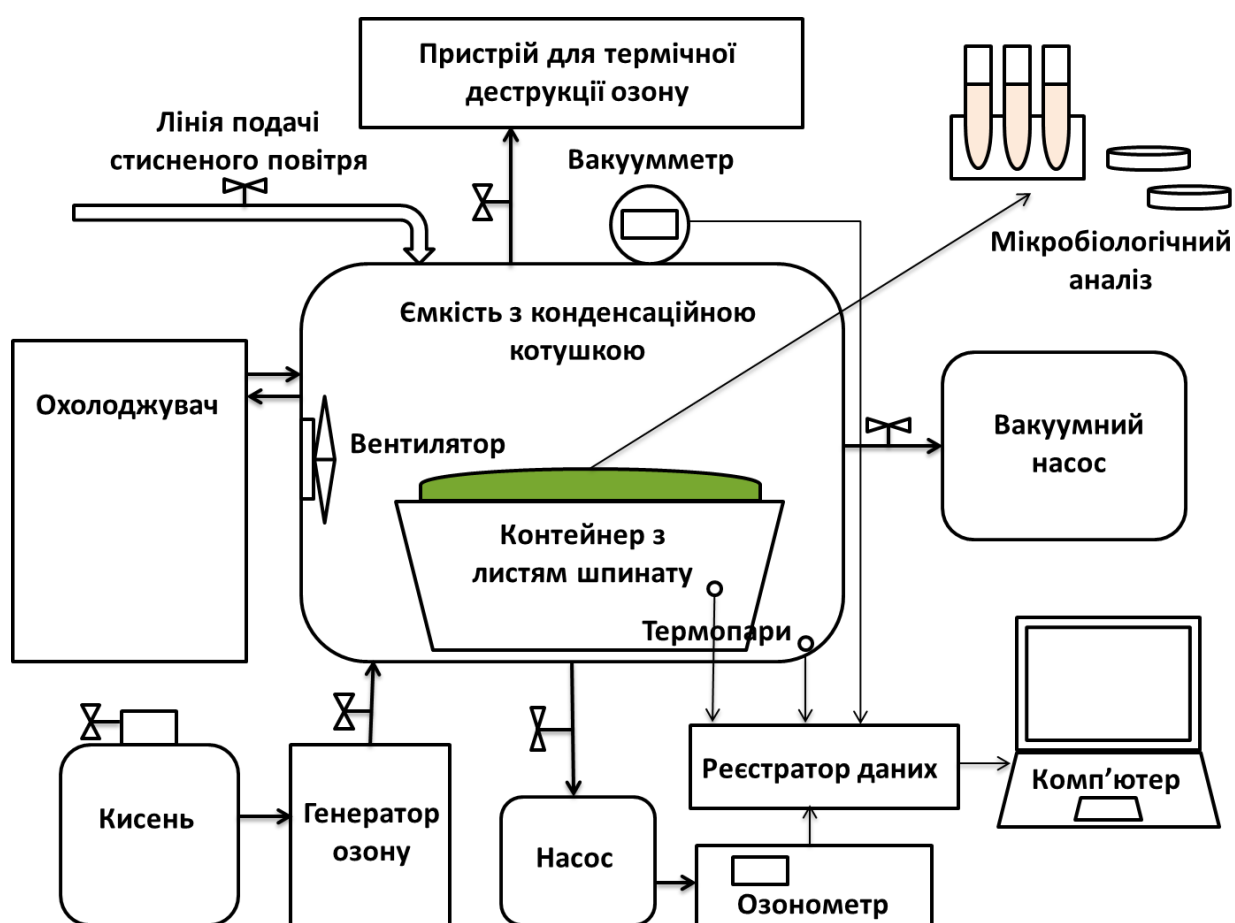


Рис. 2.2. Схема пілотного устаткування для вакуумного охолодження та обробки озонном.

Для моніторингу та записування температури, тиску та концентрації газоподібного озону під час експерименту була побудована інтегрована система збору даних на базі програмованого логічного контролера HE-XT102 (Horner APG,

Індіанаполіс, Індіана, США). Концентрацію озону вимірювали шляхом безперервного відбору проб газу з колектора в стінці ємкості та відкачування його насосом Dia-Vac R101-FP-CA1 (Air Dimensions Inc, Дірфілд Біч, Флорида, США) через вимірювач концентрації озону великої ємності Mini-Nicon (IN USA, Inc., Нідхем, Массачусетс, США). Тиск вимірювали за допомогою датчика моделі 912022 (Vacuum Research Corp., Пітсбург, Пенсільванія, США), встановленого в стінці ємкості. Кілька термопар типу Т (Omega, Стемфорд, Коннектикут, США) були введені всередину ємкості через прохідну панель для вимірювання температури листя шпинату і самої ємкості.

### ***2.2.10 Вплив різних протоколів застосування вакууму та тиску під час обробки листя шпинату газоподібним озоном***

Було вивчено ефективність інактивації *E. coli* O157:H7 після застосування озону за допомогою трьох різних протоколів: введення озону під вакуумом та утримання його при тиску нижчому за атмосферний: «Вакуум, O<sub>3</sub> (під вакуумом)»; введення озону під вакуумом з негайним підвищенням тиску у ємності до 69 кПа: «Вакуум, O<sub>3</sub> + 69 кПа»; та застосування озону при атмосферному тиску з наступним підвищенням тиску до 69 кПа: «O<sub>3</sub> (атм) + 69 кПа». У всіх випадках час впливу озону на листя шпинату був встановлений на 30 хв, а завантаження ємкості шпинатом становило 26 г/м<sup>3</sup>. Як контроль замість озону використовувався кисень: «Вакуум, O<sub>2</sub> + 69 кПа». Приклад обробки «Вакуум, O<sub>3</sub> + 69 кПа» описаний нижче.

До початку експерименту температуру ємкості знижували приблизно до 10 °С за рахунок циркуляції охолоджуючої рідини при - 5 °С через конденсаційну котушку. Потім у ємкість поміщали лоток із інокульованим шпинатом і створювали вакуум. Коли був досягнутий необхідний тиск (0,7 кПа), вакуумний насос зупиняли і в ємкість впускався озон (~ 10 г/м<sup>3</sup>) при швидкості 3,5 м<sup>3</sup>/год протягом 18 секунд, щоб отримати ~ 1,5 г/м<sup>3</sup> остаточної концентрації озону. Після застосування озону тиск в ємкості підвищували до 69 кПа шляхом введення повітря з лінії стисненого повітря. Такий тиск у ємкості утримували протягом 30 хв. Після завершення обробки залишок озону випускали з ємкості через установку для термічної

деструкції озону протягом 30 хв, ємкість відкривалася і зразки листя шпинату негайно забиралися для мікробіологічного аналізу.

### ***2.2.11 Вплив різної кількості листя шпинату під час вакуумного охолодження та озонування на розкладання газоподібного озону та інактивацію бактерій***

Реакція озону із поверхнею шпинату призводить до його швидкого розпаду. Це може спричинити те, що при великих завантаженнях продуктів у вакуумних охолоджувальних камерах озон може швидко руйнуватися ще до того, як він досягатиме запланованого ефекту. Для вивчення впливу кількості листя шпинату на розкладання озону було застосовано протокол обробки «Вакуум,  $O_3 + 69$  кПа» при  $1,5$  г/м<sup>3</sup> озону та різних рівнях завантаження ємкості шпинатом, починаючи з  $26600$  г/м<sup>3</sup> (максимально можливе завантаження, що відповідає  $7980$  г шпинату в ємкості)  $2600$  г/м<sup>3</sup> ( $775$  г шпинату у ємкості),  $260$  г/м<sup>3</sup> ( $78$  г шпинату у ємкості) та  $26$  г/м<sup>3</sup> ( $7,8$  г шпинату у ємкості). Інактивацію мікроорганізмів оцінювали шляхом інокуляції зразків масою  $\sim 5$  г, що відповідало шести листкам шпинату, які розміщали всередині поміж неінокульованого листя шпинату. Відразу після обробки, інокульовані зразки забиралися для мікробіологічного аналізу.

### ***2.2.12 Вплив застосування вакууму під час обробки листя шпинату на інтерналізацію мікроорганізмів у товщу листків***

Для цього дослідження інокульоване листя молодого шпинату обробляли лише вакуумним охолодженням (повернення тиску всередині установки до атмосферного відбувалося при  $\sim 4$  °C), частину зразків також додатково обробляли газоподібним озоном при  $1,5$  г/м<sup>3</sup> з підвищенням тиску до  $69$  кПа та витримкою протягом 30 хвилин. Потім проводилася обробка поверхні листя  $1,2$  % гіпохлоритом натрію (20 % відбілювач, Clorox Inc, Окленд, Каліфорнія, США) протягом 30 секунд. Після цього зразки промивали стерильною деіонізованою водою для видалення залишків гіпохлориту натрію та піддавали дії УФ-світла (260 нм) протягом 10 хвилин на кожну сторону. Дезінфекцію поверхні перевіряли,

обережно притискаючи оброблене листя молодого шпинату до поверхні агаризованого середовища LB, які пізніше інкубували при 37 ° С протягом 48 годин. Дезінфекцію поверхні вважали ефективною, коли на інкубованих чашках не спостерігалось бактеріального росту. В якості контролю загальну кількість бактерій, інокульованих на поверхні листків шпинату, оцінювали шляхом підрахунку КУО гомогенізованого листя молодого шпинату без попередньої обробки поверхні 1,2 % гіпохлоритом натрію та УФ-світлом.

### ***2.2.13 Вплив водної плівки на поверхні листя та вологи у камері на обробку газоподібним озоном***

Щоб запобігти втраті маси через випаровування води, продукція часто зрошується водою. Були проведені експерименти для вивчення впливу зрошення листків шпинату водою на ефективність використання озону проти *E. coli* O157:H7. Сухі та зрошені (обприскані водою з ручного побутового пульверизатора для отримання плівки води на поверхні) зразки інокульованого листя молодого шпинату (26 г/м<sup>3</sup>) розміщували у камері поруч та обробляли озоном за двома різними протоколами. В одному випадку зразки піддавали вакуумному охолодженню, а озон вводили у вакуумі з негайним створенням тиску у системі до 69 кПа «Вакуум, O<sub>3</sub> + 69 кПа», в іншому озон застосовувався при атмосферному тиску з подальшим тиском до 69 кПа «O<sub>3</sub> (атм) + 69 кПа». Відразу після обробки, інокульовані зразки забиралися для мікробіологічного аналізу.

### ***2.2.14 Вплив дозування газоподібного озону та тривалість його застосування під час імітованого транспортування шпинату***

Транспорт продукції з поля до місця її обробки та упаковки – це найбільше «вікно» у виробничому ланцюзі свіжих овочів та фруктів, яке може бути потенційно пристосоване для застосування газоподібного дезінфікуючого засобу. Було оцінено ефективність обробки із застосуванням низької концентрації озону протягом тривалого періоду часу (до трьох днів) окремо та як подальша обробка після озонування під час застосування вакуумного охолодження «Вакуум, O<sub>3</sub> + 69

кПа». Для цього дослідження використовувалося те саме пілотне устаткування, ємкість було максимально завантажено продуктом ( $26000 \text{ г/м}^3$ ). Озон пропускали через ємкість при  $2 \text{ л/хв}$ ,  $4^\circ \text{ C}$ , а концентрація озону входу підтримували при  $0,032$ ,  $0,106$ ,  $0,211$  та  $0,528 \text{ г/м}^3$ . Концентрацію озону контролювали за допомогою озономіра IN-2000 (діапазон  $0-2,1 \text{ г/м}^3$ , роздільна здатність  $0,02 \text{ мг/м}^3$ , IN USA, Inc. Норвуд, Массачусетс, США), а в середині ємкості для перевірки концентрації зразок газової суміші періодично відбирали за допомогою насосу Dia-Vac R101-FP-SA1 (Air Dimensions Inc., Дірфілд-Біч, Флорида, США). Два зразки інокульованих листків щодня забиралися для мікробіологічного моніторингу. Інокульовані листки молодого шпинату (контроль) зберігали в холодильнику (при  $4^\circ \text{ C}$ ) і аналізували одночасно зі зразками, обробленими озоном.

### ***2.2.15 Комбінована обробка рідким дезінфектантом та високою концентрацією газоподібного озону***

Порівняно три різні способи поєднання рідкого та газоподібного дезінфікуючого засобу: нанесення Pro-San L розпиленням після 30-хвилинної обробки озоном, введенням під вакуумом, з наступним негайним підвищенням тиску в пілотній установці до  $69 \text{ кПа}$  «Вакуум,  $\text{O}_3$  +  $69 \text{ кПа}$  + Pro-San L», розпилення Pro-San L з подальшою обробкою газоподібним озоном при атмосферному тиску з підвищенням тиску в ємності до  $69 \text{ кПа}$  «Pro-San L +  $\text{O}_3$  +  $69 \text{ кПа}$ » та початковим нанесенням Pro-San L розпиленням з подальшим вакуумним охолодженням та озонуванням під тиском  $68,9 \text{ кПа}$  «Pro-San L + Вакуум,  $\text{O}_3$  +  $69 \text{ кПа}$ ». Відразу після обробки, інокульовані зразки забиралися для мікробіологічного аналізу.

### ***2.2.16 Обробка води електролізом***

Обробку води електролізом проводили за допомогою комерційного портативного приладу з електродами з діамантовим покриттям (ShenZhen BoRun Electronics Co., LTD, Шеньчжень, провінція Гуандун, Китай). Заявлена виробником початкова концентрація озону становить  $0,8-1,3 \text{ мг/л}$  в залежності від тривалості озонування, рекомендований об'єм –  $500 \text{ мл}$ . Виробником встановлені два режими

електролітичної обробки води під напругою 5 V тривалістю 2 та 5 хвилин, які при потребі можна повторювати.

Для перевірки ефективності приладу проводили вимірювання концентрації озону як одного з продуктів електрохімічних перетворень при електролізі. У експериментах з вимірювання концентрації озону у динаміці були випробувані обидва режими електролітичної обробки, у експерименті з довготривалим збереженням води додатково проводили обробку протягом 10 хвилин шляхом повторенням другого режиму двічі. Перед кожним експериментом робочу частину приладу промивали у стерильній дистильованій воді. Дезінфікуючі розчини не використовували для уникнення впливу залишків дезінфектантів на поверхнях на результати. Під час обробки воду помішували для рівномірного її насичення продуктами електролізу.

### ***2.2.17 Застосування обробки води електролізом у «польових умовах» волонтерами на Півдні України для забезпечення потреб у питній воді***

Такі ж портативні прилади у кількості 20 одиниць використовувалися групами волонтерів у Херсонській області у червні-липні 2023 року в умовах операції порятунку жертв затоплення населених пунктів після підриву дамби Каховської ГЕС окупаційними військами. Воду постачали з артезіанських свердловин Бучакського водоносного горизонту. Обробка води відбувалася безпосередньо у ємкостях з водою (5 л ПЕТ-пляшки). Озонатори живили від портативних сонячних батарей чи портативних зовнішніх акумуляторів (напруга на виході 5 V, сила струму – 3 A). Дослідження було проведено відповідно до принципів, викладених у Всезагальній декларації з біоетики та прав людини ЮНЕСКО. Дизайн та методику дослідження схвалила комісія з біоетики Тернопільського національного медичного університету імені І. Горбачевського (протокол № 76 від 15 січня 2024 р.), а всі учасники надали інформовану згоду перед залученням до дослідження. Перед участю всі добровольці були проінформовані про характер і мету дослідження, а також про будь-які потенційні ризики. Були вжиті заходи для забезпечення безпеки та благополуччя учасників

протягом усього дослідження, включаючи відповідне навчання використанню портативних пристроїв для електролітичної обробки води. Крім того, було докладено зусиль для конфіденційності учасників та їх особистої інформації.

### **2.2.18 Вимірювання концентрації озону у водному розчині**

Концентрацію озону у воді вимірювали фотометричним способом за допомогою фотометра PoolLab 1.0 (Water-i.d., Еггенштайн, Німеччина) за інтенсивністю зміни кольору у реакції з N,N-діетил-п-фенілендіаміну сульфатом [212]. Концентрація озону визначалася за поглинанням зразком кольорового світла (довжина хвилі 530 та 620 нм) порівняно з необробленим зразком, використовуючи калібрувальні дані, запрограмовані в приладі. Застосований у цьому дослідженні фотометр має діапазон вимірювання озону 0-4 мг/л і використовує три довжини хвилі (530/570/620 нм) для вимірювання концентрації озону та інших речовин у воді. Використовувалися таблетовані реактиви, час вимірювання концентрації озону одного зразка становив ~3 хвилини. Вимірювання у зразках води проводили відразу після обробки та кожні 20 хвилин протягом 1 години після нього. Вимірювання повторювали кожну наступну добу до досягнення значення 0 мг/л.

Для оцінки розкладання озону в присутності бактерій 9 мл свіжообробленої води змішували з 1 мл суспензії *S. aureus* ATCC 6538 (~8 lg КУО/мл). Після змішування зразки центрифугували при 3000 об/хв протягом 3 хвилин, щоб відокремити бактеріальні клітини, і вимірювали концентрацію озону в отриманому супернатанті. Ідентичні вимірювання проводили паралельно, додаючи до електролітично-обробленої води стерильну дистильовану воду замість бактеріальної суспензії в якості контролю. В обох випадках вимірювання проводили кожні 5 хвилин протягом перших 30 хвилин, а потім з 10-хвилинними інтервалами протягом наступних 30 хвилин.

Фактичний час між відбиранням зразка та отримання результату вимірювання становив ~6 хвилин, умовно приймався за 0 хвилин для відображення на графіках.

### **2.2.19 Вимірювання мінералізації води**

Мінералізацію зразків води вимірювали кондуктометром HI98301 (Hanna Instruments, Смітфілд, Род-Айленд, США). Для цього електроди промивали дистильованою водою при кімнатній температурі ( $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ) після чого занурювали у досліджуваний зразок води [213].

### **2.2.20 Аналіз зміни кольору**

Зразки фотографували камерами Sony NEX 5n (Sony Electronics, Inc., Сан Дієго, Каліфорнія, США) з об'єктивом Sony 18-55 мм f/3.5-5.6 (листя шпинату) та Nikon D3200 (Nikon Corporation, Токіо, Японія) з об'єктивом Nikon DX 18-55 мм 1:3.5-5.6 (зразки води у довготерміновому експерименті). Процес фотографування відбувався в приміщенні при наявному штучному освітленні (дугова ртутна газорозрядна люмінесцентна лампа). Точна передача кольору досягалася шляхом калібрування до палітри X-Rite ColorChecker Passport за допомогою програмного забезпечення ColorChecker Passport (X-Rite Inc., Гранд-Рапідс, Мічиган, США). Зміни кольору зразків аналізували на вибраному квадраті  $10 \times 10$  пікселів за допомогою безкоштовного онлайн-програмного забезпечення Image Color Extract ([http://www.coolphptools.com/color\\_extract](http://www.coolphptools.com/color_extract)), а отримані значення домінуючого кольору виражали в системі задання кольорів Lab. Де параметр «L\*» позначає світлосилу, «a\*» і «b\*» – колір, причому «a\*» вказує на співвідношення зеленої і червоної складової кольору [(-) – зелений, (+) – червоний], а «b\*» – співвідношення синьої та жовтої складової [(-) – синій, (+) – жовтий] [214].

### **2.2.21 Обробка високим гідростатичним тиском**

Для обробки бактеріальної суспензії *Listeria innocua* використовували систему гідростатичного тиску (Harwood Engineering, Уолпол, Массачусетс, США), розраховану на досягнення тиску до 1034 МПа. Рідина, що передає тиск, складалася з пропіленгліколю та дистильованої води (1:1). Циліндрична ємність для створення тиску мала внутрішні розміри діаметром 25 мм і глибиною 127 мм. Кришка була обладнана двома мідними проводами для створення електричного

поля та однією парою проводів термопар типу К для вимірювання температури всередині ємності. Температуру зразка контролювали за допомогою рециркуляції пропіленгліколю через кожух ємності для тиску. Обробку ВГТ застосовували при 200 і 400 МПа. У експериментах з вимірюванням провідності під час обробки ВГТ обробку проводили при 300, 400 і 500 МПа протягом 0 та 60 хвилин.

Для експериментів із спорами *Bacillus subtilis* у поліетиленові пакети вносили 3 мл суспензії спор, пакети запаювали без залишання бульбашок повітря. Для моніторингу температури до одного з пакетів прикріплювали термопару типу К після чого 2 пакети поміщали для обробки у камеру високого тиску (рис. 2.3). Температуру зразків регулювали пропускаючи крізь кожух камери високого тиску пропіленгліколь відповідної температури. Обробку проводили при 200 та 500 МПа, 40 та 60 ° С, одним циклом 10 хвилин чи 3 циклами по 3 хвилини кожен.

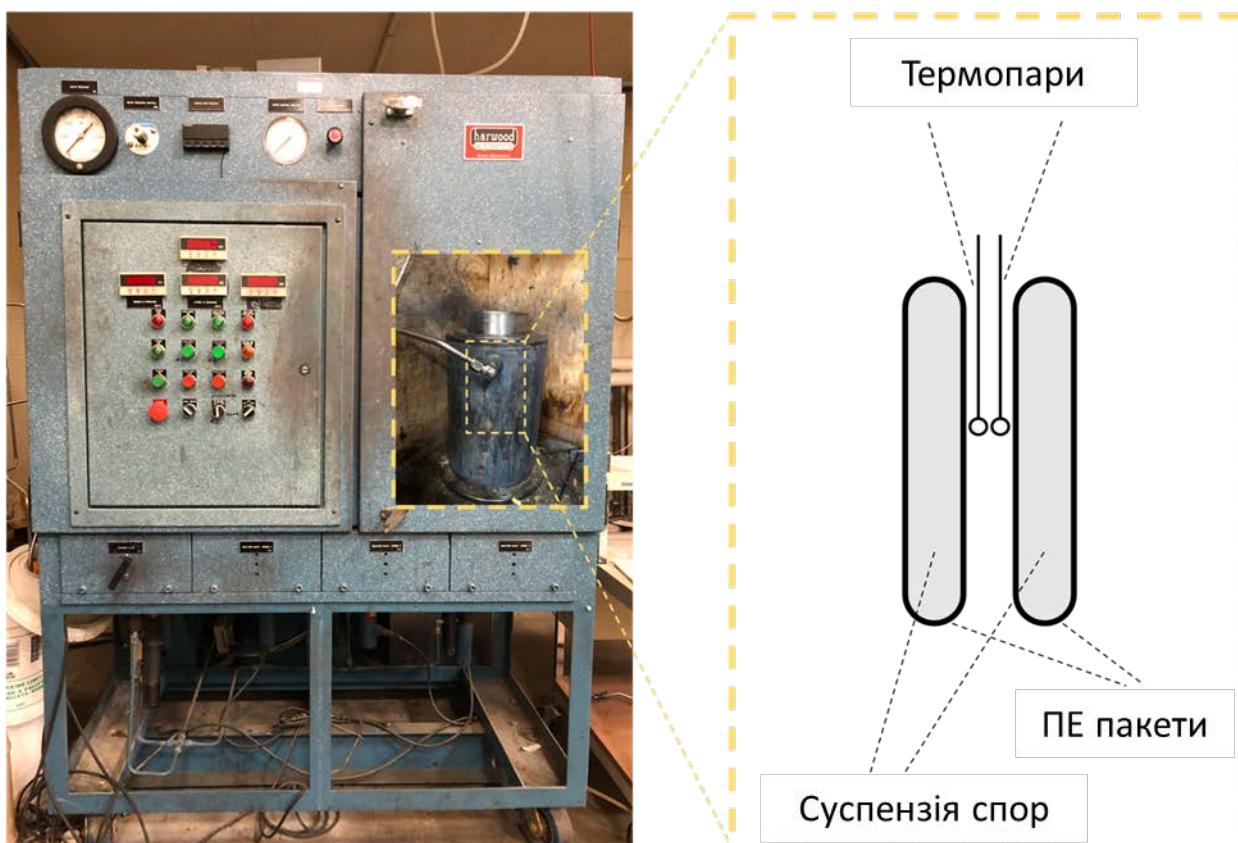


Рис. 2.3. Установка для обробки високим гідростатичним тиском та схема обробки зразків.

### 2.2.22 Вимірювання електропровідності у суспензії під час обробки ВГТ

Суспензію бактерій штаму *Listeria innocua* ATCC 33090 ( $\sim 10^{10}$  КУО/мл) герметично запаювали без бульбашок повітря у обробну камеру, що складалася з керамічної трубки, на якій були встановлені два платинованих титанових електроди  $5 \times 8$  мм (рис. 2.4), та з гнучкого поліетиленового мішечка, який забезпечував передачу тиску до зразка. Кришка обробної камери була обладнана двома прохідними отворами з мідним провідником, щоб забезпечити можливість застосування електричного поля для вимірювання електропровідності.

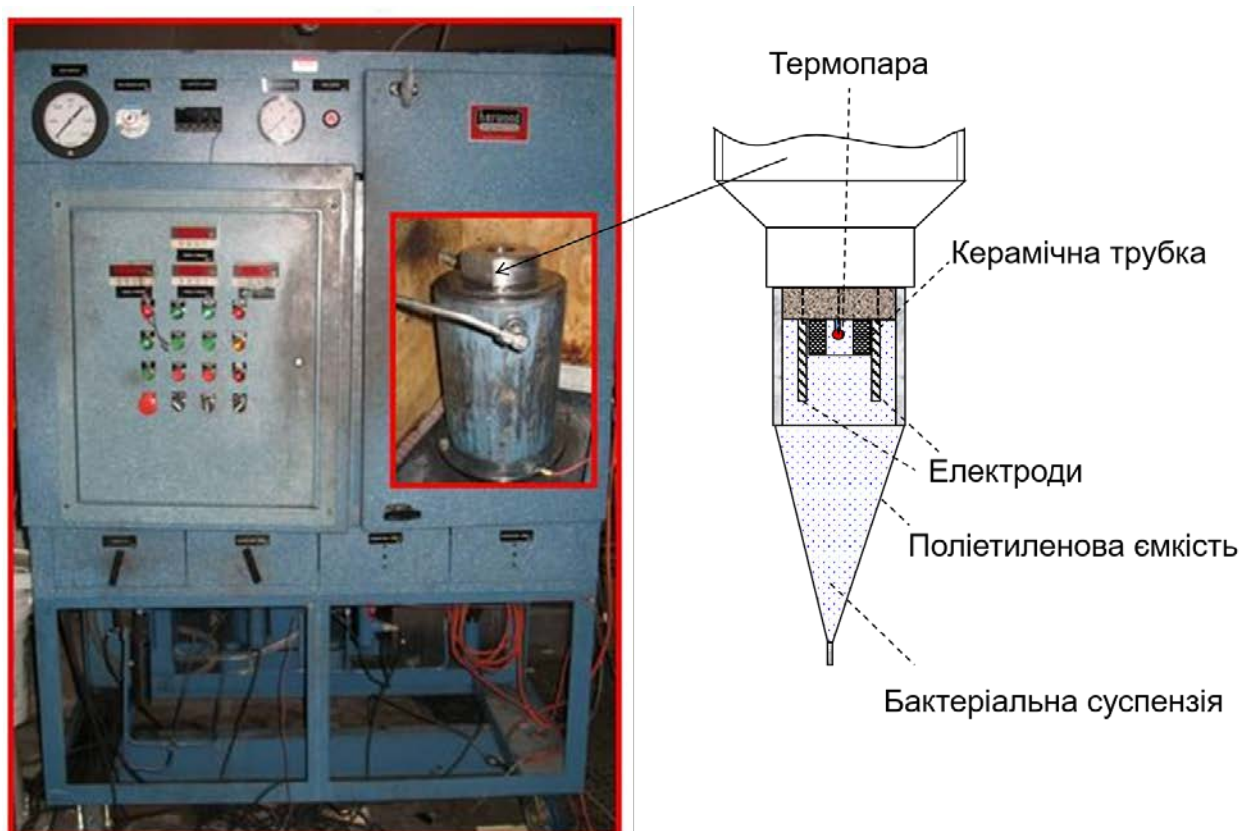


Рис. 2.4. Установа для обробки високим гідростатичним тиском та схема пристрою для вимірювання провідності.

### 2.2.23 Обробка помірним електричним полем суспензії спор

Інактивацію спор *B. subtilis* за допомогою помірного електричного поля (ПЕП) проводили у спеціально виготовленій скляній камері для обробки (довжина 1,0 см, зовнішній діаметр 1,1 см і внутрішній діаметр 0,9 см) з двома електродами діаметром 0,9 см. Електричне поле мало безперервну форму хвилі з напруженістю та частотою 300 В/см та 60,0 Гц відповідно. Струм подавався омичним

нагрівальним генератором потужністю 20 кВт (модель 1x642GB120, Semikron GmbH, Нюрнберг, Німеччина), а бажана форма сигналу генерувалася функціональним генератором (модель AFG3252, Tektronix, Inc., Бівертон, Орегон, США), запускаючи перемикач біполярного транзистора з ізольованим затвором (IGBT) у генераторі для розрядки конденсатора. Для кожної обробки камеру промивали 70 % етанолом і промивали стерильною дистильованою водою, а зміну температури під час обробки ПЕП вимірювали за допомогою термопари типу T (Omega Engineering Inc., Стемфорд, Коннектикут, США), розміщений у центрі об'єму зразка та підключений до блоку збору даних (Agilent, 34970A, США), що працює з HP BenchLink Data Logger. Під час обробки температура зразка підтримувалася на рівні нижче 30 °C, 55 °C, 65 °C і 75 °C шляхом занурення в охолоджену водяну баню з використанням мінеральної олії як охолоджувача.

#### ***2.2.24 Обробка помірним електричним полем інокульованих курячих яєць***

Використовували систему для одночасної звичайної термічної обробки та обробки ПЕП. Для традиційної термічної обробки використовували велику водяну баню ємністю 19,3 л. Для обробки ПЕП використовували спеціально виготовлену проточну камеру з водозливом. Електроди розміром 8,9 × 9,3 см були розміщені паралельно потоку рідини на відстані 7,6 см один від одного. У цю камеру між електродами поміщали чотири великі яйця. Подачу рідини здійснювали з більшої водяної бані об'ємом 19,3 л. Використовували водопровідну воду з електропровідністю приблизно 0,049 См/м, температуру підтримували на рівні приблизно 55,5 °C. Рідину перекачували з більшої ванни в меншу за допомогою перистальтичного насоса (Cole-Parmer, Вернон-Гіллс, Іллінойс, США) зі швидкістю потоку 11,7 мл/хв. Після входу в камеру ПЕП вода заповнювала порожнину до досягнення висоти водозливу, а потім під дією сили тяжіння поверталася до більшої водяної бані. Електричний струм подавали на електроди при напрузі 120 В за допомогою трансформатора моделі 7-2-53011-S (Acme Transformer, Ламбертон, Північна Кароліна, США), який подавав напругу від Powerstat типу 3PN116B (The Superior Electric Co. Брістоль, Коннектикут, США),

створюючи електричне поле 15,7 В/см і приблизно 0,5 А струму. Яйця обробляли протягом 28 хвилин, а дані записували з інтервалом в 1 хвилину. Обробку ПЕП проводили одночасно зі звичайною термічною обробкою у водяній бані (контроль).

### ***2.2.25 Обробка імпульсним електричним полем***

Обробку імпульсним електричним полем проводили за допомогою генератора OSU-4A, 10 кВ, 100 А (Університет штату Огайо, Колумбус, Огайо, США), який забезпечує біполярні прямокутні імпульси. Ефект імпульсного електричного поля (ІЕП) вивчався в діапазоні 10-30 кВ/см, використовуючи серію з двох біполярних прямокутних імпульсів тривалістю 10 мкс кожен. Для охолодження зразків до початкової температури після кожної серії обробки (підвищення температури до 5 °С) були паузи між імпульсами тривалістю 0,1-10 с.

Були розроблені дві різні камери для обробки ІЕП, одна для використання в умовах ВГТ, а друга для обробки при атмосферному тиску. Обидві були оснащені платинованими титановими електродами діаметром 8 мм. Зазор між електродами змінювався в межах 3-10 мм залежно від бажаної напруженості електричного поля. Температуру зразків вимірювали за допомогою термопари типу К та блоку збору даних Agilent 34970A (Agilent Technologies Inc., Пало-Альто, Каліфорнія, США). Прикладена напруга та струм контролювались на чотириканальному осцилографі Tektronix MSO4034 (Tektronix Inc., Бівертон, Орегон, США).

### ***2.2.26 Обробка бактеріальних суспензій ультразвуком***

Обробку ультразвуком (УЗ) проводили за допомогою ультразвукового процесора Q500 потужністю 500 Вт (Qsonica, Ньютаун, Коннектикут, США). У всіх експериментах використовували 0,5-дюймовий наконечник. Як камеру для обробки використовували пластикову пробірку довжиною 100 мм і діаметром 11 мм. Для вимірювання температури в пробірку була введена термopара типу К. Перед обробкою в пробірку вносили 7 мл зразка, після чого її поміщали в крижану воду для охолодження. Коли температура досягла 5 °С, зонд занурювали у суспензію, і обробку ультразвуком проводили при частоті 20 КГц зі 100 %

амплітудою. Ультразвук застосовували в імпульсному режимі, щоб підтримувати температуру зразка нижче 35 °С. Цикли ввімкнення та вимкнення встановлювались на 1 с та 10 с відповідно.

Після обробки зразки переносилися в стерильні флакони і які зберігалися при температурі 4 °С до мікробіологічного дослідження. Кожен експеримент проводився щонайменше тричі.

### **2.2.27 Комбінована обробка ВГТ, ІЕП та УЗ**

Проводилося оцінювання інактивації *Listeria innocua* за допомогою ВГТ, ІЕП та УЗ, а також їх комбінації. Щоб визначити, чи мають комбінації синергетичні ефекти, кожну окрему обробку коригували так, щоб при застосуванні вона приводила до зменшення бактеріальної концентрації на порядок (знешкодження 1 логарифму КУО мікроорганізмів). Вважалося, що синергізм має місце, коли загальна інактивація після двох різних обробок перевищувала два логарифми КУО. Були використані такі обробки: ультразвукова обробка з подальшим використанням ВГТ (УЗ→ВГТ); ВГТ з подальшою дією ультразвуку (ВГТ→УЗ), ІЕП з подальшим застосуванням ВГТ (ІЕП→ВГТ); ВГТ з подальшим використанням ІЕП (ВГТ→ІЕП); одночасна обробка ІЕП та ВГТ (ІЕП+ВГТ). Оскільки кожна послідовна обробка вимагала різного обладнання, перенесення зразка з однієї обробної камери в іншу проводилося протягом 5-10 хв. У разі одночасного застосування ІЕП та ВГТ, необхідно було призупиняти застосування ІЕП на 20 с після кожної пари біполярних імпульсів, щоб зразок охолодився до початкової температури (максимальне підвищення температури 5 °С). Кожен експеримент проводився щонайменше тричі.

### **2.2.28 Виявлення білків аналізом з біцинхоніною кислотою**

Аналіз білка з біцинхоніною кислотою був використаний для визначення загальної концентрації білка в розчині інтактною та обробленою суспензії *Listeria innocua*. Зразки центрифугували при 13322 × g протягом 10 хв (Biofuge А, модель 1217, Heraeus Sepatech GmbH, Німеччина), а супернатанти піддавали аналізу.

Розчини реагували з робочим реагентом BCA (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Рокфорд, Іллінойс, США) із використанням стандартного протоколу (Walker, 1994). Зміну кольору зразків визначали за допомогою спектрофотометра (Thermo Spectronic Genesys 5, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) при 562 нм [215].

### ***2.2.29 Оцінка цілісності цитоплазматичної мембрани за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії***

Для оцінки пошкоджень цитоплазматичної мембрани використовували фарбування барвниками SYTO 9 та йодид пропідію з наступною оцінкою забарвлення оброблених та необроблених спор. SYTO 9 проникає через мембрану, незалежно від того, організм життєздатний чи ні. Для порівняння, йодид пропідію не проникає через інтактні мембрани і тому може використовуватися як індикатор пошкодження внутрішньої мембрани при інактивації спор. Оброблені та необроблені зразки спор фарбували флуоресцентними барвниками 15 мкМ йодиду пропідію (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) і 0,5 мкМ SYTO 9 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) протягом 15 хвилин, а потім фотографували під конфокальним лазерним скануючим мікроскопом CLSM Olympus VX61 (Olympus, Хатіодзі, Токіо, Японія). Для збудження використовувався лазер при 488 нм, а випромінювання спостерігалось при 528 нм для SYTO 9 і 645 нм для йодиду пропідію. Для отримання зображень та аналізу інтенсивності сигналу використовували програмне забезпечення Olympus DP Control (Olympus, Хатіодзі, Токіо, Японія) [216].

### ***2.2.30 Підрахунок кількості мікроорганізмів***

Для підрахунку мікроорганізмів на/в листі шпинату оброблені та необроблені (контрольні) зразки (~ 5 г) поміщали в поліетиленові гомогенізаційні пакети і додавали 45 мл пептонної води. Вміст пакетів гомогенізували протягом 2 хв у гомогенізаторі STO-400 (Tekmar Inc., Цинциннаті, Огайо, США). Вміст гомогенізаційних пакетів серійно розводили у пептонній воді, аліквоти об'ємом 0,1

мл інокулювали на MacConkey агар (Difco, Becton-Dickinson, Спаркс, Меріленд, США). Неінокульовані зразки засівали на ТСА (Difco, Becton-Dickinson, Спаркс, Меріленд, США) для визначення загального мікробного числа. Засіяні чашки Петрі інкубували при 37 ° С протягом 24 годин.

Для підрахунку мікроорганізмів у курячих яйцях останні розбивали та їх вміст поміщали у поліетиленові гомогенізаційні пакети і гомогенізували протягом 2 хв у гомогенізаторі STO-400 (Tekmar Inc., Цинциннаті, Огайо, США). Отриману рідину серійно розводили у пептонній воді і аліквоти об'ємом 0,1 мл засівали на поверхню чашок з MacConkey агар та Plate count agar (Difco, Becton-Dickinson, Спаркс, Меріленд, США).

Зразки суспензій *L. innocua* послідовно розводили і висівали на два середовища: неселективне середовище ТСАДЕ (триптичний соєвий агар з додаванням 0,6 % дріжджового екстракту) (Difco, Becton Dickinson, Спаркс, Меріленд, США) та селективне середовище ТСАДЕ з додаванням 5 % NaCl. Чашки Петрі інкубували протягом 48 год при 35 ° С.

Підрахунок кількості спор у оброблених та необроблених зразках проводили інокуляцією на живильний агар Nutrient agar (Difco, Becton Dickinson, Спаркс, Меріленд, США) та інкубацією при 37 ° С протягом 48 годин з подальшим підрахунком колоній. Щоб визначити вплив ПЕП та/або помірною нагрівання на спори *B. subtilis*, кількість інтактних спор визначали методом підрахунку колоній на чашках до та після обробки. Для визначення кількості пророслих спор, зразки піддавали термічній обробці (80 °С протягом 30 хв), інокулювали на живильний агар і після інкубації порівнювали зі зразками, які не піддавалися термічній обробці. Кількість пророслих спор визначали як різницю у кількості колоній за термічної обробки та без неї.

Для підрахунку кількості мікроорганізмів у воді зразки обробленої на необробленої (контроль) води серійно розводили у стерильному фізрозчині, після чого аліквоти змішували з розтопленим та охолодженим до 50 °С поживним агаром (ТОВ Санімед-М, Харків, Україна). Для цього по 1 мл розведень та нерозведених зразків вносили у стерильні чашки Петрі (Sarstedt, Inc., Нюмбрехт, Німеччина),

додавали 10-12 мл розтопленого у водяній бані BiosanWB-4MS (BioSan SIA, Рига, Латвія) поживного агару та змішували їх похитуванням чашок. Після застигання агару чашки інкубували при 30 °С протягом 72 год з наступним підрахунком колонієутворюючих одиниць (КУО).

### ***2.2.31 Спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища***

Для інокуляції суспензії мікроорганізмів використовували скляні кульки діаметром ~ 3,7 мм. Кульки у кількості 20 шт. насипалися у пробірки перед стерилізацією автоклавуванням. Проводили серійні розведення суспензій із інокуляцією аліквот об'ємом 100 мкл на відповідні щільні середовища у пластикових чашках Петрі. Після цього стерильні кульки висипали у чашки Петрі, чашки закривали кришками і легенько струшували з боку в бік, обертаючи при цьому, для рівномірного розповсюдження інокуляту по поверхні агару (рис. 2.5). Після цього кульки переміщували у контейнер із дезінфікуючим розчином для повторного використання.

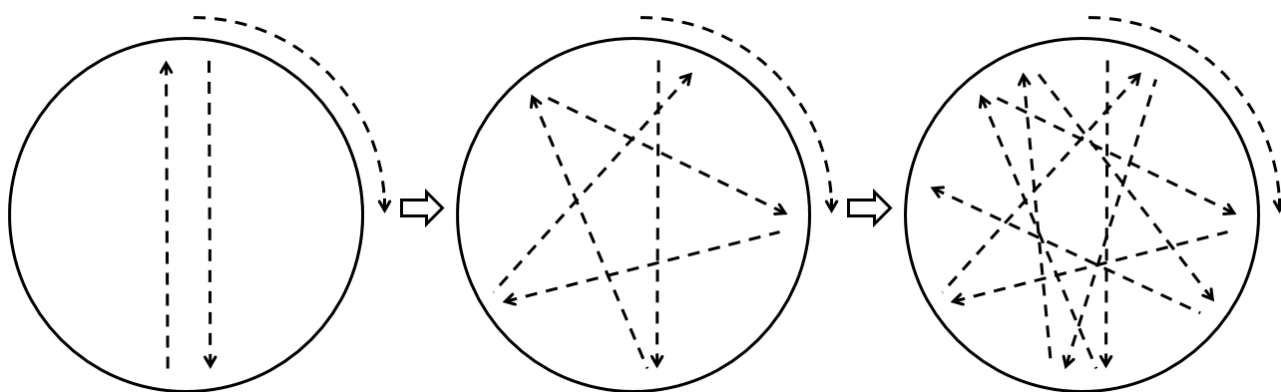


Рис. 2.5. Схема рухів при похитування чашки Петрі із щільним живильним середовищем для рівномірного інокулювання.

### ***2.2.32 Підрахунок сублетально пошкоджених бактерій***

Оброблені зразки послідовно розводили і висівали на неселективні та селективні середовища. Як неселективні використовувалися триптичний соєвий

агар з 0,6 % дріжджового екстракту (ТСАДЕ) (Difco, Becton Dickinson, Спаркс, Меріленд, США) та кров'яний агар (ТОВ «Санімед-М», Харків, Україна) Селективними були середовище ТСАДЕ з додаванням 5 % NaCl, жовтково-сольовий агар (ТОВ «Санімед-М», Харків, Україна) та агар MacConkey (bioMérieux, Марсі-л'Етуаль, Франція). Субетальне пошкодження бактерійних клітин оцінювалося за різницею між показниками на двох середовищах [217]. Чашки Петрі інкубували протягом 48 год при 35-37 ° С. Відсоток пошкодження розраховували, використовуючи наступне рівняння:

$$\% \text{ Пошкоджених клітин} = \frac{(\text{КУО}_{\text{неселективне}} - \text{КУО}_{\text{селективне}})}{\text{КУО}_{\text{неселективне}}} \times 100$$

### ***2.2.33 Забір клінічного матеріалу***

Клінічний матеріал відбирали від поранених військових, пацієнтів Шведсько-українського медичного центру «Angelholm», м. Чернівці, Україна (n = 27) та Тернопільської обласної клінічної лікарні, м. Тернопіль, Україна (n = 284). Зразки виділень з ран та ушкоджень збирали на стерильні ватні тампони та доставляли у пробірках із транспортним середовищем Amies (Jiangsu Huida Medical Instruments Co., Ltd, Яньчен, Китай) до лабораторії. Після доставки зразки висівали на чашки з кров'яним агаром, жовтково-сольовим агаром (ТОВ «Санімед-М», Харків, Україна) та агаром MacConkey (bioMérieux, Марсі-л'Етуаль, Франція) з подальшою інкубацією при 37 °С протягом 24-48 годин.

### ***2.2.34 Ідентифікація клінічних штамів***

Первинна ідентифікація бактерій базувалася на їх культуральних та морфологічних властивостях. Грамнегативні палички ідентифікували шляхом проведення серії тестів: ферментація на агарі Клігера та цитратному агарі (ТОВ «Фармактив», Київ, Україна), продукування індолу, каталази та тест на рухливість. Грампозитивні коки були ідентифіковані за результатами тестів на каталазу, лецитиназу та коагулазу (ТОВ «Біолік Фарма», Харків, Україна). Остаточну

ідентифікацію частини штамів проводили на автоматичному аналізаторі Vitek-2 Compact (bioMérieux, Марсі-л'Етуаль, Франція).

### ***2.2.35 Визначення антибіотикочутливості виділених штамів***

Чутливість виділених штамів до антибіотиків визначали на автоматичному аналізаторі Vitek-2 Compact (bioMérieux, Марсі-л'Етуаль, Франція) та за допомогою методу дискової дифузії Кірбі-Бауера. Для останнього інокуляти готували з виділених чистих культур і розводили у стерильному ізотонічному фізіологічному розчині (0,9 % NaCl). Щільність суспензій доводили до 0,5 одиниць за Мак-Фарландом за допомогою денситометра Biosan DEN-1 (BioSan SIA, Рига, Латвія). Потім ці суспензії рівномірно пересівали на агар Мюллера-Хінтона (ТОВ «Фармактив», Київ, Україна). На поверхню агару поміщали паперові диски, просочені антибіотиком (ТОВ «Фармактив», Київ, Україна), з подальшою інкубацією при 37 °С протягом 24 годин, щоб забезпечити дифузію антибіотика та оцінити ріст бактерій. Діаметри зон пригнічення навколо дисків вимірювали з точністю до міліметра за допомогою лінійки. Згодом їх класифікували як чутливі, помірнорезистентні або резистентні на основі таблиць рекомендацій від CLSI 2020 [218]. Антибактеріальними препаратами, що використовувалися в тесті як для грамнегативних, так і для грампозитивних штамів бактерій, були ципрофлоксацин (5 мкг), нітрофурантоїн (100 мкг) і левофлоксацин (5 мкг). Грамнегативні палички тестували на чутливість до піперациліну/тазобактаму (100/10 мкг), цефтазидиму (30 мкг), цефепіму (30 мкг), гентаміцину (10 мкг), амікацину (30 мкг), іміпенему (10 мкг) та меропенему (10 мкг). Для грампозитивних бактеріальних ізолятів використовували оксацилін (1 мкг), ванкомицин (30 мкг) та лінезолід (30 мкг).

### ***2.2.36 Методи статистичної обробки отриманих результатів***

Всі лабораторні експерименти проводили щонайменше тричі. Кількість КУО виражали в логарифмічних значеннях (десятковий логарифм lg). При розрахунку середніх величин в якості похибки використовували середнє квадратичне відхилення ( $M \pm sd$ ). Для перевірки вибірки на нормальність розподілу

використовували тест Шапіро-Вілка. Перевірку рівності середніх значень у двох вибірках проводили із використанням t-критерію Стюдента. Порівняння між кількома групами проводили за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA), використовуючи програмне забезпечення Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Талса, Оклахома, США). Після цього був проведений пост-хок-аналіз Тьюкі для аналізу відмінності середніх значень. Відмінності при  $p < 0,05$  вважалися значущими.

Результати власних досліджень, що увійшли до розділу, висвітлені у наукових публікаціях автора [219,220], на спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища отримано патент на корисну модель [221].

Оригінал статті доступний за посиланням:

<https://journals.uran.ua/ami/article/view/277005>

Патент доступний за посиланням:

<https://sis.nipo.gov.ua/en/search/detail/1790200/>

## РОЗДІЛ 3

### Інактивація *Escherichia coli* O157:H7 рідкими дезінфектантами

Патогенний штам ентерогеморагічної кишкової палички (ЕГКП), *Escherichia coli* O157:H7, становить значну загрозу для здоров'я населення через його здатність спричиняти важкі аліментарні захворювання [222]. Інфекції *E. coli* O157:H7 можуть призвести до ряду симптомів, від легкого гастроентериту до більш серйозних захворювань, таких як геморагічний коліт і гемолітико-уремічний синдром (ГУС) [128]. ГУС у свою чергу може призвести до ниркової недостатності, особливо у маленьких дітей, людей похилого віку та осіб з ослабленим імунітетом [1]. Контаміновану свіжу зелень, таку як молоде листя шпинату *Spinacia oleracea*, було визначено як звичний засіб передачі *E. coli* O157:H7, що підкреслює нагальну потребу в ефективних стратегіях знешкодження збудників для підвищення безпеки споживачів [223].

Використання рідких дезінфікуючих засобів є поширеним методом зменшення мікробної популяції на свіжих продуктах [110]. Різні дезінфікуючі засоби, включаючи розчини на основі хлору та органічних кислот, були оцінені на предмет їх ефективності в інактивації *E. coli* O157:H7 на молодому листі шпинату. На ефективність цих дезінфікуючих засобів можуть впливати такі фактори, як їх об'єм, час контакту та спосіб застосування. Розуміння оптимальних умов для застосування дезінфікуючого засобу має вирішальне значення для максимальної інактивації мікроорганізмів при збереженні якості та безпеки продукції.

#### **Порівняльні дослідження дезінфікуючих засобів**

Зміни у кількості *E. coli* O157:H7 нанесеної на листки після застосування вибраних дезінфектантів розпиленням (32 розпилення, 30 хв) показані на рисунку 3.1. Початкова концентрація *E. coli* O157:H7 становила  $(7,2 \pm 0,2)$  lg КУО/г і  $(7,0 \pm 0,3)$  lg КУО/г для необроблених і необроблених та підсушених протягом 1 години зразків відповідно. Концентрація мікроорганізмів на зразках, оброблених розпиленням стерильною деіонізованою водою та стерильною деіонізованою водою з додаванням 0,036 % SDS, становила  $(6,9 \pm 0,2)$  lg КУО/г та  $(6,6 \pm 0,2)$  lg

КУО/г відповідно ( $p > 0,05$ ). Використані в експерименті дезінфектанти були ефективними щодо зменшення популяції *E. coli* на листках приблизно на 2 lg порівняно з необробленими зразками із підсушеним інокулятом. Розчин гіпохлориту натрію (200 мг/л) інактивував 2,3 lg КУО/г *E. coli* O157:H7. Додавання поверхнево-активної речовини (0,034 % SDS) інактивувало 2,5 lg КУО/г. Pro-San L і 0,66 % розчин левулінової кислоти з 0,036 % SDS зменшили концентрацію *E. coli* O157:H7 на 2,8 і 2,3 lg КУО/г відповідно. Статистично достовірної різниці між результатами після застосування усіх досліджуваних дезінфікуючих засобів методом розпилення не було ( $p > 0,05$ ).

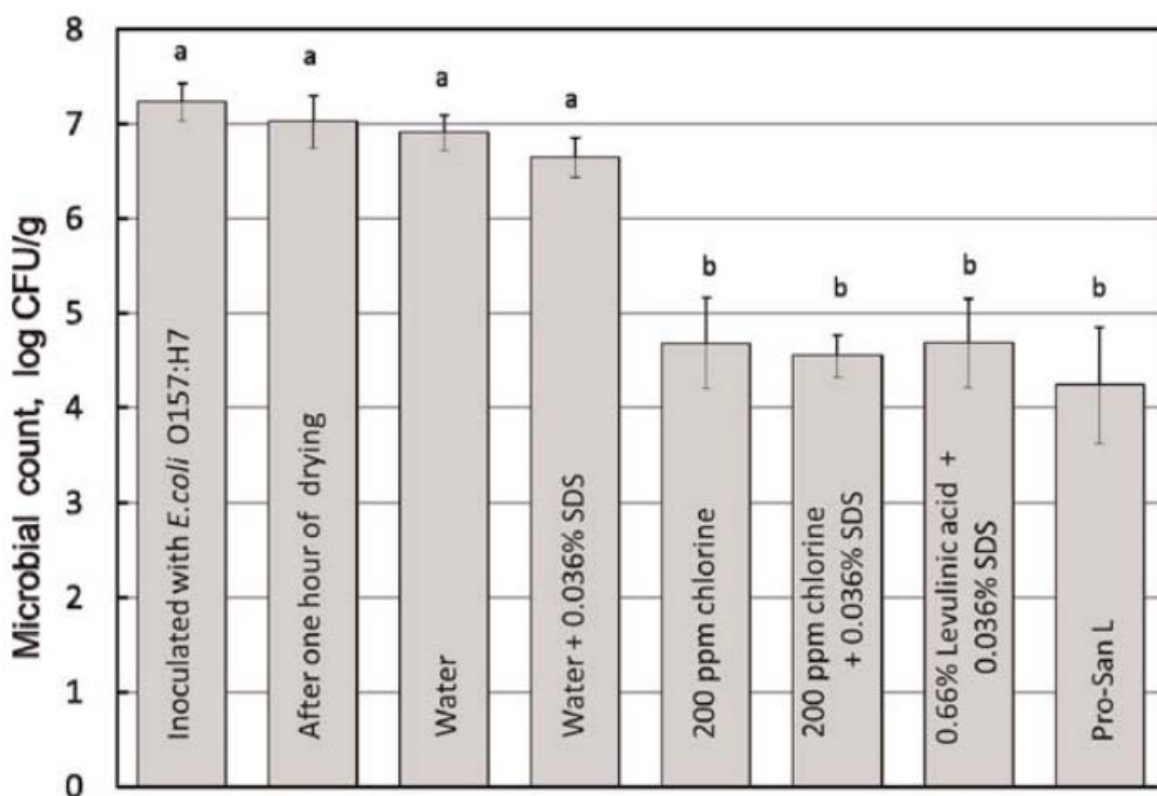


Рис. 3.1. Порівняння ефективності дезінфектантів на основі хлору та органічних кислот проти *E. coli* O157:H7. Спосіб обробки – розпилення. Час обробки – 30 хв. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 population on baby spinach leaves by liquid

Ті ж дезінфікуючі засоби в тих самих концентраціях розпилювали на інтактні листки шпинату *Spinacia oleracea* та витримували протягом 30 хвилин, щоб порівняти їхню ефективність проти епіфітної флори (рис. 3.2). Початкова концентрація природної мікробної популяції коливалася від 5,2 до 7,5 lg КУО/г. Ефективність досліджуваних дезінфікуючих засобів була нижчою проти природної флори, ніж *E. coli* O157:H7, без істотної різниці між дезінфікуючими засобами ( $p > 0,05$ ). Дезінфікуючі засоби показали інактивацію від 1,4 до 1,7 lg КУО/г. Нижчу ефективність можна пояснити інтерналізацією частини популяції всередину продихів і тріщин, де мікроорганізми не досягаються рідкими дезінфікуючими засобами. Додаткові експерименти із обробкою поверхні листків розчином гіпохлориту натрію та УФ світлом продемонстрували наявність природної флори у кількості  $(4,9 \pm 0,5)$  lg КУО/г на листках після успішної обробки поверхні.

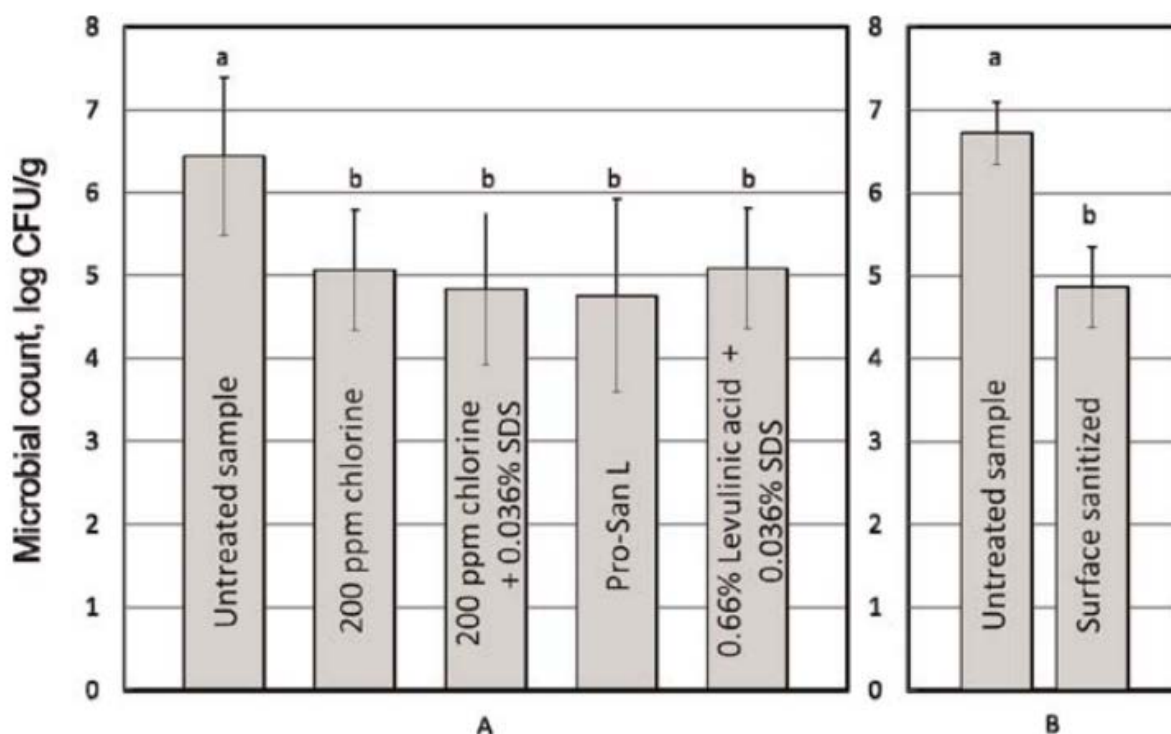


Рис. 3.2. (А) Порівняння ефективності дезінфектантів на основі хлору та органічних кислот проти епіфітної мікрофлори. Спосіб обробки – розпилення. Час обробки – 30 хв. (Б) Кількість мікроорганізмів на інтактному листі та листі з обробленою поверхнею. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 population on baby spinach leaves by liquid sanitizers. Journal of Food Process Engineering. 2017 Jun;40(3):e12479. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12479>

Ці дані відповідають результатам інших дослідників, які доводять наявність мікроорганізмів у порах і щілинах листя [224]. Ці результати також показують, що інтерналізовані мікроорганізми не досягаються рідкими дезінфікуючими засобами, які в першу чергу ефективні проти поверхневої мікрофлори.

#### ***Порівняння методів застосування дезінфікуючих засобів***

Були порівняні способи застосування Pro-San L шляхом розпилення (30 хв), занурення (30 хв) і сухого вакуумного просочування (30 хв). Початкова концентрація *E. coli* O157:H7 становила  $(7,0 \pm 0,1)$  lg КУО/г і  $(6,2 \pm 0,7)$  lg КУО/г для необроблених і підсушених протягом 1 години зразків відповідно. Застосування Pro-San L у вигляді спрею призвело до інактивації 2,6 lg КУО/г *E. coli* O157:H7, тоді як занурення зразка в дезінфікуючий засіб призвело до більшої інактивації (4,4 lg КУО/г). Занурення інокульованого шпинату у стерильну деіонізовану воду без перемішування показало зменшення мікробного навантаження на 1,4 lg КУО/г ( $p < 0,05$ ), тоді як зразки, обприскані водою, не змінили кількість мікроорганізмів (рис. 3.3).

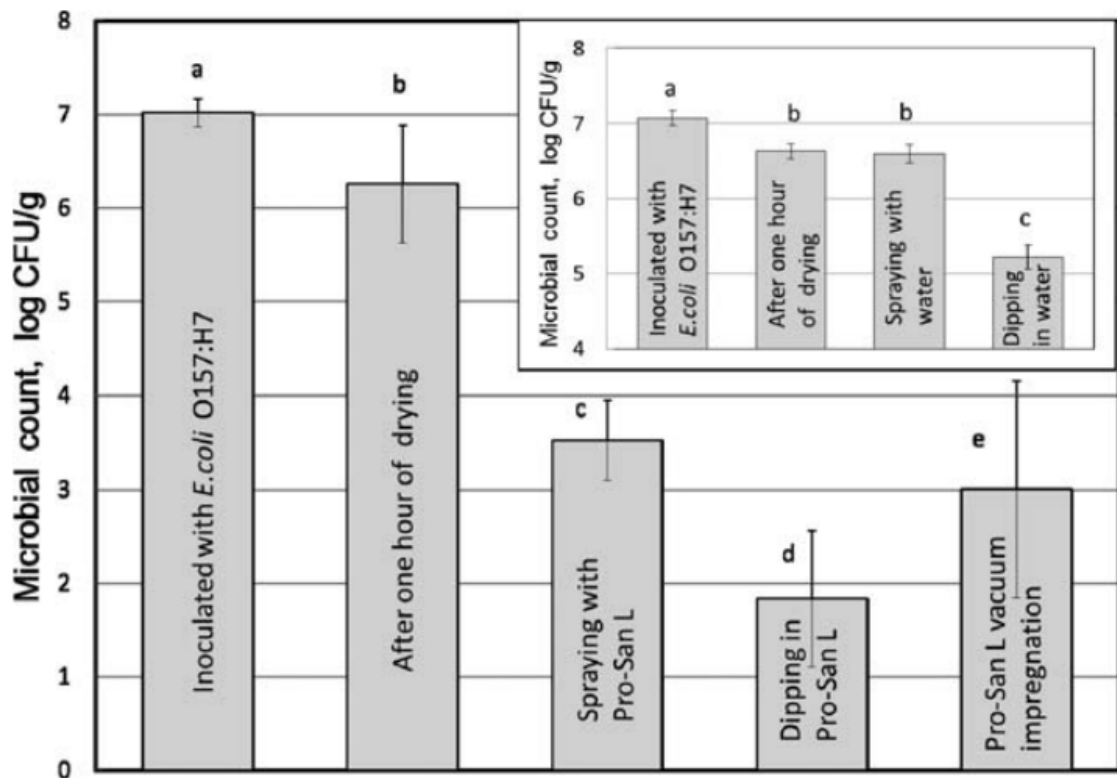


Рис. 3.3. Порівняння ефективності застосування Pro-San L шляхом розпилення, занурення і сухого вакуумного просочування для інактивації *E. coli* O157:H7. Вставка: Негативний контроль (розпилення і занурення з використанням стерильної деіонізованої води). Час обробки 30 хв. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 population on baby spinach leaves by liquid sanitizers. Journal of Food Process Engineering. 2017 Jun;40(3):e12479. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12479>

Це довело, що «миючий ефект» мав місце, коли листя занурювали в дезінфікуючий засіб і виймали з нього. Це узгоджується з іншими дослідженнями, які показують можливість «миючого ефекту» рідких дезінфікуючих засобів [225]. Очікувалося, що сухе вакуумне просочення дозволить дезінфікуючому засобу досягти інтерналізованих мікроорганізмів і продемонструвати вищу ефективність. Однак він був менш ефективним порівняно із зануренням і витримкою в дезінфікуючому засобі без перемішування протягом 30 хвилин (інактивація 3,3 lg

КУО/г). Такий результат, ймовірно, пов'язаний із проникненням бактерій глибше в структуру листя під дією вакууму, що зробило їх ще менш доступними для дезінфікуючого засобу. Крім того, сухе вакуумне просочення призвело до зміни кольору листя шпинату, зробивши його напівпрозорим. Була пошкоджена тканина листя, що призвело до прискореного псування продукції.

### ***Тривале застосування дезінфікуючого засобу***

Транспортування свіжої продукції до пакувального підприємства зазвичай займає від кількох годин до кількох днів [226]. Цей час можна використати для дезінфекції. Було оцінено ефективність розпилення рідкого дезінфікуючого засобу із експозицією протягом тривалого періоду часу (до 3 днів). Концентрація *E. coli* O157:H7 знизилася приблизно на 4 lg КУО/г після першого дня та залишилася практично незмінною після витримки. Не було значної різниці ( $p > 0,05$ ) у зниженні кількості *E. coli* O157:H7 між зразками, взятими в перший, другий, а також третій день експерименту.

Зовнішній вигляд оброблених зразків теж оцінювався. Втрата тургору листя та коричневі плями спостерігалися в місцях де накопичувався рідкий дезінфікуючий засіб. Пошкодження листя постійно прогресувало з часом протягом експерименту (рис. 3.4).

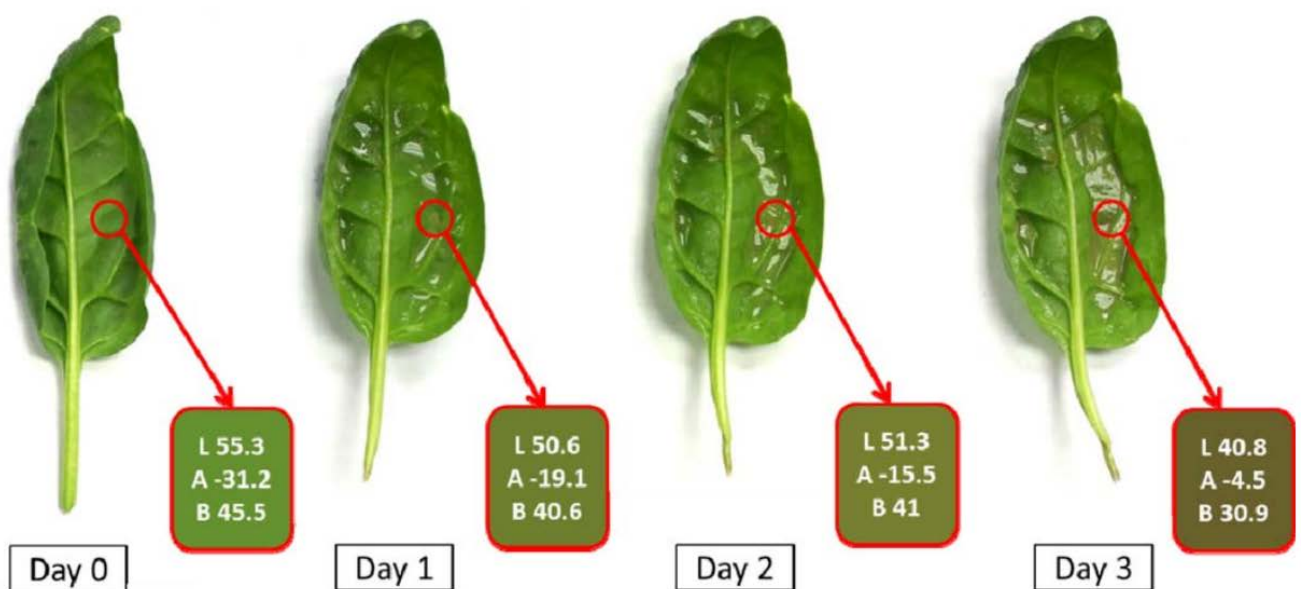


Рис. 3.4. Аналіз кольору листка шпинату після застосування засобу Pro-San L шляхом розпилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 population on baby spinach leaves by liquid sanitizers. Journal of Food Process Engineering. 2017 Jun;40(3):e12479. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12479>

Аналіз кольору поверхні шпинату показав зміни кольору та світлосили. Підвищилася інтенсивність червоної складової кольору пошкоджених ділянок листя шпинату, що призвело до видимого бурого кольору пошкоджених ділянок. Зменшилася світлосила пошкоджених ділянок. Однак не спостерігалось жодних видимих змін листя шпинату після короткочасної обробки (до 1 години) ProSan. Це свідчить про те, що використання рідких дезінфікуючих засобів, що містять органічні кислоти, протягом відносно короткого (близько 30 хв) часу можливе без помітних негативних наслідків. Загалом це дослідження продемонструвало важливість часу та методу застосування рідких дезінфікуючих засобів, подібність ефективності кожного з них і довгострокові наслідки їх використання та застосування.

Основні результати, отримані у цьому розділі, опубліковано в роботах автора [3,227–230].

Оригінал статті доступний за посиланням:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpe.12479>

## РОЗДІЛ 4

### Інактивація *Escherichia coli* газоподібним озоном

Безпека свіжої продукції, особливо листової зелені, є критично важливою проблемою через потенційну можливість її забруднення патогенними мікроорганізмами [231]. Штам ентерогеморагічної кишкової палички *Escherichia coli* O157:H7 є частим контамінантом свіжої продукції та викликає важкі захворювання харчового походження, включаючи геморагічний коліт і гемолітико-уремічний синдром, що становлять значний ризик для здоров'я населення [223]. Тому забезпечення мікробіологічної безпеки листової зелені протягом усього виробничого ланцюга має важливе значення. Одним з ключових етапів виробництва свіжої листової зелені є вакуумне охолодження – процес, який широко використовується для швидкого зниження температури зібраної зелені та подовження терміну її зберігання [232]. Однак вакуумне охолодження може сприяти глибшому проникненню мікроорганізмів у внутрішні тканини листя, що ускладнює подальшу дезінфекцію [233]. Розуміння факторів, які впливають на контамінацію та інфільтрацію під час вакуумного охолодження, має вирішальне значення для розробки ефективних стратегій дезінфекції. Обробка газоподібним озоном стала перспективним нетермічним методом інактивації патогенних мікроорганізмів на свіжих продуктах [234]. Озон, з його сильними окислювальними властивостями, може ефективно зменшити мікробне навантаження на поверхні та в товщі листової зелені [201].

#### 4.1 Фактори які впливають на проникнення *Escherichia coli* у тканину листків шпинату

При вивченні інтерналізації популяції *E. coli* K12 під час вакуумного охолодження при 0,6 кПа до застосування вакууму концентрація мікроорганізмів на листках шпинату *Spinacia oleracea* становила  $(6,94 \pm 0,35)$  lg КУО/г і  $(6,92 \pm 0,41)$

lg КУО/г для бактерій, інокульованих на адаксіальній та абаксіальній сторонах листа відповідно (рис. 4.1).

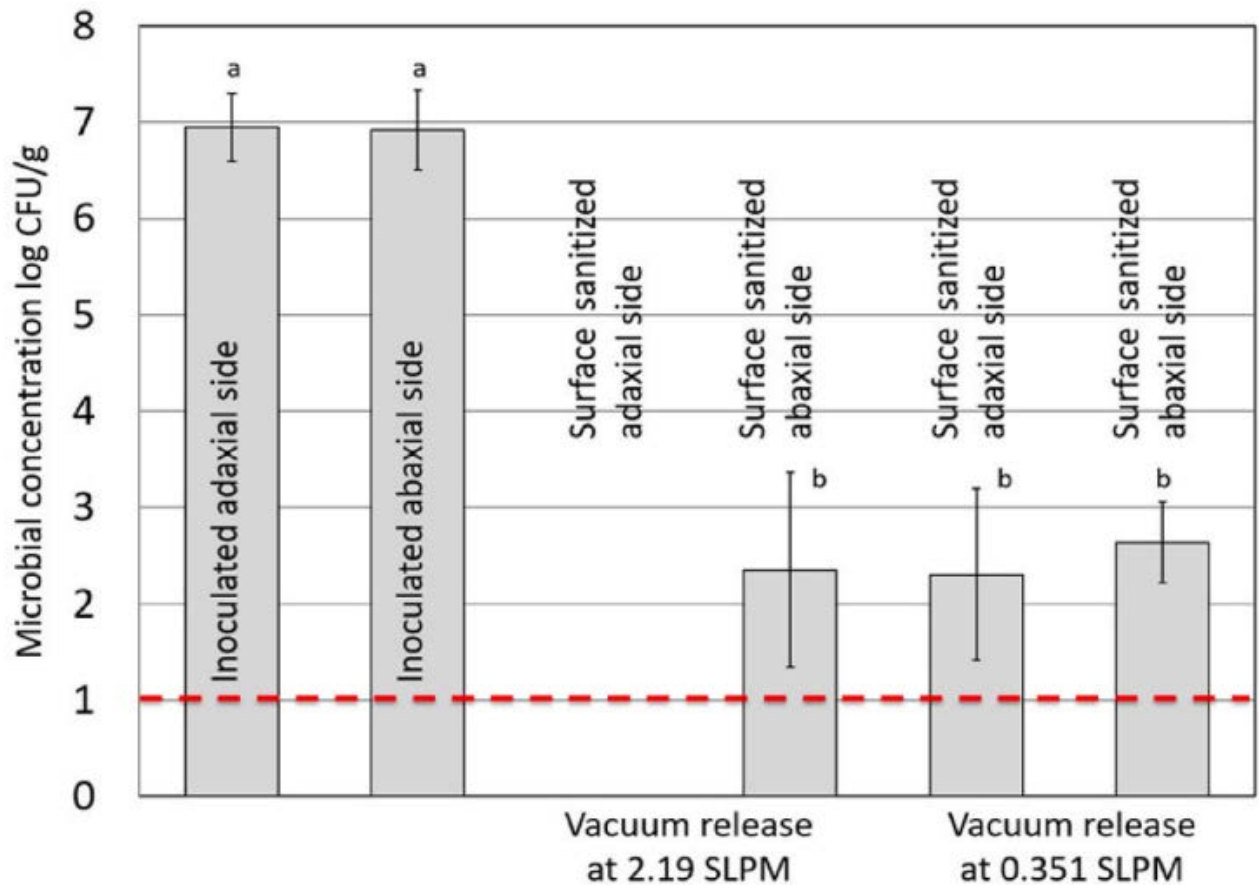


Рис. 4.1. Вплив швидкості потоку повітря при відновленні тиску до атмосферного на кінцеву кількість інтерналізованих бактерій при 0,6 кПа. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy T, Ranjbaran M, Datta AK, Sastry SK. Factors affecting contamination and infiltration of *Escherichia coli* K12 into spinach leaves during vacuum cooling. Journal of Food Engineering. 2021 Dec 1;311:110735. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110735>

Після процесу вакуумного охолодження з швидким (2,19 л/хв) відновленням тиску всередині камери до атмосферного та наступної дезінфекції поверхні листків на адаксіальній стороні проникнення бактерій не виявляли. Після такої ж обробки

у листках з інокульованою абаксіальною стороною виявляли  $(2,35 \pm 1,01)$  lg КУО/г *E. coli* K12. Така різниця в результатах може бути пояснена більшою кількістю продихів на абаксіальній стороні листків, що співпадає з даними Erickson et al., які виявили, що інфільтрація *E. coli* O157:H7 у листя салату відбувалася частіше в листках, обприсканих з абаксіального боку, ніж у листках, обприсканих з адаксіального боку [235]. Вакуумне охолодження з повільним  $(0,35$  л/хв) відновленням тиску до атмосферного призвело до інтерналізації  $(2,31 \pm 0,89)$  lg КУО/г і  $(2,64 \pm 0,42)$  lg КУО/г на адаксіальній та абаксіальній сторонах відповідно.

У експериментах із вакуумним охолодженням при 0,9 кПа початкова концентрація *E. coli* K12 становила  $(6,71 \pm 0,27)$  lg КУО/г для бактерій, інокульованих на адаксіальній стороні листя, і  $(6,75 \pm 0,25)$  lg КУО/г для бактерій, інокульованих на абаксіальній стороні (рис. 4.2). Після вакуумного охолодження листя з наступним швидким відновленням тиску до атмосферного не було виявлено бактеріальної інфільтрації як для адаксіально-інокульованих листків, так і для абаксіально-інокульованих листків. Повільне відновлення тиску до атмосферного призвело до інтерналізації  $(3,12 \pm 0,54)$  lg КУО/г і  $(2,74 \pm 0,94)$  lg КУО/г на адаксіальній та абаксіальній сторонах відповідно.

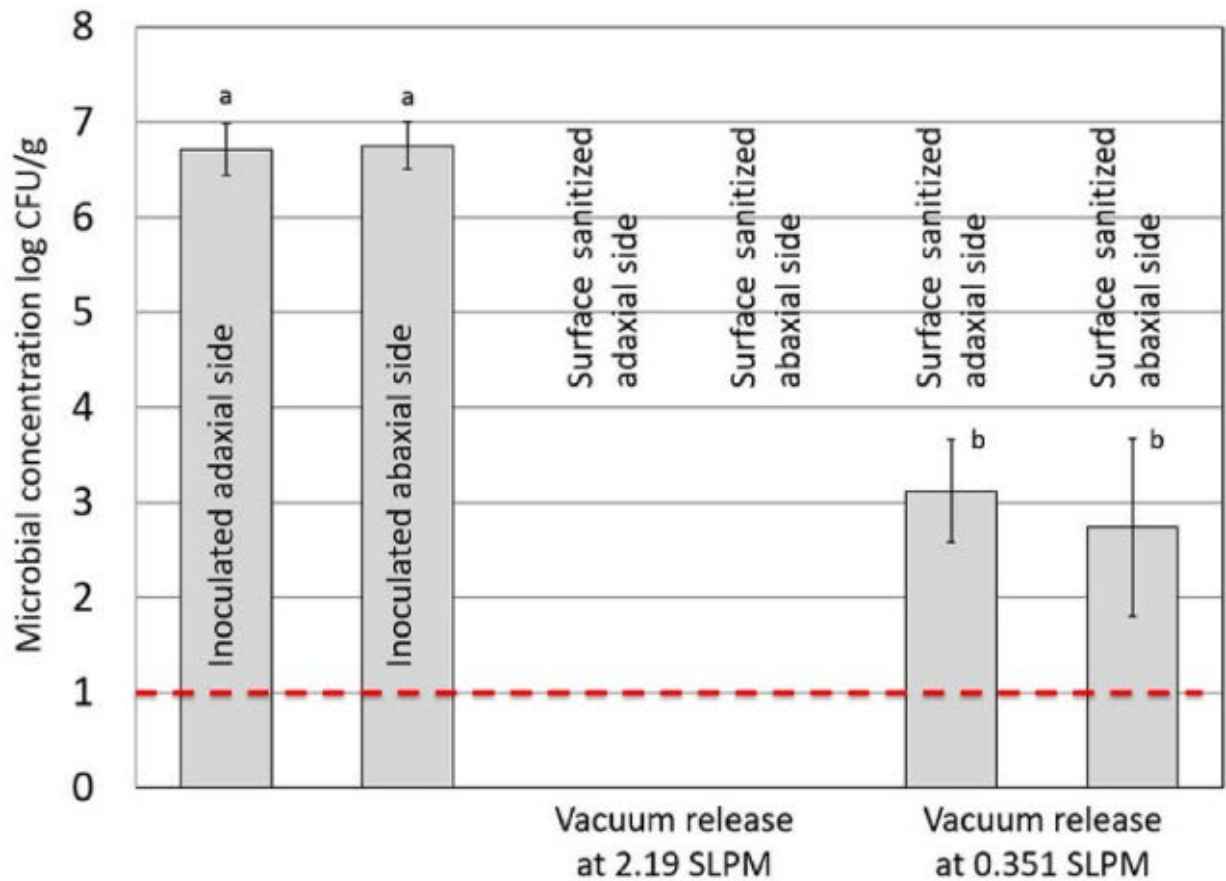


Рис. 4.2. Вплив швидкості потоку повітря при відновленні тиску до атмосферного на кінцеву кількість інтерналізованих бактерій при 0,9 кПа. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy T, Ranjbaran M, Datta AK, Sastry SK. Factors affecting contamination and infiltration of *Escherichia coli* K12 into spinach leaves during vacuum cooling. Journal of Food Engineering. 2021 Dec 1;311:110735. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110735>

#### 4.2 Застосування газоподібного озону для інактивації *Escherichia coli* O157:H7 на поверхні та у товщі листків шпинату

*Вплив різних протоколів застосування вакууму та тиску під час обробки листя шпинату газоподібним озonom*

Порівнювалася інактивація *E. coli* O157:H7 після обробкою озоном з використанням трьох різних протоколів: введення озону під вакуумом та утримання його при тиску нижчому за атмосферний: «Вакуум, O<sub>3</sub> (під вакуумом)»; введення озону під вакуумом з негайним підвищенням тиску у ємності до 69 кПа: «Вакуум, O<sub>3</sub> + 69 кПа»; та застосування озону при атмосферному тиску з наступним підвищенням тиску до 69 кПа: «O<sub>3</sub> (атм) + 69 кПа» (рис. 4.3).

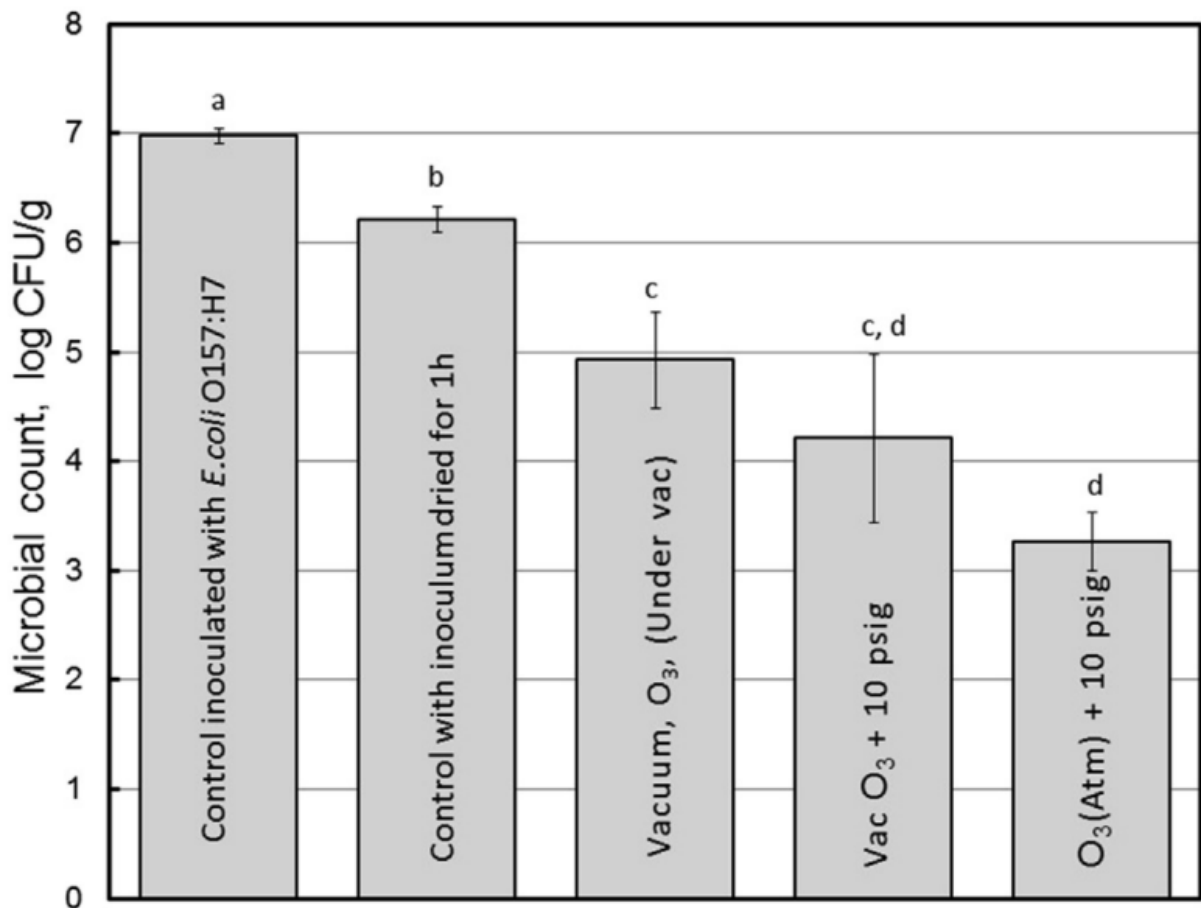


Рис. 4.3. Вплив тиску на інактивацію *E. coli* O157:H7. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy TI, Yousef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Engineering. 2016 Dec 1;191:10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025>

Обробка «Вакуум,  $O_3$  (під вакуумом)» дозволила інактивувати 1,3 lg КУО/г порівняно з контролем з інокулятом, підсушеним протягом однієї години ( $p < 0,05$ ). Обробка «Вакуум,  $O_3 + 69$  кПа» дала результат у інактивації 2,1 lg КУО/г *E. coli* O157:H7. Експерименти з обробкою « $O_3$  (атм) + 69 кПа» показали, що такий спосіб обробки газоподібним озоном є найефективнішим – інактивація становила 2,9 lg КУО/г. Такий результат свідчить про те, що застосування вакуумного охолодження зменшує кількість інактивованих бактерій через їх інтерналізацію у товщу тканини листків під дією вакууму. Еріксон [236] та Лі та ін. [209] повідомляли про індуковану вакуумом інтерналізацію бактерій у породи та щілини на поверхні листових овочів, що робить їх важкодоступними для дезінфікуючих засобів.

Щоб перевірити, чи стадія вакуумного охолодження видаляє мікроорганізми з поверхонь листків *Spinacia oleracea*, ми помістили відкриті чашки з агаром LB, в установку для вакуумного охолодження поблизу інокульованих зразків шпинату. Після вакуумного охолодження протягом 30 хв чашки виймали та інкубували при 37 °C протягом 24 годин. Бактеріального росту виявлено не було. Початкова концентрація на листках становила 7,5 lg КУО/г. Не було суттєвої різниці в популяції *E. coli* між необробленими зразками та зразками, підданими лише вакуумному охолодженню без санітарної обробки ( $p > 0,05$ ). Застосування озону 1,5 г/м<sup>3</sup> під час етапу вакуумного охолодження значно зменшило ( $p < 0,05$ ) популяцію життєздатних інтерналізованих бактерій з 3,2 lg КУО/г до 2,2 lg КУО/г (рис. 4.4).

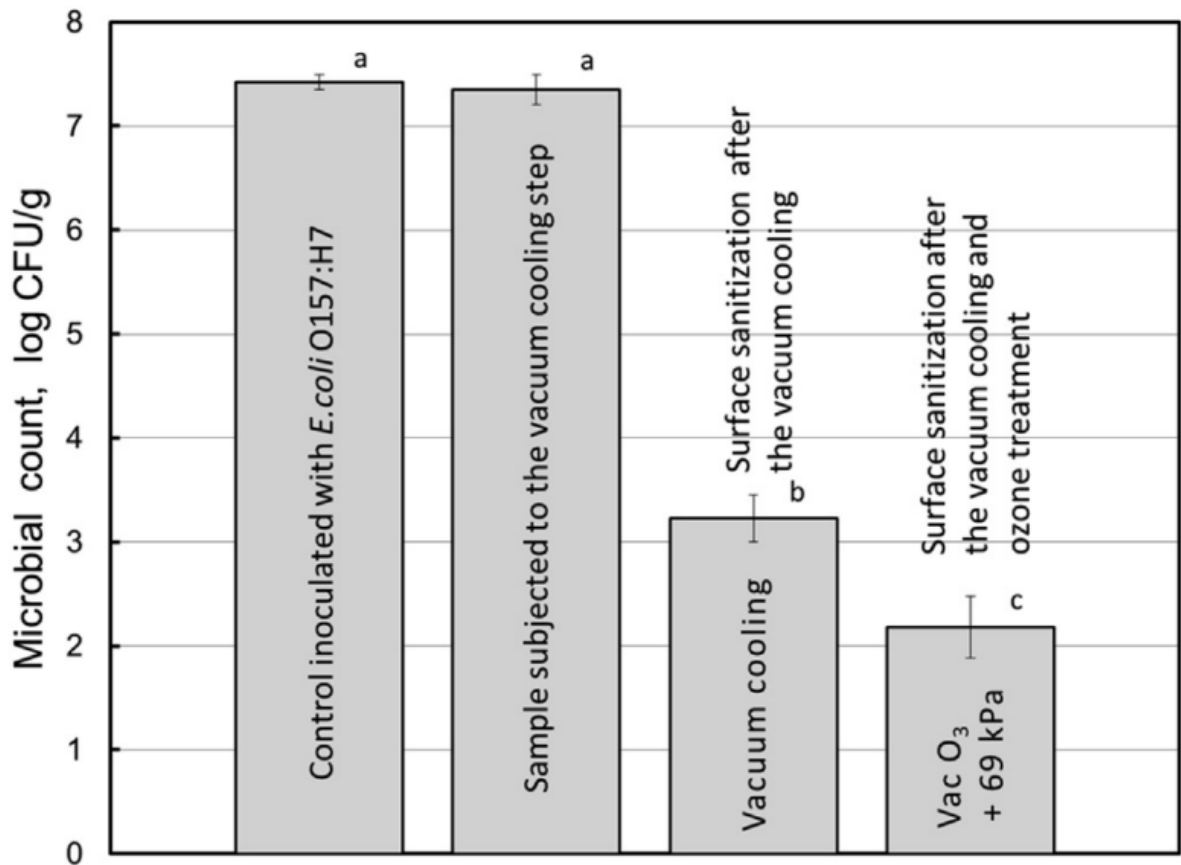


Рис. 4.4. Ефект вакуумного охолодження на інтерналізацію *E. coli* O157:H7. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy TI, Yousef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Engineering. 2016 Dec 1;191:10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025>

Це свідчить про те, що більш ефективно застосовувати санітарну обробку перед етапом вакуумного охолодження, якщо це економічно доцільно.

***Вплив різної кількості листя шпинату під час вакуумного охолодження та озонування на розкладання газоподібного озону та інактивацію бактерій***

При низькому завантаженні ( $26 \text{ г/м}^3$ ) установки листям шпинату *Spinacia oleracea*, що відповідає масовому відношенню продукції до газоподібного озону

~17:1, концентрація дезінфікуючого засобу практично не змінювалася протягом усього періоду обробки (рис. 4.5).

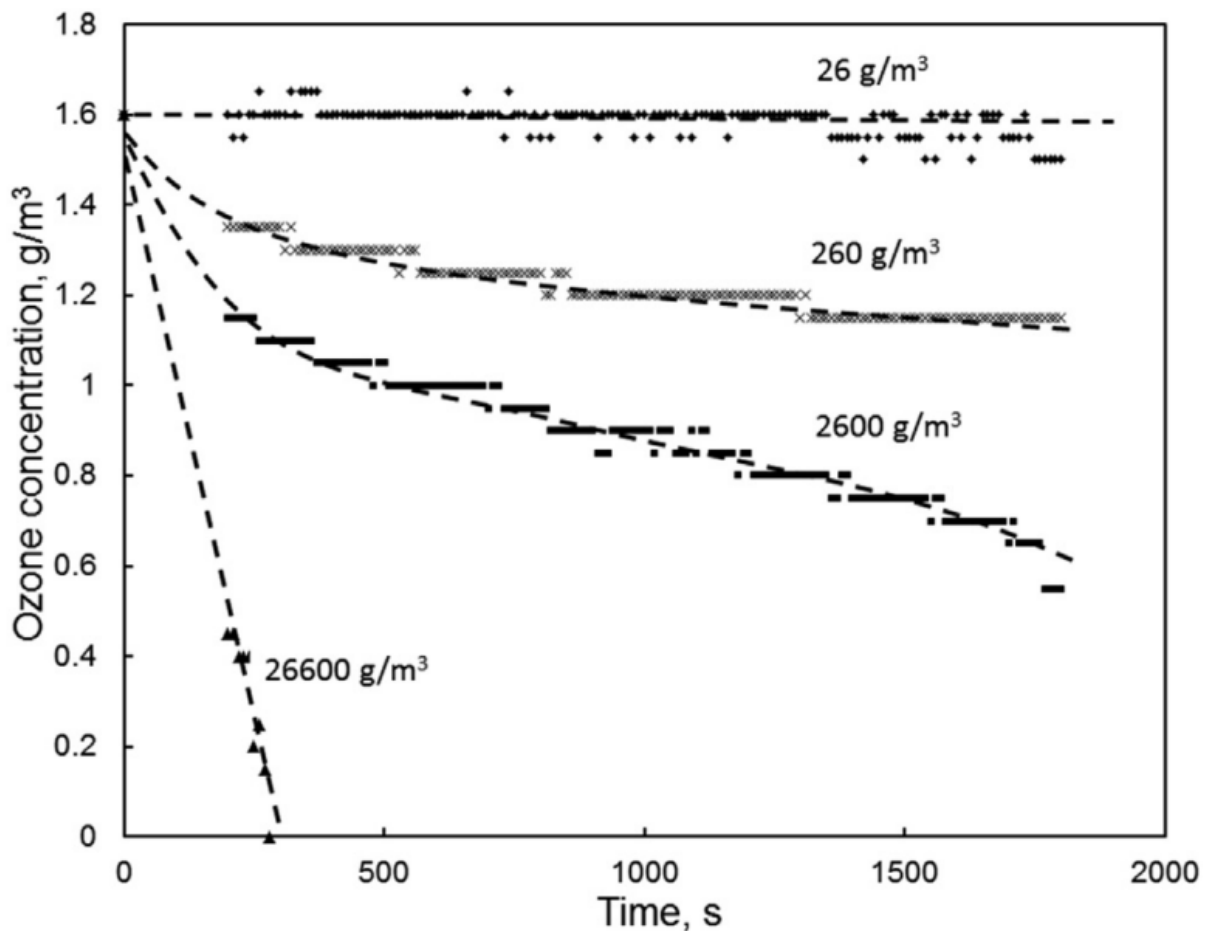


Рис. 4.5. Рівні декомпозиції газоподібного озону після разового введення при концентрації  $1,5 \text{ г/м}^3$  та утриманні протягом 30 хвилин при різних рівнях завантаженості установки шпинатом. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy TI, Yousef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Engineering. 2016 Dec 1;191:10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025>

Тут також можна зробити висновок, що розпад озону на внутрішніх стінках установки є незначним протягом досліджуваного періоду часу. Десяти- і стократне збільшення співвідношення продукту до дезінфікуючого засобу призвело до помітного зменшення озону через реакцію з поверхнею листя шпинату. При

співвідношенні маси продукту до озону 1700:1 ( $2600 \text{ г/м}^3$ ) (рис. 4.6 – додаток А6) до кінця 30-хвилинного циклу залишалося лише близько 50 % від початкової концентрації озону. Подальше десятикратне збільшення маси шпинату (рис. 4.7 – додаток А7) призвело до швидкого розпаду озону до рівня нижче межі виявлення протягом приблизно 5 хвилин.

Рівні інактивації *E. coli* O157:H7 співпадали зі швидкістю розкладання озону при різних рівнях завантаження установки шпинатом (рис. 4.8).

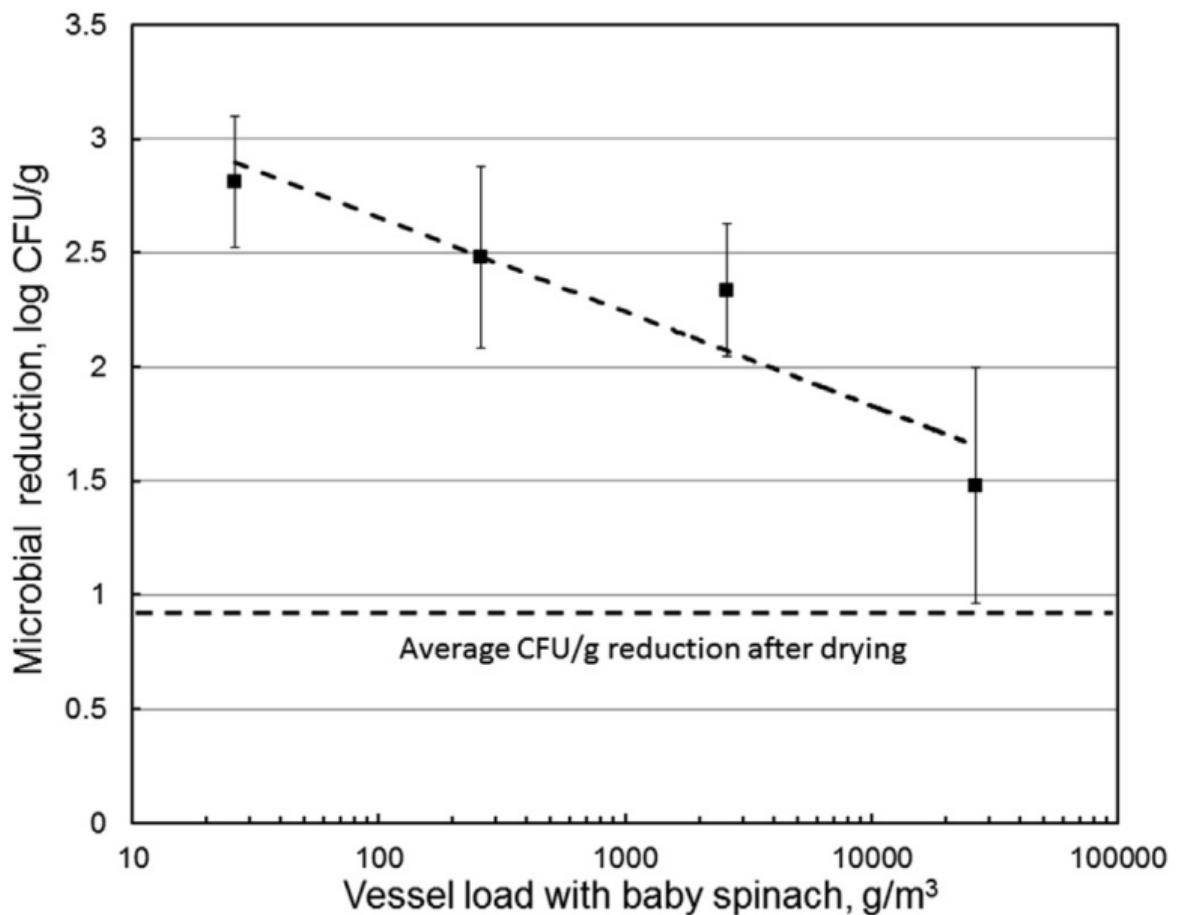


Рис. 4.8. Інактивація *E. coli* O157:H7 при різних рівнях завантаженості установки шпинатом після разового введення газоподібного озону при концентрації  $1,5 \text{ г/м}^3$  та утриманні протягом 30 хвилин. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy TI, Yousef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Engineering. 2016 Dec 1;191:10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025>

Максимальна інактивація близько 3 lg КУО/г спостерігалася, коли в експериментах використовувалася мінімальна кількість шпинату (26 г/м<sup>3</sup>). Ефективність обробки газоподібним озоном знижувалася, а розкид даних про інактивацію розширювався зі збільшенням кількості обробленого шпинату. При максимальному завантаженні пілотної установки шпинатом 26600 г/м<sup>3</sup> інактивація мікроорганізмів коливалася в межах 1-2 lg КУО/г.

***Вплив водної плівки на поверхні листя та вологи у камері на обробку газоподібним озоном***

На рис. 4.9 показано результати експериментів, у яких сухі та зволожені розпилюванням зразки обробляли газоподібним озоном із використанням двох різних протоколів. Як було встановлено раніше, ефективність озонування для сухих зразків, підданих вакуумному охолодженню, може знижуватися через можливу інтерналізацію бактерій. Однак зразки інокульованого молодого шпинату, зрошені водою, продемонстрували інший результат. Середня інактивація 2,5 lg КУО/г була отримана при озонуванні в поєднанні з вакуумним охолодженням у порівнянні із інактивацією 1,9 lg КУО/г, коли зразок обробляли при атмосферному тиску. Проте при зрошенні інокульованого листя водою не було статистично достовірної різниці ( $p > 0,05$ ) між обробками озонуванням з вакуумом та без нього. Очевидно, що утворення рідкої плівки на поверхнях продукту є бар'єром для газоподібного озону та значно погіршує його ефективність при інактивації бактерій. Хоч і достовірно незначна більш висока ефективність застосування озону після вакуумного охолодження, очевидно, пов'язана з видаленням води з поверхонь продуктів за рахунок випаровування води у вакуумі, що робить їх більш доступними для озону.

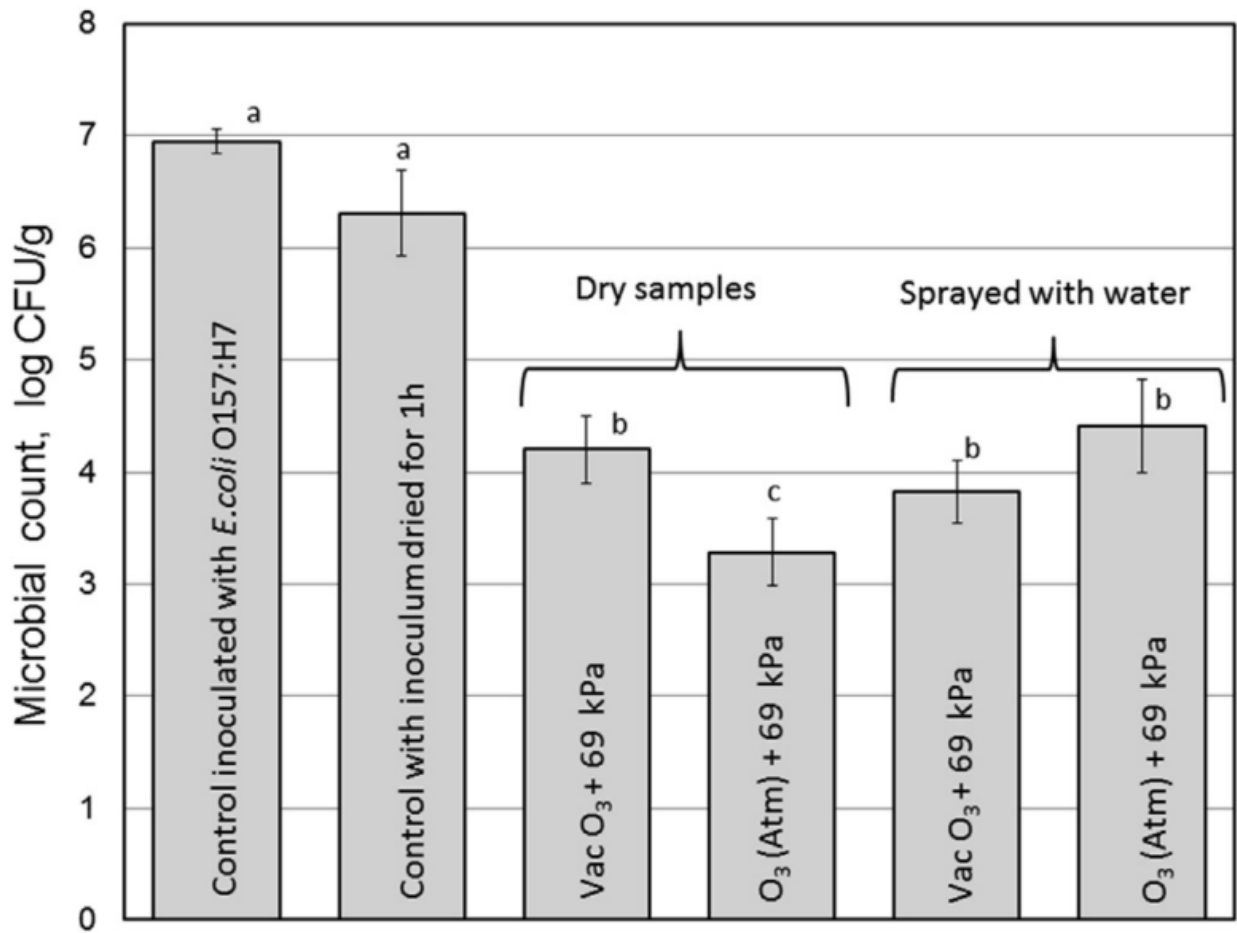
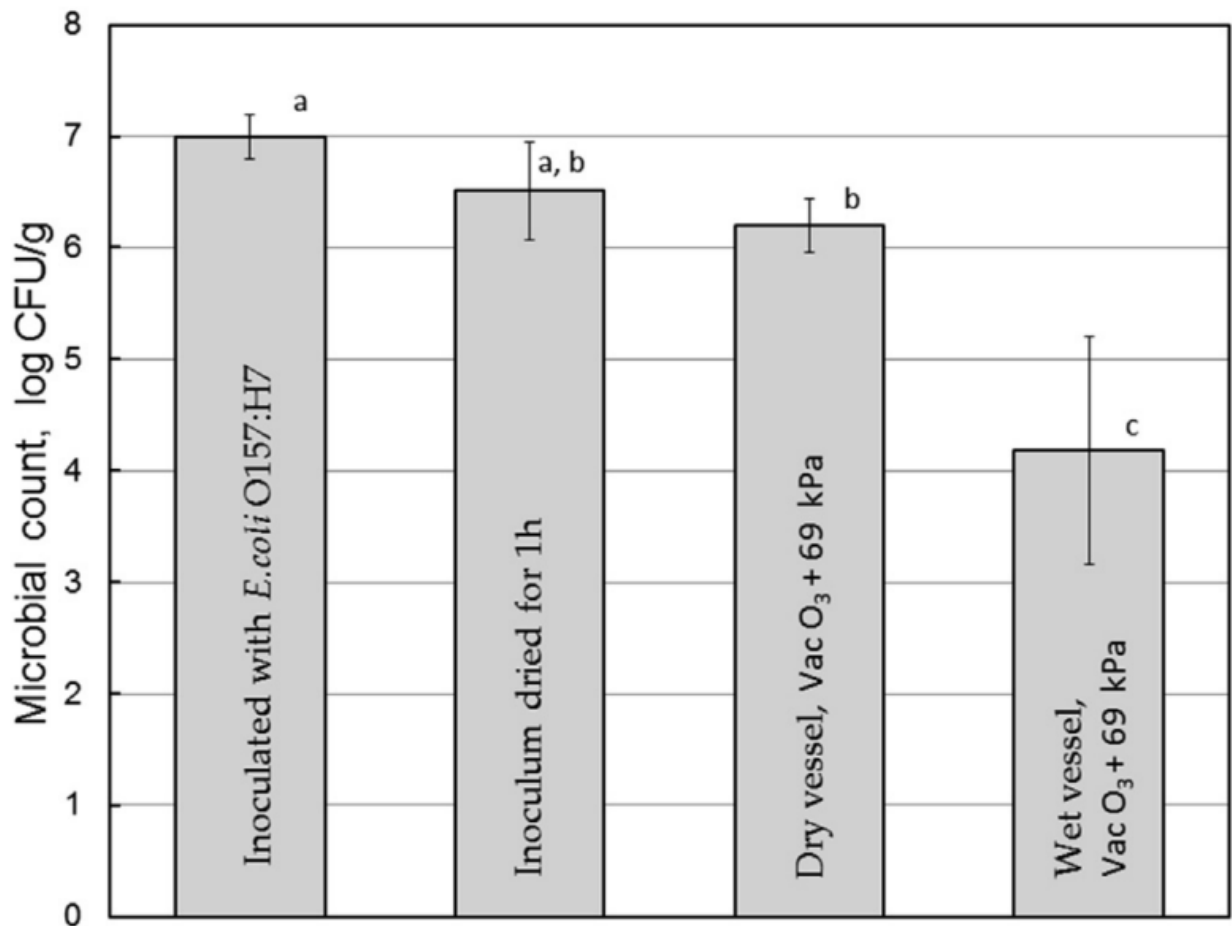


Рис. 4.9. Вплив водної плівки на поверхні листя на інактивацію *E. coli* O157:H7 при обробці газоподібним озоном. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy TI, Yousef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Engineering*. 2016 Dec 1;191:10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025>

Інше цікаве спостереження було пов'язане з наявністю води всередині установки та ступенем зменшення кількості інактивованих мікроорганізмів під час комбінованого вакуумного охолодження та обробки газоподібним озоном. Як видно на рис. 4.10, ефективність озону значно знижується, коли в установці немає води, доступної для випаровування під час

вакуумного охолодження, тобто коли як внутрішня поверхня установки, так і поверхня листя (загальна вага 10 г) є сухими.



**Fig. 8.** Effect of the presence of water in the vessel on the inactivation of *E. coli* O157:H7 with ozone. Different letters on bars represents significant difference ( $p < 0.05$ ). Error bars indicates  $\pm$  standard deviation of the mean after three replicates.

Рис. 4.10. Вплив наявності води всередині установки на інактивацію *E. coli* O157:H7 при обробці газоподібним озоном. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy TI, Yousef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Engineering. 2016 Dec 1;191:10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025>

Unger-Bimczok та ін. [237] досліджували знезараження поверхонь парою перекису водню та помітили, що більш високі рівні вологості призводять до швидшої інактивації досліджуваних організмів. Автори припустили механізм мікроконденсації, коли водяна пара поглинає молекули газу та утворює мікроскопічні відкладення водного розчину пероксиду водню на поверхнях. Подібний механізм, очевидно, має місце і в даному випадку. Коли вакуум у ємності для обробки порушується введенням озону, вода, що випаровується, може поглинати молекули озону та конденсуватися на поверхнях продукту.

***Вплив дозування газоподібного озону та тривалість його застосування під час імітованого транспортування шпинату***

На рис. 4.11 показані рівні інактивації *E. coli* O157:H7 на листках молодого шпинату під впливом низьких доз озону протягом трьох днів, які імітували етап транспортування свіжої продукції. Початкова концентрація *E. coli* O157:H7 на листках була понад 7 lg КУО/г. Зберігання інокульованих зразків у холодильнику (при 4 ° C), а також безперервна обробка киснем всередині установки протягом трьох днів не призвела до зменшення популяції *E. coli* O157:H7 на шпинаті. Однак безперервна подача в пілотну установку 0,032 та 0,106 г/м<sup>3</sup> озону при атмосферному тиску, що призвело до ~0,21 мг/м<sup>3</sup> та ~ 0,42 мг/м<sup>3</sup> озону всередині ємності для обробки відповідно, значно зменшила ( $p < 0,05$ ) популяцію *E. coli* O157:H7 на 0,9 lg КУО/г і 1,1 lg КУО/г порівняно з популяцією на контрольних зразках. Обробка при подачі 0,211 г/м<sup>3</sup> (~ 4,23 мг/м<sup>3</sup> всередині ємності) призвела до зменшення кількості мікроорганізмів на 1 lg КУО/г наприкінці першого дня, 1,9 lg КУО/г і 3,7 lg КУО/г *E. coli* O157:H7 наприкінці другої та третьої доби відповідно ( $p < 0,05$ ). Озонування з концентрацією газу на вході 0,53 г/м<sup>3</sup> (~10,6 мг/м<sup>3</sup> всередині посудини) досягло 1,6 lg КУО/г зниження *E. coli* O157:H7 наприкінці першого дня та 4,5 lg КУО/г наприкінці другого дня обробки, однак не було значної різниці між інактивацією після другого та третього днів.

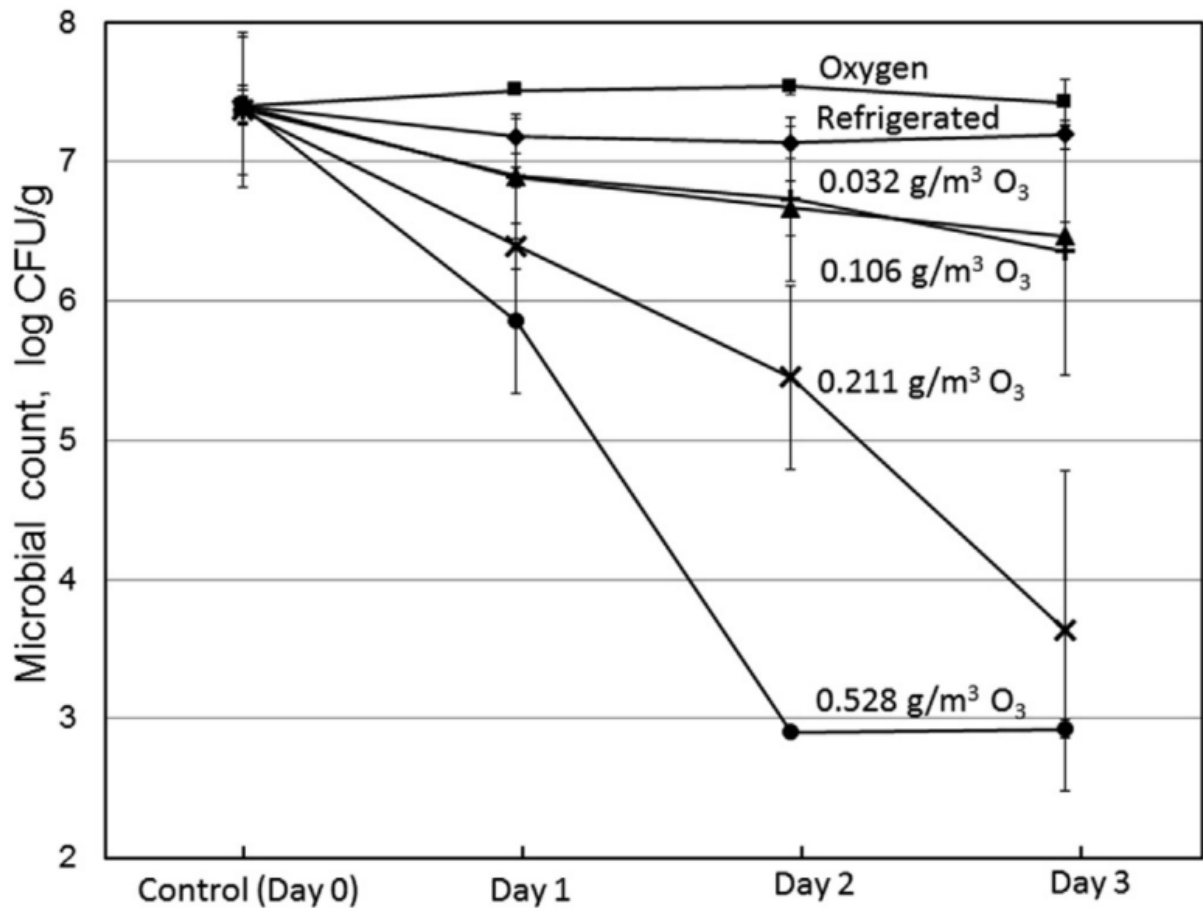


Рис. 4.11. Рівні інактивації *E. coli* O157:H7 на листках молодого шпинату під впливом низьких доз озону протягом трьох днів при максимальному завантаженні установки шпинатом (26600 г/м<sup>3</sup>). Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy TI, Yousef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Engineering. 2016 Dec 1;191:10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025>

Оцінювали результати комбінованої обробки газоподібним озonom, коли інокульований шпинат спочатку охолоджували застосуванням вакууму, обробляли озonom при 1,5 г/м<sup>3</sup> та тиском всередині ємності 69 кПа протягом 30 хв, а потім додатково піддавали дії озону 0,106 г/м<sup>3</sup> при потоці озону 2 л/хв протягом трьох днів (рис. 4.12). Комбінована газова обробка була більш ефективною щодо зменшення кількості мікроорганізмів порівняно з одноразовою короткочасною високою концентрацією озону або довготривалою обробкою низькою

концентрацією озону із сильно вираженим синергічним ефектом. Різниця між інактивацією *E. coli* O157:H7 для зразків, оброблених 0,106 г/м<sup>3</sup> озону на вході, і зразків, оброблених комбінованою газоподібною обробкою, становила 0,5 lg КУО/г ( $p < 0,05$ ) наприкінці першого дня обробки. На другу та третю добу різниця в інактивації зростає до 1,3 lg КУО/г та 3,8 lg КУО/г відповідно ( $p < 0,05$ ).

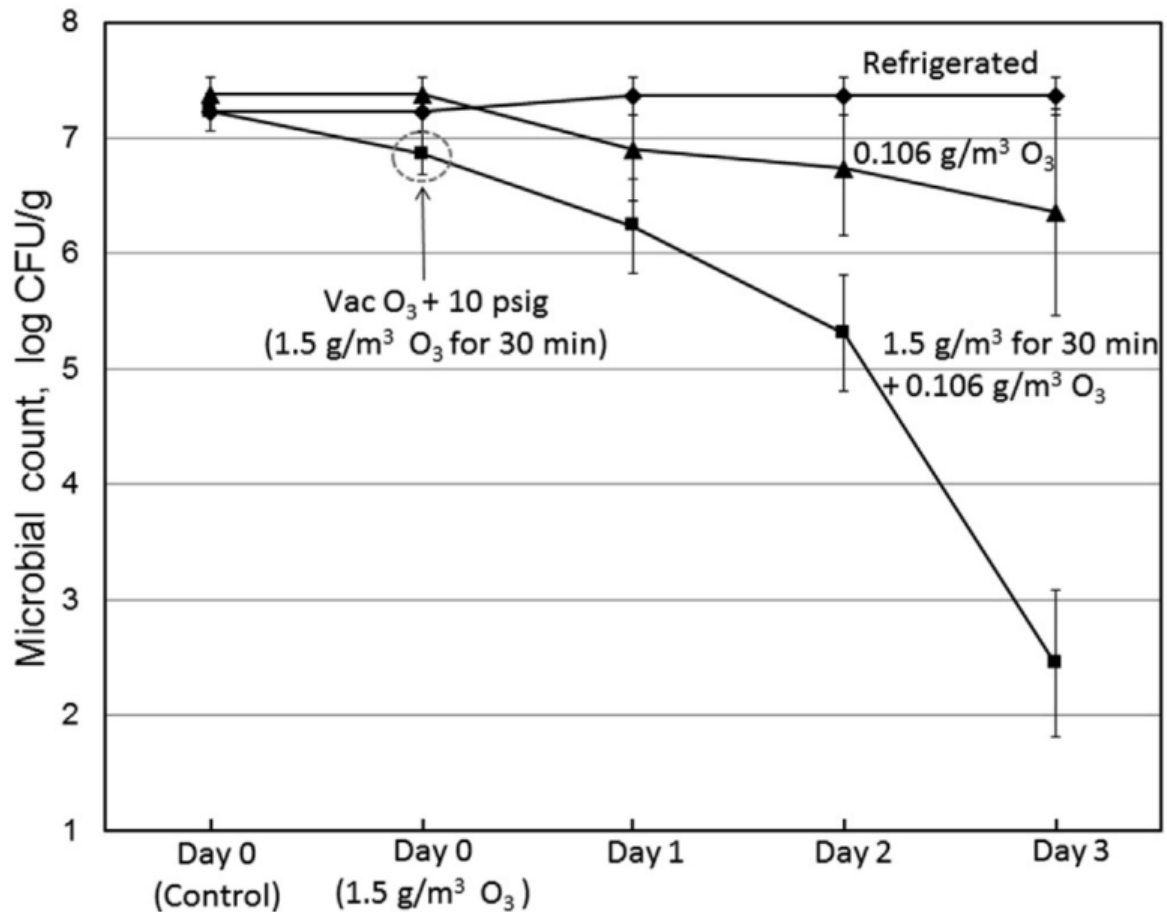


Рис. 4.12. Рівні інактивації *E. coli* O157:H7 на листках молодого шпинату під впливом низької дози озону (0,106 г/м<sup>3</sup>) протягом трьох днів при максимальному завантаженні установки шпинатом (26600 г/м<sup>3</sup>) і на необроблених листках, які зберігалися у холодильнику. Коло вказує на момент попередньої обробки газоподібним озonom при 1,5 г/м<sup>3</sup>, застосованої під вакуумом з подальшим підвищенням тиску до 69 кПа протягом 30 хв. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy TI, Yusef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of

*Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Engineering. 2016 Dec 1;191:10-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025>

При оцінці змін кольору обробленого листа були встановлені наступні зміни. При обробці озоном  $0,106 \text{ г/м}^3$  незначні зміни кольору листа (зі збільшенням параметру  $L^*$  від 46 до 51 і зсувом параметру  $b^*$  на 10 одиниць у бік жовтої складової кольору) спостерігалися навіть після третьої доби. Проте спостерігалася втрата тургору листа через втрату води, незважаючи на велику кількість конденсату всередині ємності. Підвищення концентрації озону на вході до  $0,211 \text{ г/м}^3$  призводило до утворення світло-зелених плям вже після першого дня обробки та більш вираженого побіління листа при збільшенні часу експозиції від 1 до 3 днів. Відбілювання, виражалось у збільшенні світлосили  $L^*$  з 51 до 83 від дня 0 до дня 3 і невеликий зсув параметру  $a^*$  в спектрі бік червоного кольору, при цьому спектр параметру  $b^*$  залишається практично незмінним.

Зразки, сфотографовані відразу після застосування газоподібного озону при його концентрації  $1,5 \text{ г/м}^3$  після вакуумного охолодження з подальшим підвищенням тиску до 69 кПа протягом 30 хвилин, не показали жодних видимих ознак зміни кольору або зовнішнього вигляду листа. Фотографії тих самих зразків, взяті після одного, двох і трьох днів обробки низькою концентрацією озону, продемонстрували зростаючий ступінь пошкодження в міру збільшення часу обробки. Знімки, зроблені через два та три дні, також показали значне збільшення світлосили ( $L^*$ ) і варіації в спектрах  $a^*$  і  $b^*$  (рис. 4.13).

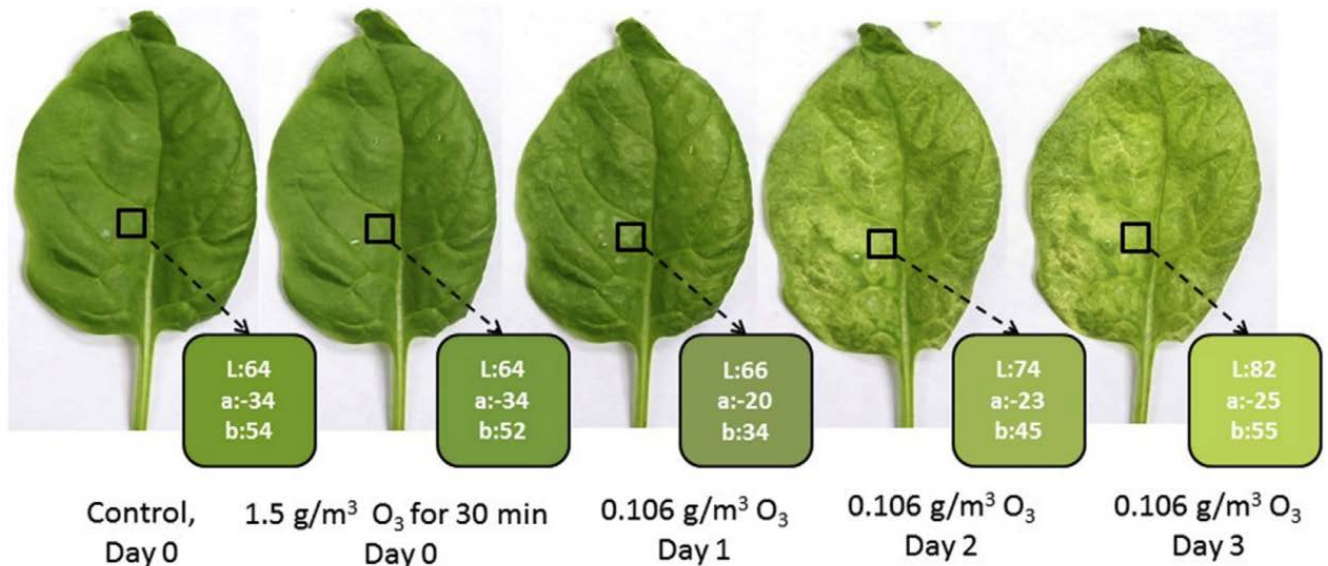


Рис. 4.13. Листя молодого шпинату, оброблене газоподібним озоном концентрацією 1,5 г/м<sup>3</sup>, застосованим у вакуумі з підняттям тиску до 69 кПа протягом 30 хвилин з подальшим впливом низької дози озону (0,106 г/м<sup>3</sup>, 2 л/хв) протягом трьох днів при максимальному завантаженні ємності для обробки шпинатом (26600 г/м<sup>3</sup>). Квадрати показують ділянки, де були проведено аналіз кольору з винесенням L а b параметрів кольору. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy TI, Yousef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Engineering. 2016 Dec 1;191:10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025>

Слід зазначити, що в дослідженнях використовували листя молодого шпинату *Spinacia oleracea*, який є чутливим до обробки озоном. Відповідно така обробка може бути застосована до інших фруктів, овочів або листової зелені з меншою шкодою для якості.

Основні результати, отримані у цьому розділі, опубліковано в роботах автора [109,238–244].

Оригінали статей доступні за посиланнями:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877421002600?via%3Dihub>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877416302308?via%3Dihub>

## РОЗДІЛ 5

### **Застосування рідких та газоподібних дезінфектантів у комбінації для інактивації *Escherichia coli* O157:H7**

Мікробіологічна безпека свіжих продуктів є першочерговою проблемою харчової промисловості та превентивної медицини через часті спалахи харчових захворювань, пов'язаних із такими патогенними мікроорганізмами, як *Escherichia coli* та *Salmonella* spp. [245]. Ці збудники можуть контамінувати фрукти та овочі на різних ділянках ланцюга виробництва та постачання, створюючи серйозний ризик для здоров'я споживачів [246]. Традиційні методи дезінфекції, хоча й певною мірою ефективні, часто стикаються з обмеженнями в повному забезпеченні мікробіологічної безпеки свіжих продуктів. Однією з перспективних стратегій є поєднання газоподібного озону та рідких дезінфікуючих засобів. Газоподібний озон, відомий своїми сильними окислювальними властивостями, може ефективно проникати та інактивувати широкий спектр мікроорганізмів на поверхнях продукції та в щілинах, куди не можуть проникнути рідкі засоби [234]. Його здатність розкладатися на нешкідливий кисень робить його екологічно чистим варіантом [201]. Рідкі дезінфікуючі засоби, такі як розчини на основі хлору та органічні кислоти, широко використовуються для миття та дезінфекції продуктів, пропонуючи швидке та ефективне зменшення кількості мікроорганізмів [3]. Проте кожен метод має свої обмеження: газоподібний озон швидко реагує з усім з чим контактує і розпадається, а рідкі дезінфікуючі засоби можуть бути менш ефективними проти збудників, інтерналізованих всередину продукту.

Поєднуючи газоподібний озон із рідкими дезінфікуючими засобами, можна використовувати сильні сторони обох методів для досягнення більш комплексного ефекту дезінфекції. Синергічна дія цих процедур може посилити інактивацію мікроорганізмів, зменшити ризик перехресної контамінації та підвищити мікробіологічну безпеку свіжих продуктів.

***Комбінована обробка рідким дезінфектантом та високою концентрацією газоподібного озону***

Досягнута інактивація мікробної популяції *E. coli* O157:H7 одноразовим розпиленням Pro-San L, одноразовою обробкою газоподібним озonom та їх комбінацією за різних умов показана на рис. 5.1.

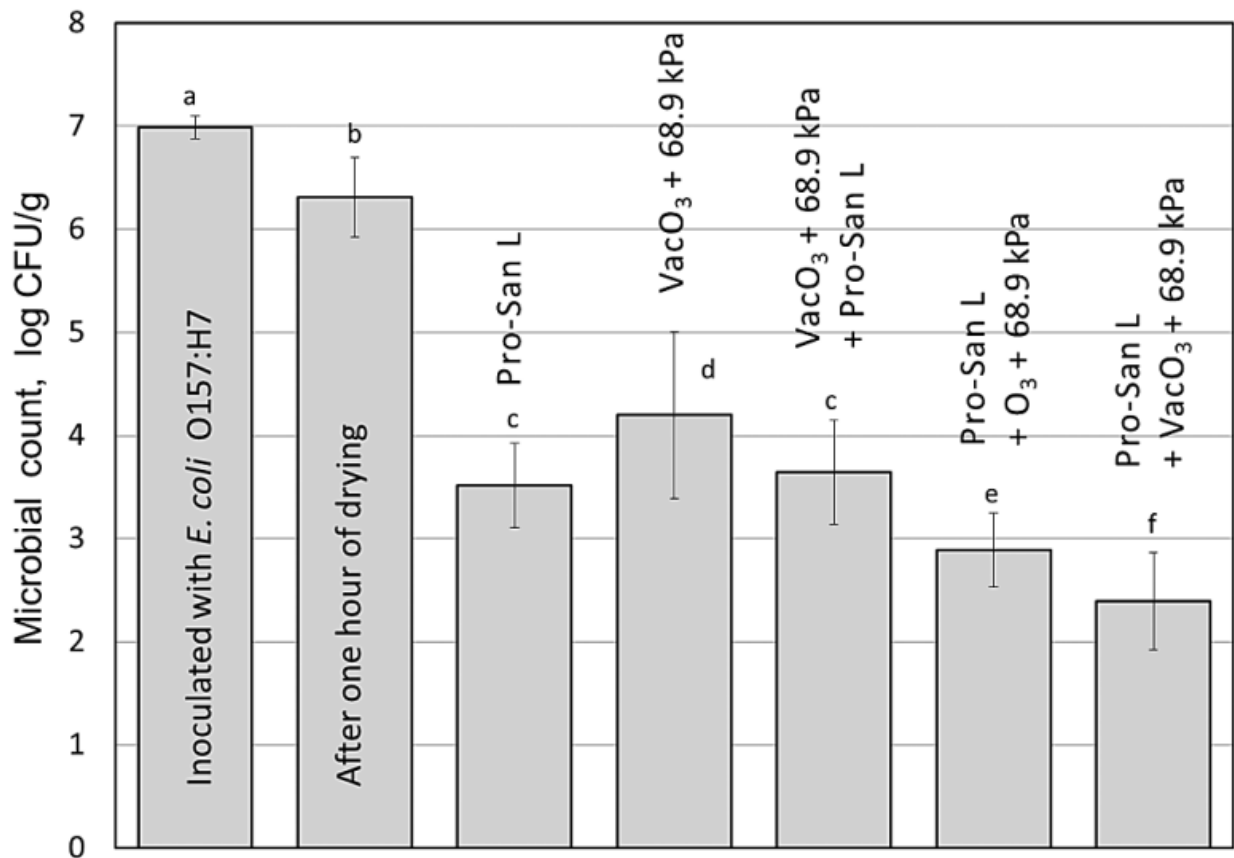


Рис. 5.1. Вплив обробки дезінфектантами окремо та при їх комбінуванні на інактивацію *E. coli* O157:H7 на листі шпинату. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Fresh produce sanitization by combination of gaseous ozone and liquid sanitizer. Journal of Food Engineering. 2017 Oct 1;210:19-26. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.031>

Обробка рідким дезінфектантом Pro-San L (32 обприскування) і 30-хвилинне витримування на листках шпинату з підсохлим інокулятом призвели до зниження кількості *E. coli* O157:H7 на 2,8 lg КУО/г. Одноразове застосування газоподібного озону було менш ефективним і досягло 2,1 lg КУО/г інактивації ( $p < 0,05$ ).

Ефективність комбінованої обробки була нижчою за очікувану. Найменш ефективним серед досліджуваних протоколів комбінованої обробки було застосування спрею Pro-San L після обробки озоном, введеним під вакуумом, з наступним негайним підвищенням тиску системи до 69 кПа «Вакуум,  $O_3$  + 69 кПа + Pro-San L». Ефективність цієї комбінованої обробки була приблизно такою ж (зменшення популяції бактерій на 2,7 lg КУО/г), як і одноразове застосування рідкого дезінфікуючого засобу ( $p > 0,05$ ). Такий результат пов'язаний з індукованою вакуумом інтерналізацію бактерій глибше в тканину листя, після якої такі бактерії менше піддаються впливу дезінфікуючої рідини. Обприскування дезінфектантом Pro-San L з наступною обробкою озоном при атмосферному тиску протягом 30 хвилин «Pro-San L +  $O_3$  + 69 кПа» призвело до інактивації 3,4 lg КУО/г *E. coli* O157:H7 ( $p < 0,05$ ). Подібна комбінована обробка із застосуванням вакууму «Pro-San L + Вакуум,  $O_3$  + 69 кПа» дозволила інактивувати 3,9 lg КУО/г.

***Комбінована тривала обробка рідким дезінфектантом та газоподібним озоном***

Необроблені зразки інокульованих листків шпинату, які зберігалися у холодильнику при 4 ° С протягом усього експерименту не продемонстрували зменшення популяції *E. coli* O157:H7. Розпилення Pro-San L із тривалою експозицією досягла 4,1 lg КУО/г інактивації порівняно з контролем наприкінці першого дня обробки ( $p < 0,05$ ). Достовірної різниці між результатами після першого та другого днів обробки не було. Зменшення мікробної популяції інокуляту на листках порівняно з контролем на кінець третьої доби становило 4,9 lg КУО/г ( $p < 0,05$ ).

Обробка газоподібним озоном високою концентрацією (1,5 г/м<sup>3</sup>) протягом 30 хвилин призвела до зменшення кількості мікроорганізмів на 0,4 lg КУО/г ( $p > 0,05$ ). Після додаткової обробки низькою концентрацією озону (0,106 г/м<sup>3</sup>) додатково інактивовано 0,6 lg КУО/г, 0,9 lg КУО/г і 2,9 lg КУО/г після першого, другого та третього днів обробки відповідно ( $p < 0,05$ ).

Порівняно з цими двома методами обробки комбінованою обробкою досягнуто 3,1 lg КУО/г після дезінфекції розпиленням Pro-San L і витримки

протягом 30 хвилин ( $p < 0,05$ ). Зменшення мікробної популяції досягло додаткових 1,4 lg КУО/г після обробки зразків озоном протягом 30 хвилин ( $p < 0,05$ ). Подальша безперервна обробка низькою концентрацією озону ( $0,106 \text{ г/м}^3$  на вході в установку) зменшила популяцію *E. coli* O157:H7 нижче рівня детекції (рис. 5.2).

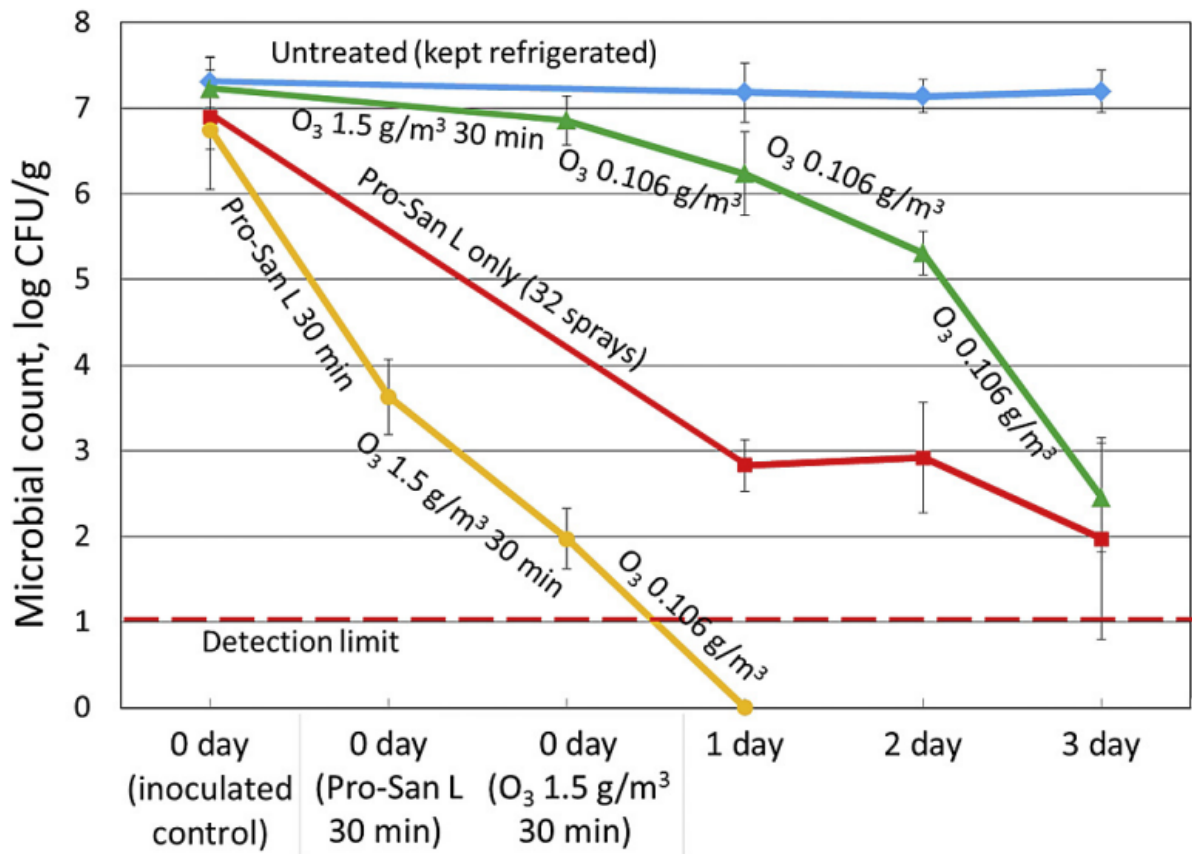


Рис. 5.2. Рівень виживання *E. coli* O157:H7 на листі шпинату після одноразової обробки Pro-San L, комбінованої обробки газоподібним озоном шляхом короткочасної обробки високою концентрацією озону ( $1,5 \text{ г/м}^3$ ) і тривалої обробки з низькою концентрацією озону ( $0,106 \text{ г/м}^3$  на вході) та комбінованої обробки із застосуванням Pro-San L з подальшою комбінованою обробкою газоподібним озоном. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Fresh produce sanitization by combination of gaseous ozone and liquid sanitizer. Journal of Food Engineering. 2017 Oct 1;210:19-26.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.031>

Одночасно з мікробіологічним аналізом досліджували зміну зовнішнього вигляду поверхні листків шпинату *Spinacia oleracea*. При аналізі листків шпинату, які піддавалися впливу високої концентрації озону протягом 30 хвилин і низької концентрації озону протягом трьох днів відмічали зменшення їх тургору та появу білуватих плям, які спостерігалися після першого дня обробки. Видиме відбілювання прогресувало, коли час впливу збільшувався з 1 до 3 днів. Аналіз кольору поверхні шпинату показав збільшення світлосили  $L^*$  та зменшення інтенсивності зеленого та жовтого кольорів, починаючи з першого дня тривалої обробки. На третій день обробки знову посилилася інтенсивність жовтого забарвлення. Однак після короткої обробки (30 хвилин) високою концентрацією озону не спостерігалось змін світлосили.

При оцінці зовнішнього вигляду молодого листа шпинату, обробленого дезінфектантом Pro-San L відмічали втрату тургору листа та коричневі плями, які спостерігалися в місцях накопичення рідкого дезінфікуючого засобу. Ураження листа прогресувало з часом. Аналіз кольору поверхні оброблених листків шпинату показав зміни кольору та світлосили. Збільшилась інтенсивність червоної складової кольору пошкоджених ділянок листків шпинату та зменшилась інтенсивність жовтого кольору, що призвело до появи характерного коричневого забарвлення пошкоджених ділянок. Зменшилась світлосила пошкоджених ділянок. Однак ніяких видимих змін на листі шпинату не спостерігалось після короткої (до однієї години) обробки дезінфектантом Pro-San L.

Оцінювали зовнішній вигляд молодого листа шпинату, підданого впливу рідкого дезінфектанту Pro-San L протягом 30 хвилин з подальшим застосуванням високої концентрації озону протягом 30 хвилин і низької концентрації озону протягом трьох днів (рис. 5.3).

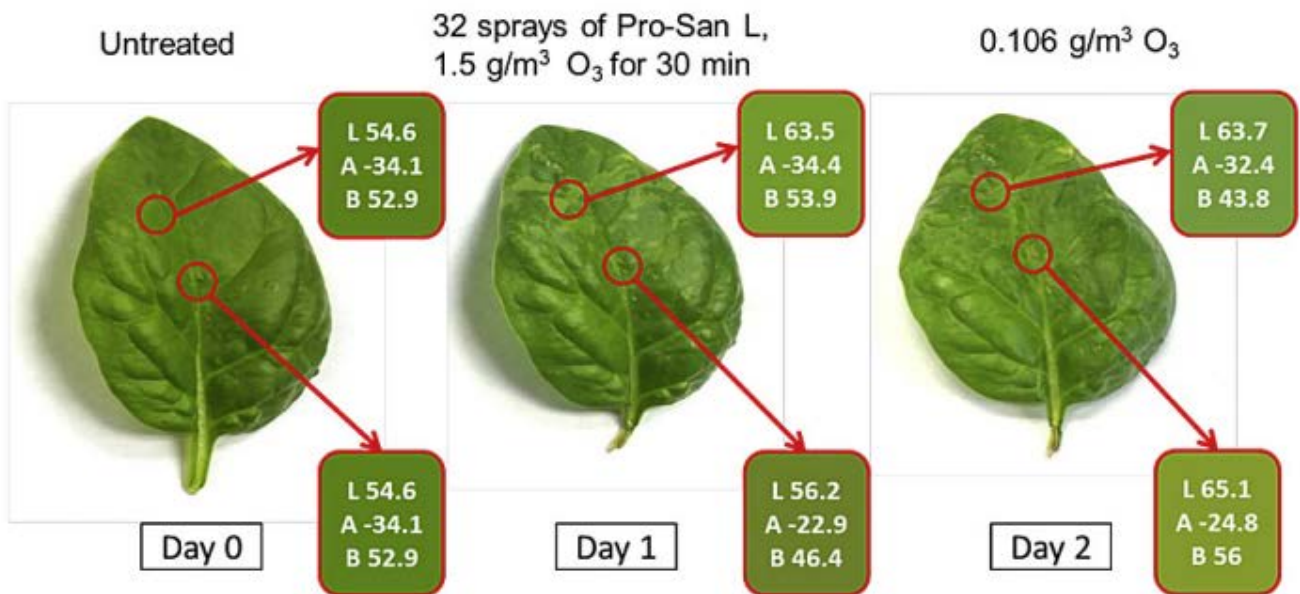


Рис. 5.3. Аналіз кольору листя молодого шпинату, обробленого дезінфектантом Pro-San L, газоподібним озоном концентрацією 1,5 г/м<sup>3</sup> з наступною обробкою низькою концентрацією озону (0,106 г/м<sup>3</sup> на вході). Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Fresh produce sanitization by combination of gaseous ozone and liquid sanitizer. Journal of Food Engineering. 2017 Oct 1;210:19-26. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.031>

Як і в попередніх випадках, не було видимих змін на листі шпинату після обробки Pro-San L і короткочасної обробки озоном. Проте після першої та другої доби на листках шпинату спостерігалось побіління та буруваті плями. Порівняно з листям шпинату, обробленими лише озоном і дезінфектантом Pro-San L, відбілювання листя було менш інтенсивним, а коричневі ділянки були набагато меншими. Кращий вигляд листя після тривалої комбінованої обробки можна пояснити зменшенням пошкодження листя лимонною кислотою через випаровування води під час етапу вакуумного охолодження. З іншого боку Pro-San L містить поверхнево-активну речовину додецилсульфат натрію, яка дозволяє створити рівномірну тонку плівку на поверхні листя, що захищає листки шпинату від озону. Це узгоджується з іншими дослідженнями, які показали, що присутність поверхнево-активної речовини підвищує ефективність засобів, які захищають від озону [247].

Основні результати, отримані у цьому розділі, опубліковано в наступних роботах автора [110,227–230,240,248,249].

Оригінали статей доступні за посиланнями:

[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X23059628?via %3Dihub](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X23059628?via%3Dihub)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877417301218>

## РОЗДІЛ 6

### Застосування озону для знезараження води

Доступ до чистої та безпечної питної води має важливе значення для здоров'я та добробуту населення, особливо в умовах війни, техногенних аварій чи природних катастроф, коли інфраструктура очищення води може бути порушена або недоступна [250]. Забезпечення постачання питної води в таких складних умовах вимагає розробки надійних, ефективних і портативних технологій дезінфекції. Традиційні методи дезінфекції води, такі як хлорування та обробка ультрафіолетом (УФ), є ефективними, але мають свої обмеження. При хлоруванні можуть утворюватися шкідливі побічні продукти дезінфекції [6,231], а УФ-обробка вимагає достатньої прозорості води, щоб бути повністю ефективною [251]. Зростає інтерес до вивчення альтернативних технологій дезінфекції, які можуть подолати ці проблеми та забезпечити чисту питну воду.

Електролітична обробка є перспективним рішенням для дезінфекції води у кризових умовах. Цей метод включає генерацію озону та активних форм кисню шляхом електролізу води, утворюючи потужні окисники, здатні інактивувати широкий спектр збудників, включаючи бактерії, віруси та найпростіші [29]. Здатність озону швидко розкладатися на нешкідливий кисень робить його екологічно чистим варіантом, знижуючи ризик шкідливих побічних продуктів, пов'язаних з іншими методами дезінфекції, такими як хлор [251,252]. Розуміння ефективності та практичності озонування має вирішальне значення для його більш широкого застосування в дезінфекції води.

#### **6.1 Інактивація автохтонної флори води при її обробці електролізом**

##### *Очищення води від природнього бактеріального забруднення*

Проведені дослідження показали, що обробка електролізом достовірно знижує кількість мікроорганізмів у воді. Водопровідна вода і до обробки виявилася досить чистою із загальним мікробним числом (ЗМЧ)  $(28,3 \pm 3,6)$  КУО/мл (до 1,5

lg КУО/мл). Вода, якою забезпечується м. Тернопіль піддається хлоруванню, тому такий результат був очікуваним. Після обробки електролізом, незалежно від його тривалості та додаткової експозиції, у водопровідній воді майже не виявляли бактерій (рис. 6.1).

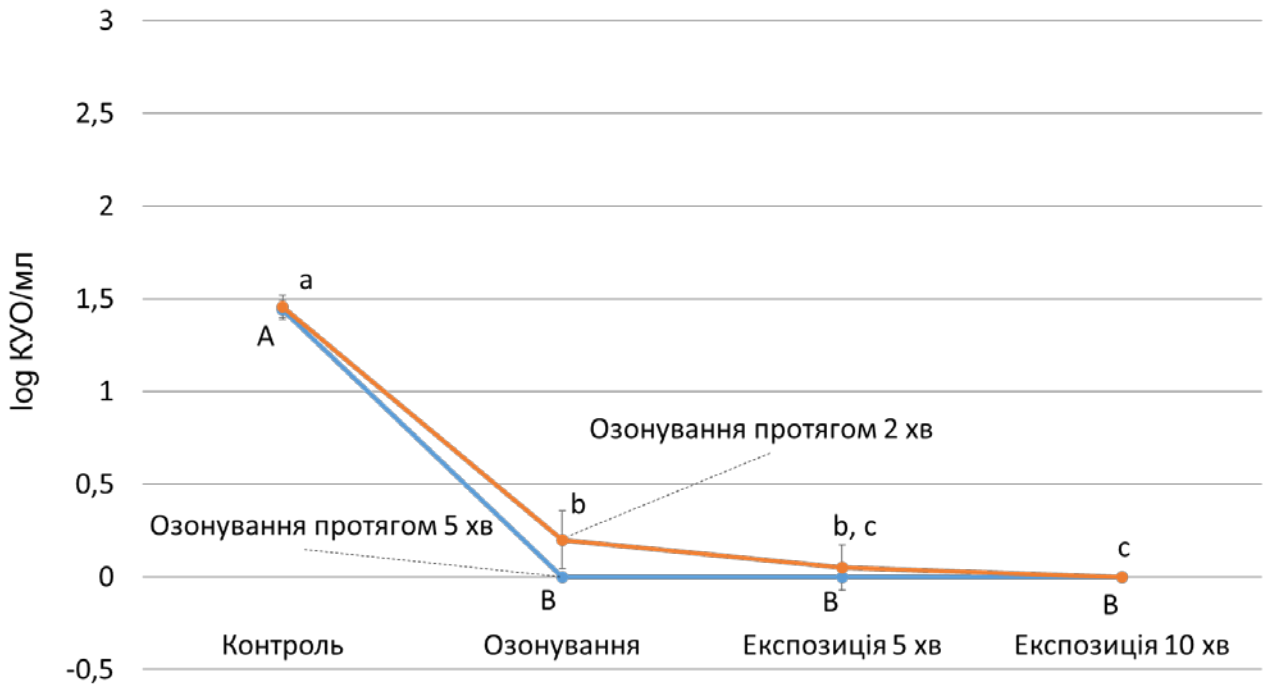


Рис. 6.1. Кількість мікроорганізмів у водопровідній воді обробленій двома режимами озонування та додатковою експозицією у порівнянні із контролем. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення, літери біля маркерів значень представляють значущу різницю ( $p < 0,05$ )

Джерельна вода очікувано виявилася більш контамінованою із ЗМЧ ( $514,0 \pm 106,2$ ) КУО/мл ( $\sim 2,7$  lg КУО/мл). Обробка електролізом протягом 2 та 5 хвилин (режим 1 та 2 відповідно) знешкоджувала бактеріальну флору такої води, зменшуючи кількість мікроорганізмів на 1,9 та 2,0 lg КУО/мл відповідно у порівнянні із контролем ( $p < 0,05$ ). Подальша, після початкової обробки протягом 2 хвилин (режим 1), 5-ти та 10-ти хвилинна експозиція дозволила інактивувати ще 0,3 та 0,4 lg КУО/мл ( $p < 0,05$ ). Після додаткової експозиції після початкової обробки протягом 5 хвилин (режим 2) мікроорганізми або не виявлялися зовсім, або виявлялися поодинокі колонії після інокуляції нерозведених зразків (рис. 6.2).

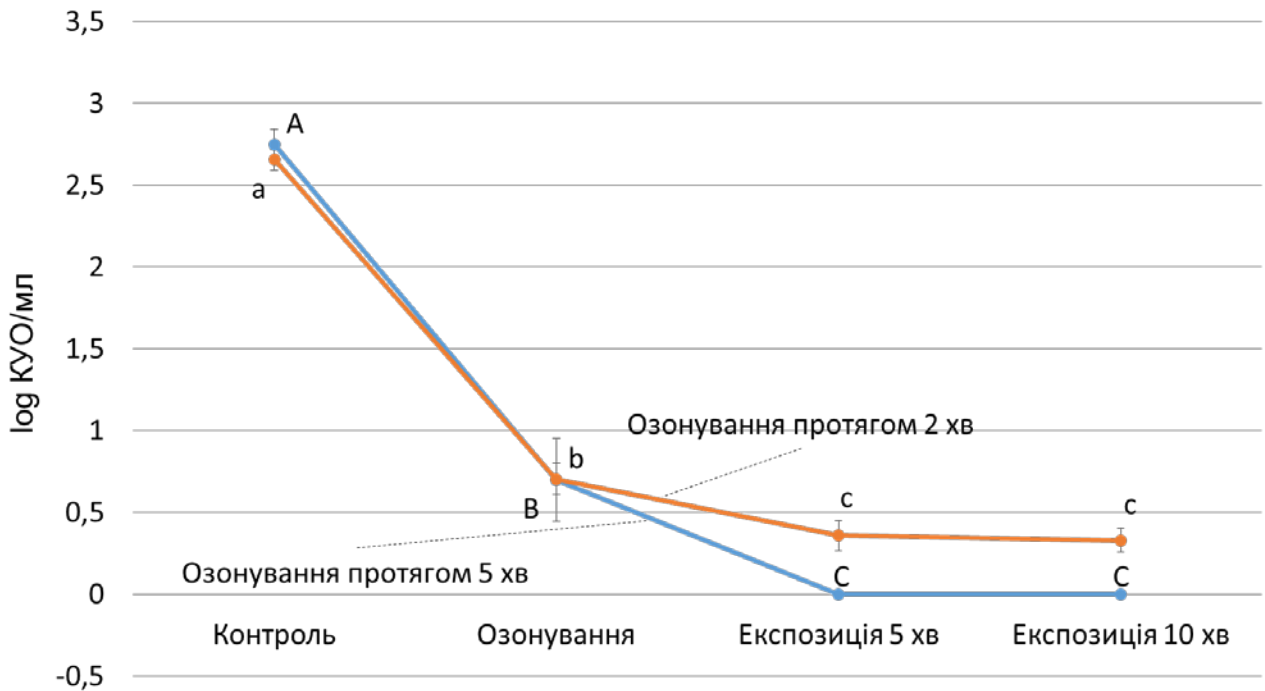


Рис. 6.2. Кількість мікроорганізмів у джерельній воді обробленій двома режимами озонування та додатковою експозицією у порівнянні із контролем. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення, літери біля маркерів значень представляють значущу різницю ( $p < 0,05$ )

Прибережна вода з Тернопільського ставу була найбільш контамінованою, ЗМЧ становило  $(5963,1 \pm 1205,4)$  КУО/мл ( $\sim 3,8$  lg КУО/мл). Обробка електролізом обома режимами продемонструвала їх меншу ефективність, у порівнянні з джерельною водою, знешкодивши 0,9 та 1,2 lg КУО/мл відповідно ( $p < 0,05$ ). Додаткова експозиція після обробки електролізом у режимі 1 знешкоджувала ще 0,4 та 0,1 lg КУО/мл, а після обробки в режимі 2 – 0,6 та 0,1 lg КУО/мл ( $p < 0,05$ ). Як і у випадку із джерельною водою між значеннями після експозицій тривалістю 5 та 10 хвилин не було статистично достовірної різниці ( $p > 0,05$ ) (рис. 6.3).

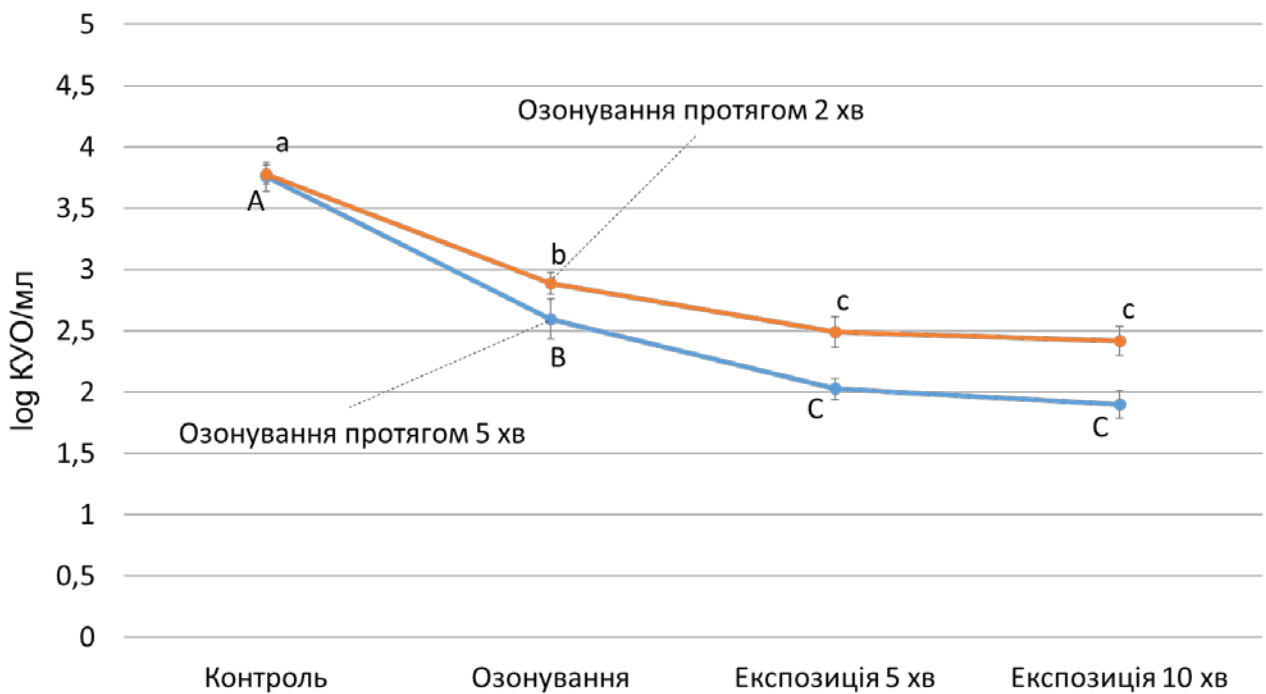


Рис. 6.3. Кількість мікроорганізмів у воді відкритих водойм обробленій двома режимами озонування та додатковою експозицією у порівнянні із контролем. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення, літери біля маркерів значень представляють значущу різницю ( $p < 0,05$ )

Як видно з результатів, основна інактивація відбувається під час процесу обробки води електролізом, а додаткова експозиція дає необхідний час для озону та інших активних продуктів електролізу щоб окислити достатньо компонентів бактеріальних структур для інактивації більшої кількості клітини. Проте, під час додаткової експозиції ефективність знешкодження бактерій знижується. Такий тренд інактивації можна пояснити тим, що озон та інші продукти електролізу є нестійкими і у водному розчині при кімнатній температурі швидко розкладаються [6]. Наявність органічних речовин у воді прискорює цей процес, їх концентрація падає і, відповідно, дезінфікуючий ефект зменшується [112].

Недостатню ефективність разового використання приладу для електролізу води для інактивації нормальної мікрофлори води із ЗМЧ вище 100 можна пояснити низькою концентрацією утвореного озону. J. Gomes et al. стверджували, що оптимальна доза озону для дезінфекції може коливатися від 2 до 15 мг/л залежно від концентрації органічних речовин у воді [6]. З іншого боку, Ding et al.

показали, що навіть невисока концентрація озону (1,5 мг/л) може інактивувати мікроорганізми резистентні до хлорування [253].

### ***Вимірювання мінералізації води***

При використанні приладу для електролізу води у оброблених зразках спостерігали появу осаду схожого на накип, який утворюється при випаровуванні води. Було вирішено перевірити рівень мінералізації до та після використання озонатора протягом 5 хв. Результати (табл. 6.1) показали незначне зниження мінералізації у всіх зразках, яке, проте, було статистично достовірним ( $p < 0,05$ ) лише у випадку з джерельною водою ( $(388,0 \pm 3,0)$  мг/л проти початкового значення  $(421,0 \pm 3,6)$  мг/л).

**Таблиця 6.1.** Ефект озонування на мінералізацію води

Вода	Загальна кількість розчинених твердих речовин, мг/л	
	Контроль	Озонування протягом 5 хвилин
Водопровідна	$446,7 \pm 3,5$	$443,0 \pm 2,6$
Джерельна	$421,0 \pm 3,6$	$388,0 \pm 3,0^*$
Відкритих водойм	$171,7 \pm 6,1$	$160,7 \pm 1,5$

Примітка: \* –  $p < 0,05$

Подібне явище спостерігали А. Ikhlq et al. [254] при каталітичному озонуванні питної води у східному Лахорі (Пакистан). Зменшення мінералізації вони пов'язували з іонним обміном при якому відбувалася заміна кальцію на натрій. В. Wang також спостерігав зменшення мінералізації при електролізі води під низькою напругою (7,5-12 V) протягом 3-10 хвилин [213].

## **6.2 Дослідження знезараження води за допомогою обробки електролізом для застосування в умовах воєнного часу**

### *Вимірювання концентрації озону у водному розчині при спонтанному розпаді*

Проведені дослідження показали, що початкова концентрація озону відрізнялася від заявлених виробником. Так, використання режиму 1 створювало розчин із концентрацією озону ( $0,74 \pm 0,04$ ) мг/л, а режиму 2 – ( $1,72 \pm 0,18$ ) мг/л (рис. 6.4).

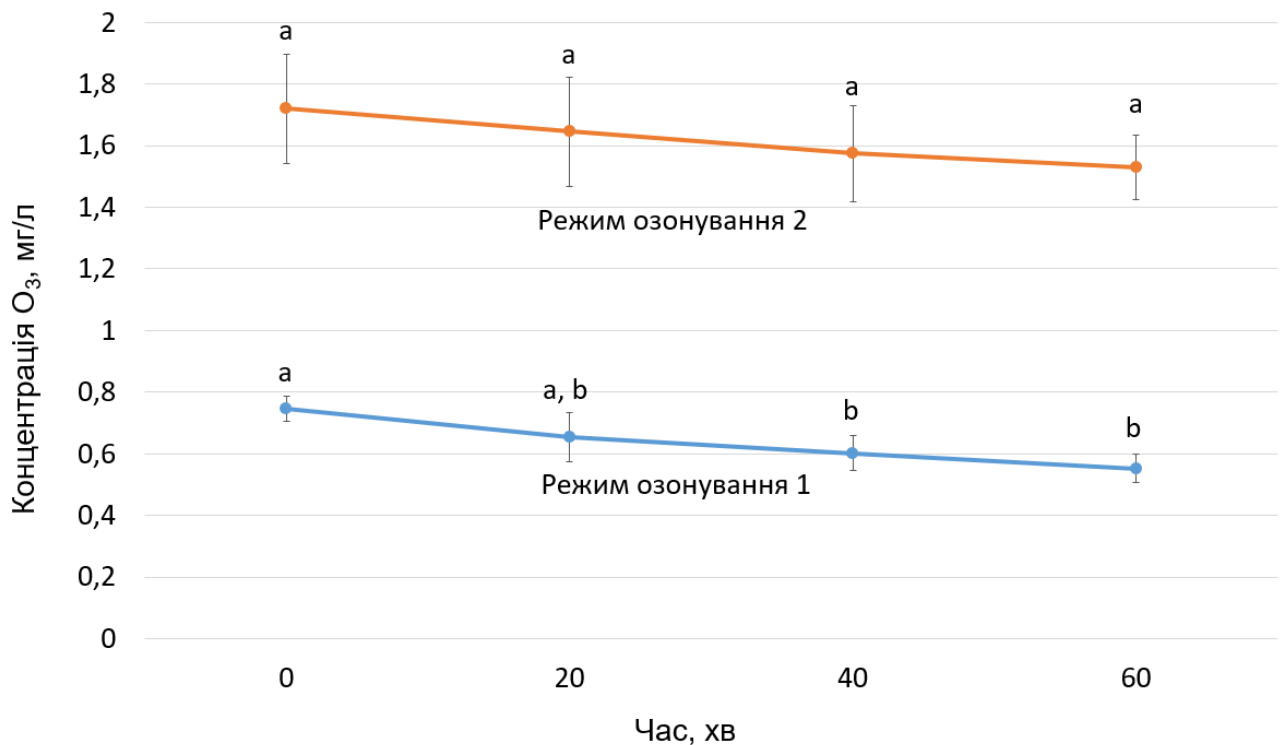


Рис. 6.4. Динаміка концентрації озону у водному розчині після озонування протягом 2 та 5 хвилин. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення, літери над планками представляють значущу різницю ( $p < 0,05$ )

Вимірювання концентрації озону кожні 20 хвилин показали її зниження у кожному наступному зразку. Через годину концентрація озону у воді обробленій протягом 2 хвилин становила ( $0,55 \pm 0,05$ ) мг/л ( $p < 0,05$ ), а у воді обробленій протягом 5 хвилин – ( $1,53 \pm 0,10$ ) мг/л ( $p > 0,05$ ).

Наступні вимірювання концентрації озону показали, що у зразках оброблених режимом 1 він перестає визначатися на 2-3 добу, а режимом 2 – на 4-у (рис. 6.5).

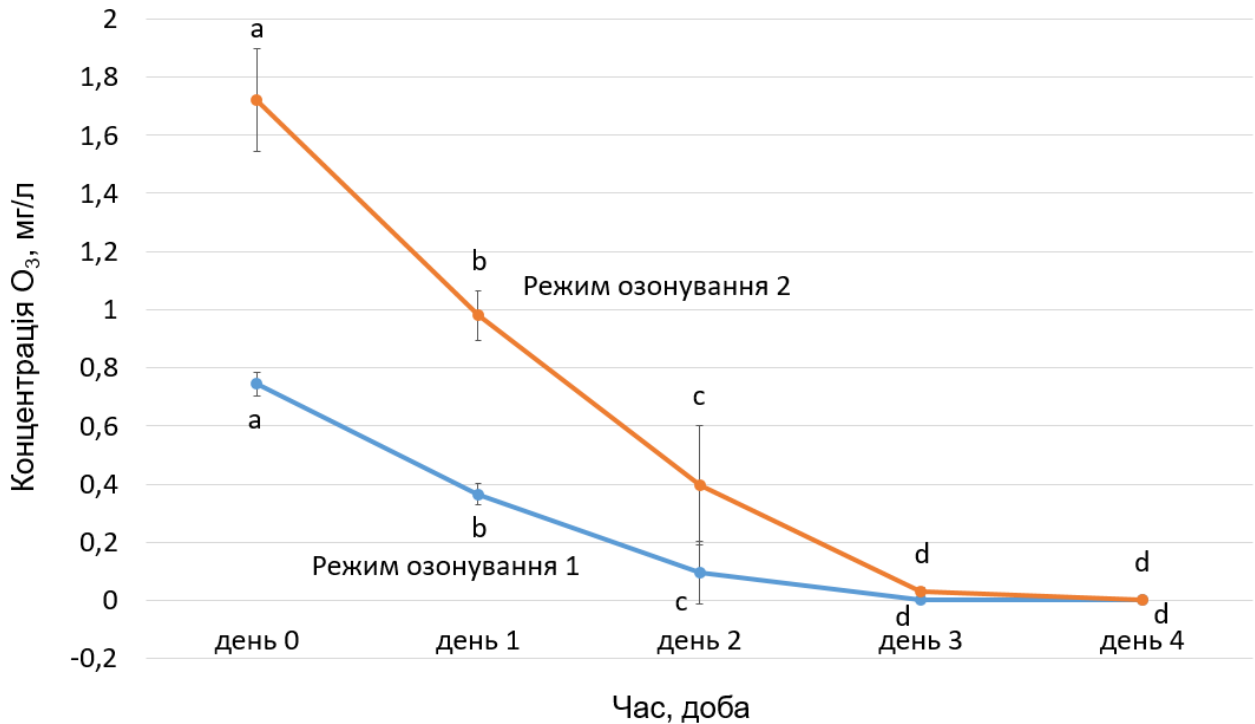


Рис. 6.5. Динаміка концентрації озону у водному розчині після озонування протягом 2 та 5 хвилин. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення, літери біля планок представляють значущу різницю ( $p < 0,05$ )

Після зберігання розчину при кімнатній температурі протягом доби концентрація озону у воді обробленій режимом 1 становила  $(0,37 \pm 0,04)$  мг/л озону, а у зразках оброблених режимом 2 залишалось  $(0,98 \pm 0,08)$  мг/л озону ( $p < 0,05$ ). Через добу концентрація озону знизилася до  $(0,10 \pm 0,10)$  мг/л та  $(0,40 \pm 0,08)$  мг/л ( $p < 0,05$ ) для зразків оброблених режимом 1 та 2 відповідно. Через 3 доби озон у концентрації  $(0,03 \pm 0,01)$  мг/л ( $p < 0,05$ ) визначався лише у зразках оброблених режимом 2. Одночасно з фотометричним аналізом зразки оцінювали органолептично, навіть при низьких концентраціях озону у воді зразки мали специфічний запах озону.

Отримані дані суперечать результатам інших авторів, які вказували, що озон у водному розчині швидко розпадається з утворенням молекулярного кисню, гідроксильних радикалів та короткоживучих активних форм кисню [74,255]. Epelle et al. [29] повідомляли про період напіврозпаду озону отриманого електролітичним

шляхом у питній воді, який становив 10 хвилин при 18 °С. Hirahara et al. [255] спостерігали період напіврозпаду у 39 хвилин для електролітичного озону у дистильованій воді при 20 °С. Varol [256] у своїх дослідженнях озонованої води отриманої методом барботування повідомляв про період напіврозпаду озону у 20 хвилин для озонованої питної, дистильованої води та води для ін'єкцій. Хоча в роботі Seki et al. [257] доведено триваліше зберігання озону у водному розчині, отриманому за нанобульбашковою технологією. У їх дослідженнях комерційно приготована озонована вода втрачала 90 % озону через тиждень при 25 °С, а при температурі 4 °С зберігала 90 % від вихідної концентрації протягом того ж часу. Їхні висновки збігаються з нашими, незважаючи на технічні відмінності в досліджуваних типах озонованої води.

### ***Оцінка видимих та мікробіологічних ознак псування води***

Проведені мікробіологічні дослідження показали, що обробка електролізом достовірно знижує кількість мікроорганізмів у джерельній воді. Загальне мікробне число (ЗМЧ) контрольних зразків становило  $(128,7 \pm 14,5)$  КУО/мл  $((2,11 \pm 0,05) \lg$  КУО/мл). Після обробки озонуванням поодинокі мікроорганізми виявляли лише у зразках оброблених режимом 1 (табл. 6.2).

**Таблиця 6.2.** Кількість мікроорганізмів у воді на початку та вкінці експерименту,  $\lg$  КУО/мл

Час озонування	Кількість мікроорганізмів у джерельній воді	
	на початку експерименту	у кінці експерименту
2 хвилини	$0,61 \pm 0,21$	$1,92 \pm 0,26^*$
5 хвилин	0	0
10 хвилин	0	0
Контроль	$2,11 \pm 0,05$	$2,33 \pm 0,11^*$

Примітка: \* –  $p < 0,01$

Зберігання зразків води протягом одного місяця показало достовірне ( $p < 0,01$ ) зростання кількості мікроорганізмів у контрольних зразках (до  $(2,33 \pm 0,11) \lg$  КУО/мл) та зразках оброблених режимом 1 (з  $(0,61 \pm 0,21) \lg$  КУО/мл до  $(1,92 \pm 0,26) \lg$  КУО/мл). При цьому видимі ознаки псування води виявляли лише у контрольних зразках.

На початку експерименту аналіз кольору показав, що колір дна усіх флаконів відповідає відтінкам сірого, що зумовлювалося відсутністю осаду, прозорістю води та скла, та тінню від самого флакона на білому тлі (рис. 6.6).

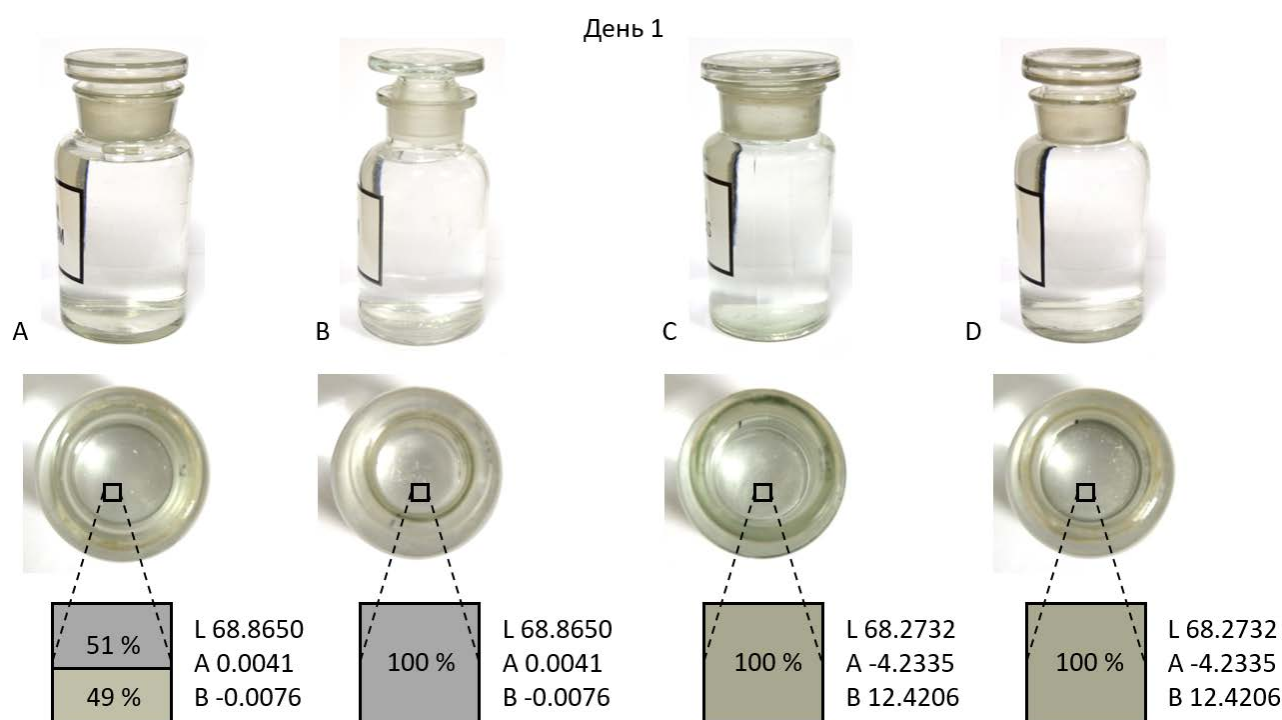


Рисунок 6.6. Аналіз кольору дна флаконів у перший день експерименту. А – необроблений озоном зразок (контроль); В – вода оброблена озонуванням протягом 2 хвилин; С – вода оброблена озонуванням протягом 5 хвилин; D – вода оброблена озонуванням протягом 10 хвилин.

Зберігання зразків води протягом одного місяця продемонструвало видимі зміни тільки у контрольному зразку. Аналіз кольору продемонстрував зміщення параметру  $b^*$  у сторону жовтого спектру, що давало видимий брудно-жовтий колір

осаду на дні. Колір дна оброблених зразків зберігав відтінки сірого подібного до початкових (рис. 6.7).

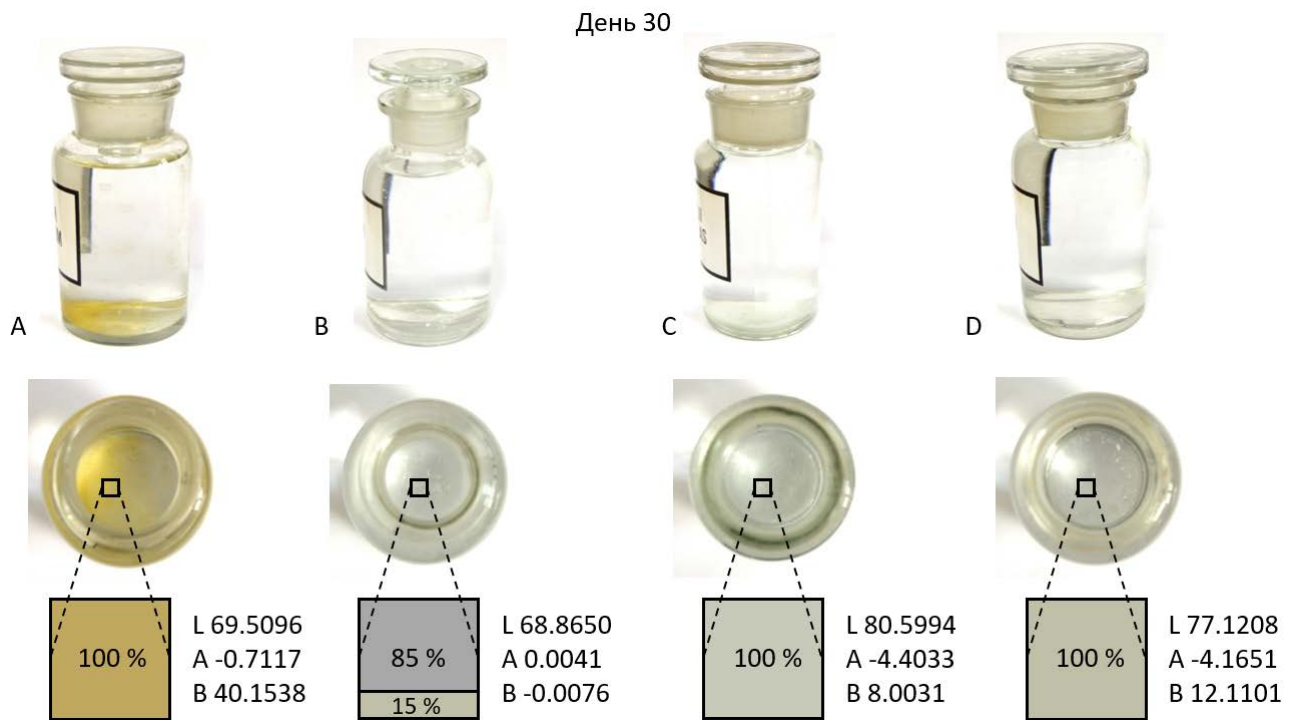


Рисунок 6.7. Аналіз кольору дна флаконів у останній день експерименту. А – необроблений озном зразок (контроль); В – вода оброблена озонуванням протягом 2 хвилин; С – вода оброблена озонуванням протягом 5 хвилин; D – вода оброблена озонуванням протягом 10 хвилин.

Крім того після спорожнення флаконів на стінках контрольних флаконів спостерігали утворення біоплівки (рис. 6.8). Інокуляція матеріалу з цих формувань на поживний агар виявила бактеріальний ріст. У зразках обробленої води біоплівки виявлено не було.

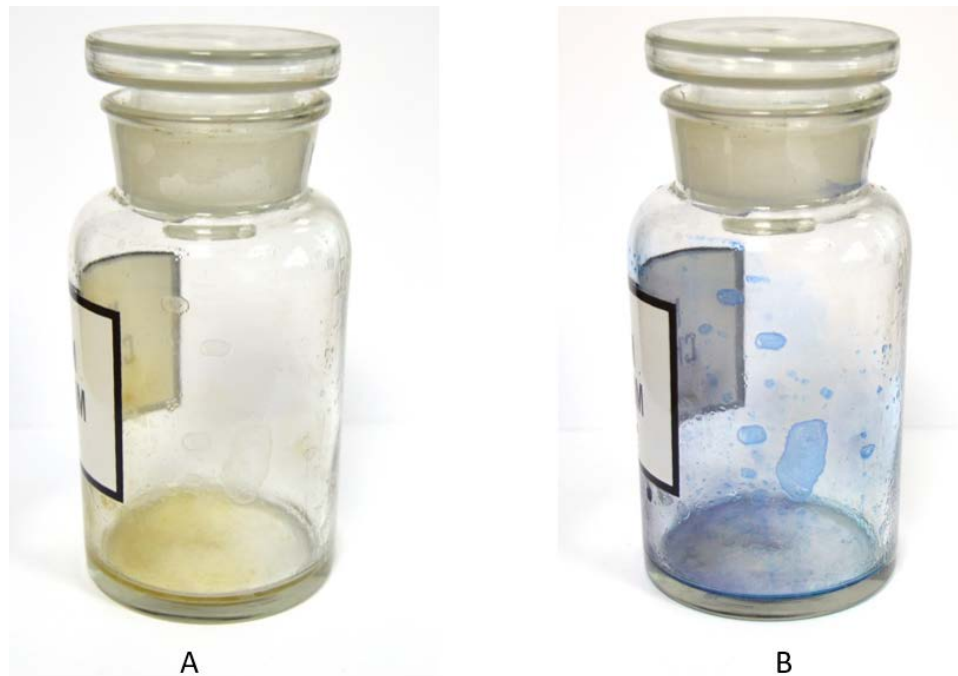


Рисунок 6.8. Біоплівки на стінках флакону. А – після спорожнення флакону; В – після фарбування метиленовим синім.

Інактивація озonom мікроорганізмів у джерельній воді співпадає із результатами Meunier et al. [258], у яких вони продемонстрували інактивацію понад 5 lg КУО вегетативних клітин бактерій. У наших експериментах вода оброблена електролітичним озонуванням тривалістю понад 5 хвилин зберігалася вільною від бактерій протягом одного місяця. Gorito et al. [259] також вивчали можливість попередження відновлення бактерій у воді озонуванням, проте вони використовували більш контаміновану (6 lg КУО/100 мл) річкову воду. За їх результатами 1,5 мг/л протягом 10 хвилин знешкоджували всі мікроорганізми, проте зі зберіганням зразків протягом 3 днів при температурі 37 °С у них виявлялися живі мікроорганізми. Збільшення концентрації озону до 3 мг/л дозволило попередити відновлення мікроорганізмів після обробки та зберігання.

Запобігання утворення біоплівок на поверхнях при використанні озонованої води також спостерігали Marino et al. [30]. Вони повідомляли про інактивацію штамів таких мікроорганізмів, як: *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* та *Listeria monocytogenes* у біоплівках на поверхні неіржавіючої сталі при статичному та динамічному застосуванні озонованої води отриманої

електролітичним способом із концентрацією озону 0,5 мг/л. А Oliver et al. [100] спостерігали ефективну інактивацію *Pseudomonas aeruginosa* у біоплівках на контейнерах для контактних лінз дистильованою водою насиченою озоном.

***Застосування обробки води електролізом у «польових умовах» волонтерами на Півдні України для забезпечення потреб у питній воді.***

Влітку (червень-липень) 2023 року група волонтерів використовувала портативні прилади для електролітичної обробки води у Херсонській області. Вода, яку постачали з Київщини (Бучакський водоносний горизонт), при зберіганні у пластикових пляшках за теплої сонячної погоди, швидко псувалася. Волонтери відмічали зміну кольору (пожовтіння, позеленіння) та неприємний запах. Ці зміни можна пояснити розмноженням ціанобактерій (позеленіння, поява запаху) [260] та природнім підвищенням вмістом заліза у водах Бучакського водоносного горизонту (пожовтіння) [261]. Після застосування обробки електролізом протягом 10 хвилин портативними приладами вода могла зберігатися протягом 2-4 тижнів до повного її використання без видимих ознак псування. За спостереженням волонтерів, вода, яка при зберіганні встигла пожовтіти, відновлювала прозорість, неприємний запах після обробки теж зникав. Слід відмітити, що волонтери не дотримувалися інструкцій від виробника (максимальний разовий об'єм озонування становить 500 мл), а застосовували портативні озонатори у 5-літрових ПЕТ-пляшках перевищуючи рекомендований об'єм у 10 разів (рис. 6.9 – додаток А8). Оброблена озонуванням вода використовувалася волонтерами для пиття, приготування їжі та особистої гігієни.

Спостереження волонтерів стосовно відновлення прозорості пожовтілої води співпадають з дослідженнями Zhang et al. [262], які також описували ефективну деколоризацію води при її озонуванні шляхом барботування газоподібного озону (1,5-3 мг/л). Озонування муніципальних стічних вод проводилося у комплексі з флокуляцією, фільтруванням та обробкою ультрафіолетом. Проте за їх результатами така обробка мала обмежену ефективність для видалення речовин, які спричиняють запах і вони додатково рекомендують застосовувати нанофільтрацію. Ren et al. [263] продемонстрували зменшення запахоформуючих

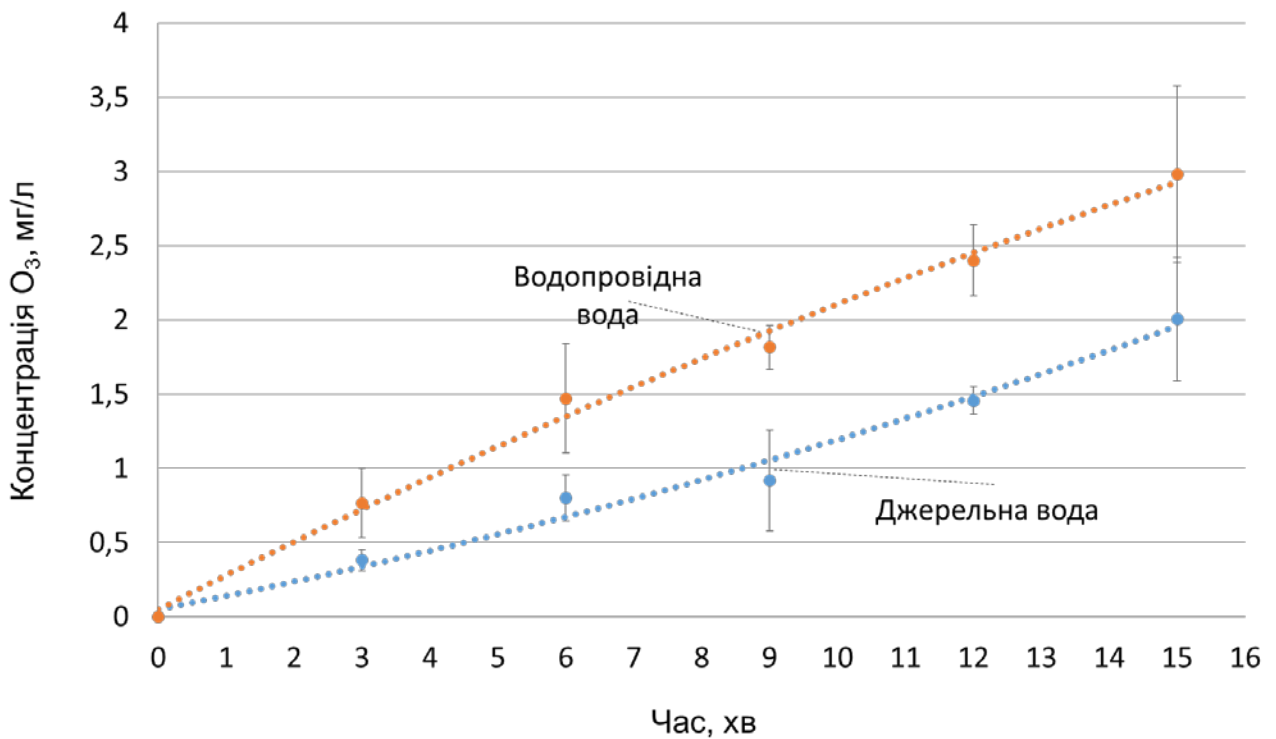
субстанцій (геосмін та 2-метилізоборнеол) у воді відкритих водойм на понад 92 %, використовуючи озонування барботуванням (2 мг/л) у комплексі з фільтрацією крізь гранульоване активоване вугілля. Відновлення прозорості пожовтілої води, описане волонтерами, співпадає із даними Tripathi & Hussain [264], які повідомляли про окислення заліза та марганцю у воді за допомогою озону.

Децентралізоване використання озонування для очищення води у Західній Кенії описали Hendrickson et al. [265]. Автори дослідження використовували сонячні батареї для живлення озонаторів, які стерилізували контаміновані ґрунтові води у ємкості об'ємом 1000 л. Їх установка крім того використовувала методи флокуляції та фільтрації перед озонуванням.

### **6.3 Кінетика електролітичного утворення та розкладання озону у прісній воді: вплив бактеріального забруднення та джерела води**

#### ***Вимірювання концентрації озону у водному розчині при електролізі***

При вимірюванні концентрації озону під час електролізу води було встановлено, що вона поступово зростала протягом 15-хвилинного періоду електролізу як у зразках водопровідної, так і джерельної води. Однак генерація була значно ефективнішою у водопровідній воді, досягаючи ( $2,98 \pm 0,59$ ) мг/л, порівняно з ( $2,00 \pm 0,42$ ) мг/л у джерельній воді ( $p < 0,05$ ). Цю різницю можна пояснити значно вищим ( $p < 0,01$ ) вмістом мінералів у водопровідній воді (мінералізація ( $446,7 \pm 3,5$ ) мг/л порівняно з ( $421,0 \pm 3,6$ ) мг/л). Значення рН двох джерел води були схожими (7,44 проти 7,41). Графік, що ілюструє зростання концентрації озону в обох типах води з часом, представлений на рисунку 6.10.



Рисунк 6.10. Концентрація озону у водопровідній та джерельній воді протягом 15 хвилин електролітичного озонування. Кожна точка представляє середнє значення, планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення.

Вищу ефективність генерації озону, що спостерігається у водопровідній воді порівняно з джерельною водою, можна пояснити її вищою мінералізацією. Оскільки електролітична продукція озону залежить від іонної провідності, більша концентрація розчинених солей у водопровідній воді, ймовірно, посилила процес електролізу, що призвело до більшої концентрації озону у ній. Іншим можливим поясненням нижчої концентрації озону, що спостерігається у джерельній воді, є наявність органічних речовин, включаючи природне мікробне забруднення. Попередні дослідження показали, що необроблена джерельна вода може містити до  $\sim 2,7$  lg КУО/мл мікроорганізмів (розділ 6.1). Озон є високореактивним окислювачем і легко реагує з органічними сполуками, включаючи бактеріальні клітини, позаклітинні полімери та розчинені органічні речовини. Ці реакції не тільки прискорюють розкладання озону, але й можуть знизити ефективність накопичення озону під час процесу його утворення. Навпаки, водопровідна вода, зазвичай очищена та фільтрована, містить менше органічних забруднювачів, що

потенційно дозволяє більшій кількості озону залишатися стабільним та виявлятися під час генерації. Це узгоджується з дослідженнями, які показали, що вища іонна провідність, пов'язана зі збільшенням TDS, може підвищити ефективність електролітичного генерування озону [29,266]. У традиційних системах озонування на основі барботування було показано, що вищий вміст мінералів у воді може прискорити розкладання озону, що призводить до нижчих вимірних концентрацій озону. Автори стверджують, що цей ефект пояснюється каталітичною роллю розчинених іонів та металів, які сприяють розпаду озону за допомогою радикально-опосередкованих механізмів [267].

### ***Вплив присутності мікроорганізмів на розкладання озону у воді***

У чистій воді (контроль) концентрація електролітично згенерованого водного озону поступово спадала протягом 60 хвилин, починаючи з 3,98 мг/л і знижуючись до 3,52 мг/л. При додаванні суспензії *S. aureus* ATCC 6538 початкова концентрація озону була дещо нижчою – 3,88 мг/л і знижувалася швидше, спадаючи до 2,69 мг/л через 60 хвилин (рис. 6.11).

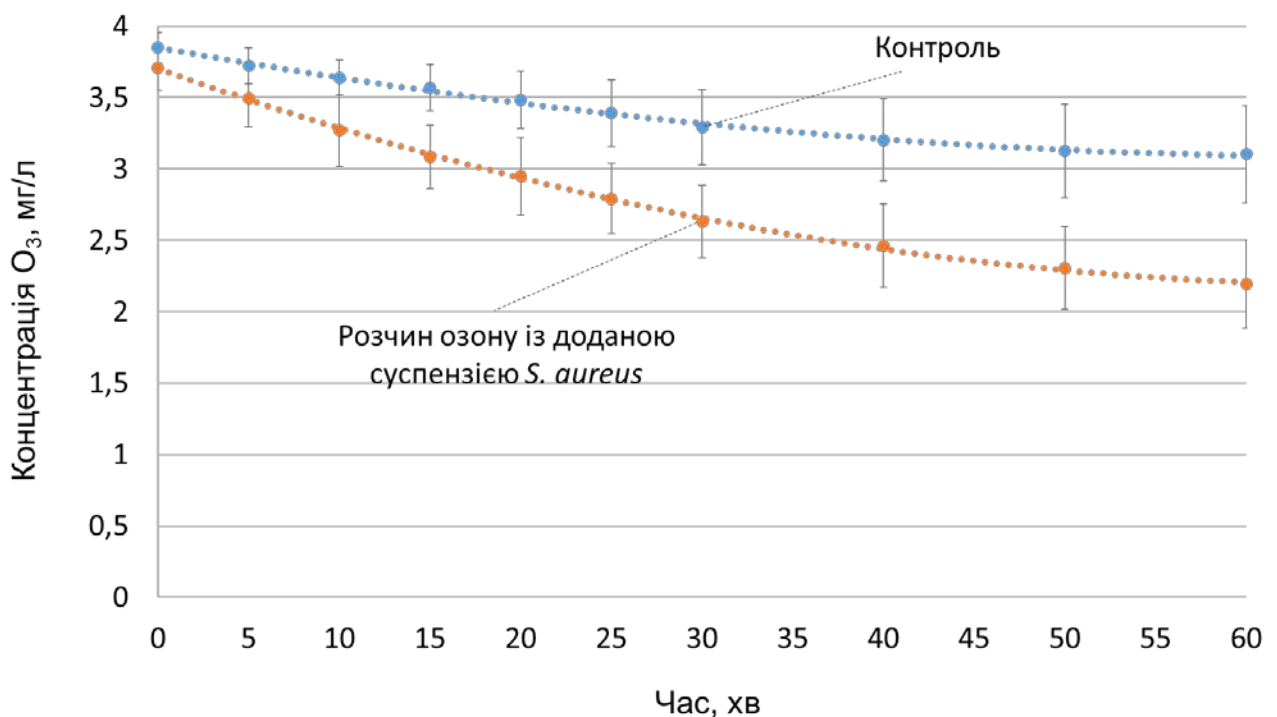


Рисунок 6.11. Швидкість розкладання озону в чистій воді та воді, змішаній з суспензією *S. aureus* ATCC 6538. Кожна точка представляє середнє значення, планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення.

Ефект присутності мікроорганізмів був очевидний вже на початку експерименту: до 5 хвилини концентрація озону в бактеріальній суспензії впала до 3,71 мг/л, порівняно з 3,88 мг/л у чистій воді. Через 20 хвилин різниця між двома зразками збільшилася до 0,62 мг/л, що свідчить про прискорене споживання озону в присутності бактерій. Ця тенденція зберігалася з часом, і найбільша різниця в 0,83 мг/л спостерігалася через 60 хвилин. Ці спостереження узгоджуються з результатами досліджень інших авторів. Наприклад, було показано, що розчинені органічні речовини можуть значно прискорювати розкладання озону у воді, знижуючи його стабільність та ефективність як дезінфікуючого засобу [268–270].

Основні результати, отримані у цьому розділі, опубліковано в наступних роботах автора [7,9,244,271–274].

Оригінали статей доступні за посиланнями:

<https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/zdobutky-eks-med/article/view/14189>

<https://doi.org/10.61751/bmbr/1.2024.43>

<https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/MCC/article/view/15525>

## РОЗДІЛ 7

### Медичне застосування озонованої води

Бойові травми часто проявляються у вигляді інфекцій, стійких до багатьох лікарських засобів, що ускладнюють традиційну терапію антибіотиками та антисептиками. Існує зростаюча потреба в альтернативних, недорогих антимікробних стратегіях, які можуть підтримувати контроль інфекцій в середовищах з обмеженими ресурсами або високим рівнем ризику. Дослідження потенціалу електролітично генерованого водного озону пропонує перспективний шлях для покращення чутливості бактерій та підвищення ефективності стандартних методів лікування. Озон давно відомий своїми антибактеріальними властивостями та широко застосовується в різних галузях промисловості для контролю мікробів. У харчовій промисловості його застосовують для покращення безпеки харчових продуктів шляхом інактивації широкого спектру мікроорганізмів, що викликають псування, та патогенних мікроорганізмів [275]. У секторі оздоровлення відоме його широке застосування в спа- та бальнеотерапевтичних закладах, де він сприяє підтримці гігієнічних умов та зменшенню перехресної контамінації [276].

Незважаючи на ці успішні застосування в немедичних установах, використання озону в клінічному контролі інфекцій залишається обмеженим. Традиційні стратегії в охороні здоров'я здавна спиралися на антибіотики та місцеві антисептики як основні засоби для боротьби з бактеріальними інфекціями. Однак, глобальне зростання кількості стійких до антибіотиків мікроорганізмів серйозно підірвало ефективність цих традиційних методів, що зумовило необхідність дослідження допоміжних або альтернативних антимікробних стратегій [277]. Хоча антисептики є альтернативою антибіотикам, їх використання як самостійного рішення для контролю інфекцій залишається проблематичним через їх цитотоксичну дію на тканини людини, що може погіршити процеси загоєння ран [51]. Це обмежує використання антисептиків там, де регенерація та загоєння тканин є критично важливими.

## 7.1 Синергічний потенціал водного розчину озону: сублетальні пошкодження бактерій та підвищена чутливість до антибіотиків

Загалом було отримано 346 клінічних ізолятів з виділень з ран 284 поранених військових (Тернопільська обласна клінічна лікарня, м. Тернопіль, Україна). До найчастіше виділених збудників серед грамнегативних бактерій належали *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* та *Pseudomonas aeruginosa*, тоді як серед грампозитивних ізолятів переважали *S. aureus*, *Bacillus cereus* та коагулазонегативні *Staphylococcus* spp. (табл. 7.1).

Таблиця 7.1. Мікроорганізми, виділені з ранового вмісту

Мікроорганізм	Кількість
<i>Acinetobacter baumannii</i>	78
<i>Bacillus cereus</i>	28
<i>Enterobacter cloacae</i>	6
<i>Enterococcus</i> spp.	13
<i>Escherichia coli</i>	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	51
<i>Proteus mirabilis</i>	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
<i>Rothia kristinae</i>	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	64
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11
<i>Staphylococcus</i> spp.	13
Інші	21
Усього	346

Під час попереднього тестування на чутливість до антибіотиків за допомогою системи Vitek-2 Compact бактеріальні суспензії готували у 0,45 % розчині NaCl відповідно до протоколів виробника. Під час оцінки чутливості до антибіотиків

мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) необроблених ізолятів були успішно визначені за допомогою системи Vitek-2. Усі 346 виділених штамів продемонстрували множинну резистентність, виявляючи стійкість до трьох або більше класів антибіотиків, що підтверджує складність антимікробної терапії в цих випадках. Для оцінки впливу попередньої обробки водним розчином озону необхідний 0,45 % розчин хлориду натрію піддали електролізу за допомогою портативного генератора озону. Однак хімічний аналіз показав, що процес генерував не тільки озон, але й високі концентрації вільного хлору ( $\geq 30$  мг/л), ще одного потужного окислювача. Цей подвійний окислювальний стрес, ймовірно, порушив бактеріальні мембрани та ферментативні системи. В результаті система Vitek-2 помилково ідентифікувала *Staphylococcus aureus* як *Granulicatella adiacens* та *Erysipelothrix rhusiopathiae* – несподіване, але варте уваги спостереження. Однак, через присутність хлору результати МІК більше не можна було пояснити лише впливом озону. З цієї причини систему Vitek-2 було виключено з подальших випробувань на озонспецифічну чутливість, і замість неї було використано метод дискової дифузії Кірбі-Бауера. Приклад результату, що ілюструє підвищену чутливість *S. aureus* до нітрофурантоїну після попередньої обробки озонованою водою, показаний на рисунку 7.1.

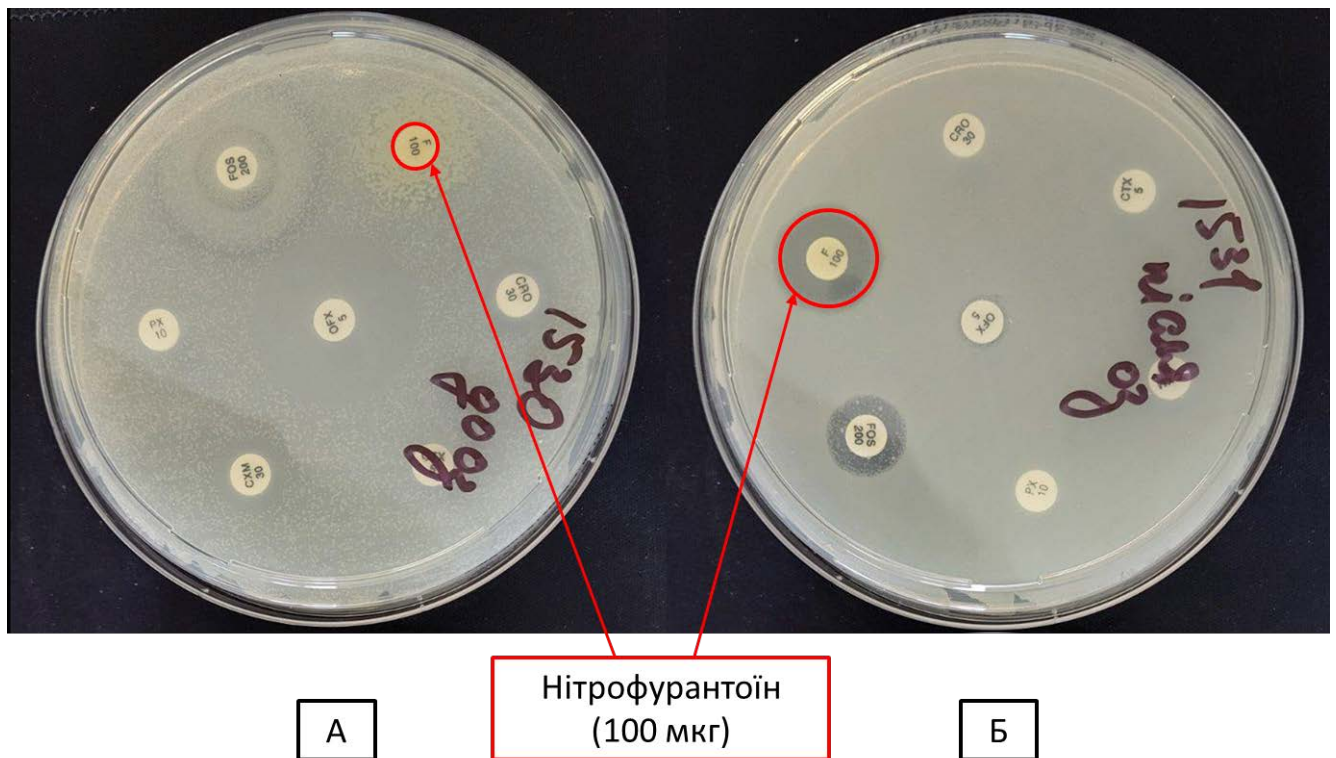


Рисунок 7.1. Результати методу дискової дифузії Кірбі-Бауера, що показують вплив попередньої обробки озонованою водою на чутливість *S. aureus* до антибіотиків. Збільшення чутливості виділено червоним кольором. А – необроблений контроль; Б – після 15-хвилинної попередньої обробки озонованою водою.

Хоча спостережуване збільшення діаметрів зон затримки росту та зменшення кількості антибіотиків, до яких ізоляти виявилися стійкими, свідчать про підвищену чутливість, ці зміни не слід інтерпретувати як постійне зниження стійкості до антибіотиків. Цей ефект точніше пояснюється сублетальним пошкодженням клітин, викликаним оксидативним стресом, який порушує механізми бактеріального захисту та тимчасово підвищує сенсibilізацію клітин до антибіотиків. Це узгоджується з попередніми висновками в харчовій мікробіології, де було показано, що активні форми кисню, такі як озон, викликають бактеріальне пошкодження, яке може бути оборотним за сприятливих умов [278]. Тому водний розчин озону слід розглядати не як самостійне рішення, а як тимчасовий допоміжний засіб, що підвищує ефективність антибіотиків під час гострої фази інфекції.

Ступінь сублетальних пошкоджень, спричинених озонованою водою, було кількісно визначено шляхом порівняння кількості бактерій на селективних та неселективних середовищах для клінічних штамів *S. aureus* та *E. coli*. Для *S. aureus* початкова концентрація становила приблизно 8,9 lg КУО/мл. Після 10 хвилин обробки не було виявлено інактивації на кров'яному агарі, але на жовтково-сольовому агарі спостерігалось зниження концентрації мікроорганізмів на 1,04 lg КУО/мл, що свідчить про те, що 90,97 % клітин, що вижили, були сублетально пошкоджені. Після 15 хвилин обробки на кров'яному агарі було зафіксовано зниження концентрації на 1,65 lg КУО/мл, а також додаткове зниження на 0,96 lg КУО/мл на жовтково-сольовому агарі, що відповідає 89,19 % сублетального ураження серед обробленої популяції (рис. 7.2).

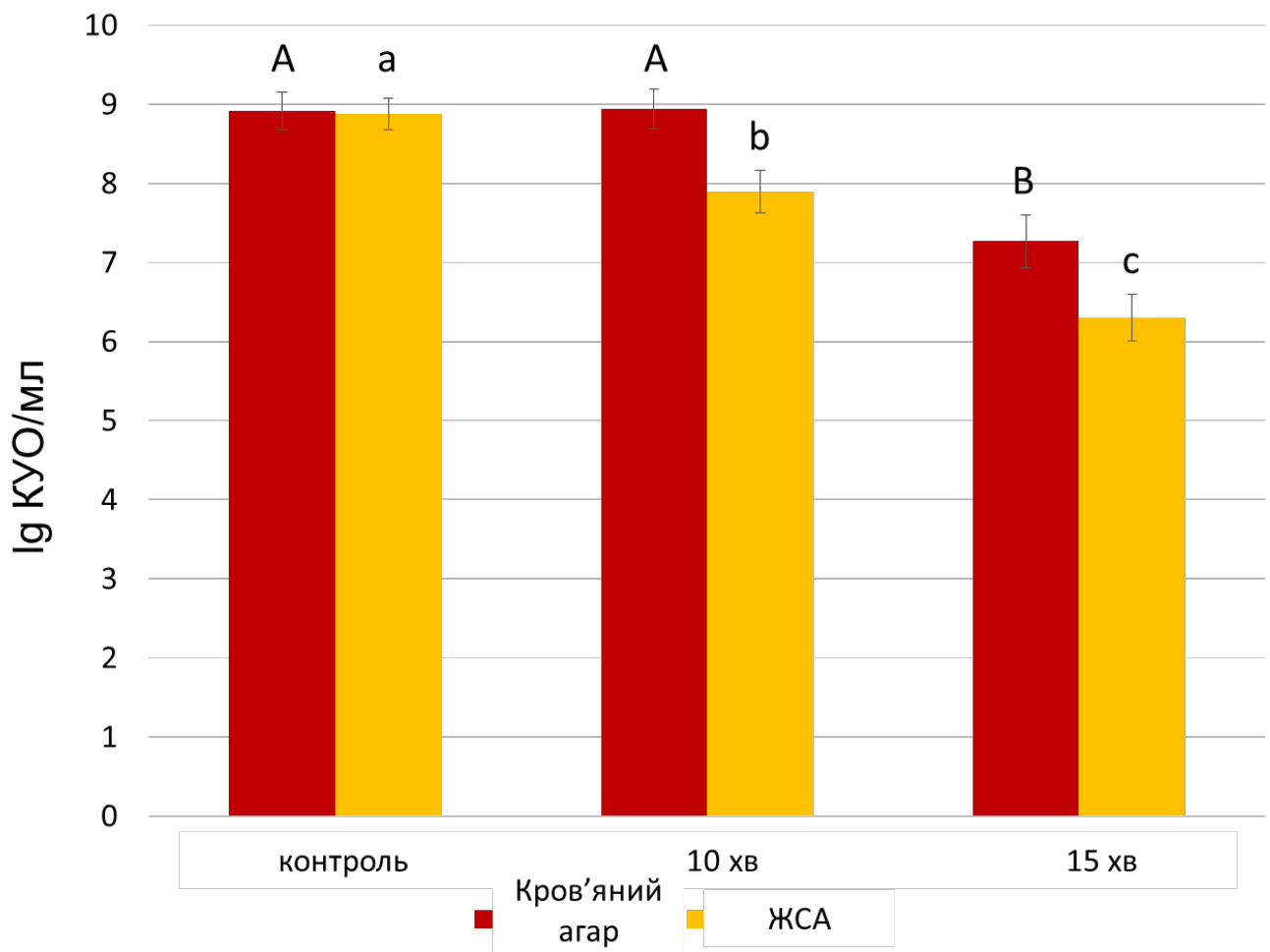


Рисунок 7.2. Вплив електролітично згенерованого водного розчину озону (~4 мг/л) на *S. aureus*. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення.

Для *E. coli* початкова концентрація становила 8,97 lg КУО/мл. Після 10 хвилин озонування спостерігалось зниження концентрації на 0,82 lg КУО/мл на кров'яному агарі, тоді як на агарі MacConkey різниця становила 1,59 lg КУО/мл, що свідчить про сублетально пошкодження 97,44 % популяції. Після 15 хвилин обробки загальна інактивація на кров'яному агарі досягла 2,04 lg КУО/мл, а додаткове зниження концентрації на агарі MacConkey становило 1,77 lg КУО/мл, що становить 98,57 % сублетально пошкоджених клітин (рис. 7.3).

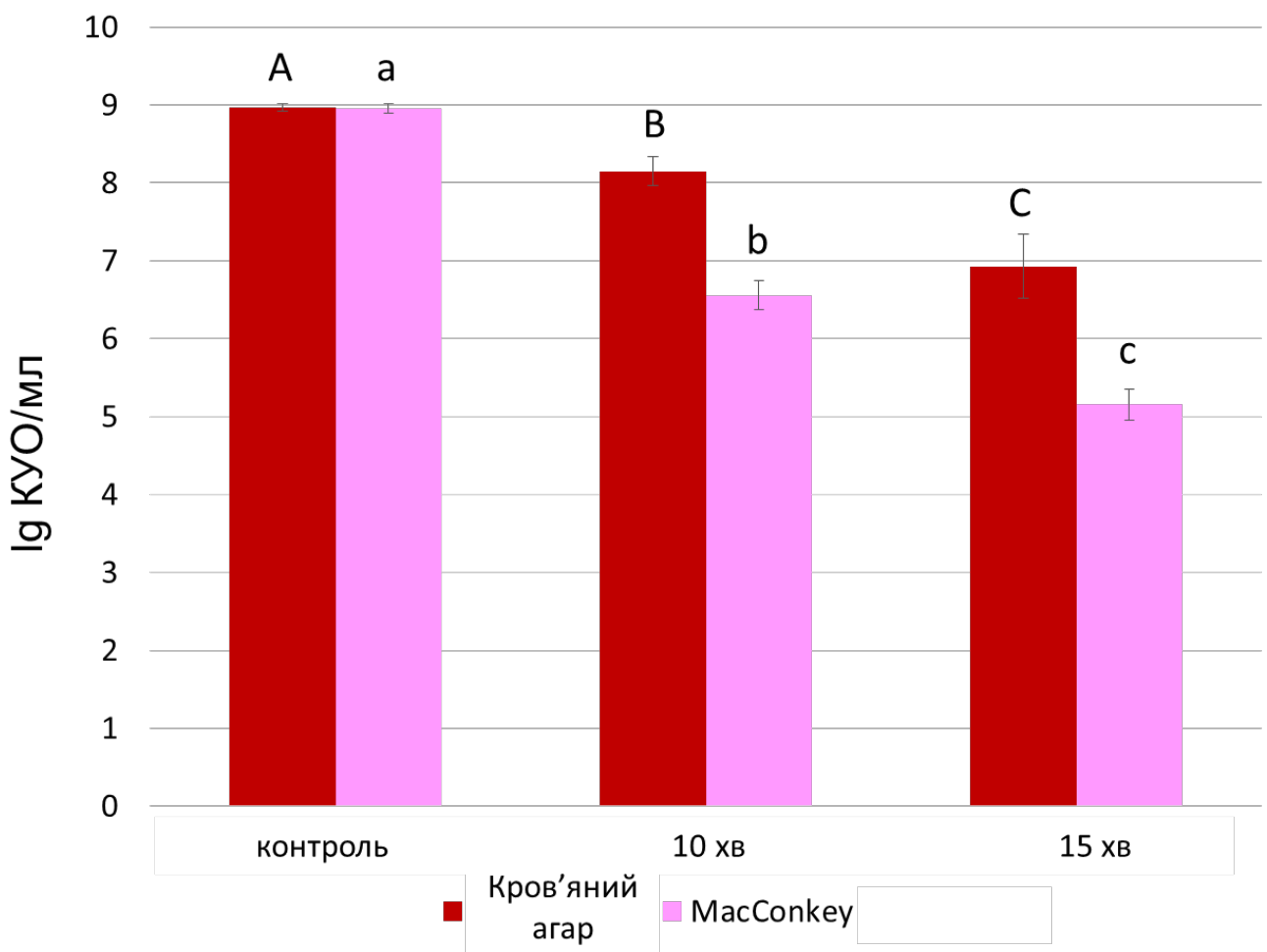


Рисунок 7.3. Вплив електролітично згенерованого водного розчину озону (~4 мг/л) на *E. coli*. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення.

Спостережувані відмінності в рівнях сублетального пошкодження між грам-позитивними та грам-негативними бактеріями узгоджуються з опублікованими раніше даними, які свідчать про те, що грам-негативні бактерії можуть бути більш схильними до окислювального пошкодження, спричиненого озоном. Ця підвищена вразливість грам-негативних бактерій може бути пов'язана зі структурними характеристиками їхньої зовнішньої мембрани, яка містить ліпополісахариди та ненасичені жирні кислоти, особливо схильні до окислювальної дії. Це узгоджується з попередніми висновками, які показують, що активні форми кисню, включаючи озон, завдають значної шкоди бактеріальним мембранам, білкам та ДНК, що зрештою призводить до загибелі клітин або сублетального пошкодження залежно від інтенсивності та тривалості впливу [27]. Це свідчить про те, що хоча деякі бактеріальні клітини пережили обробку озоном, їхня клітинна цілісність та метаболічні функції були порушені, що робило їх більш схильними до додаткових стресових факторів, таких як антибіотики. Це підтверджує ідею про те, що озонована вода може служити доповненням до традиційних антимікробних методів лікування, підвищуючи їхню ефективність проти резистентних патогенів.

## **7.2 Озонована вода як допоміжний засіб при лікуванні поранень, спричинених бойовими діями**

Після госпіталізації до Шведсько-українського медичного центру «Angelholm» (м. Чернівці, Україна) пацієнти з вибуховими травмами (з переломами та без них), опіками та обмороженнями пройшли стандартні процедури лікування, включаючи хірургічну санацію ран, некректомію, стабілізацію перелому за допомогою зовнішньої фіксації та часткове закриття рани стерильною вазеліновою марлею або шкірними трансплантатами, коли це було можливо. У випадках

глибоких або складних ран застосовувалася терапія ран негативним тиском (NPWT) для підтримки дренажу рани та відновлення тканин.

Мікробіологічні дослідження ранового вмісту були проведені для всіх 27 пацієнтів, було виділено 45 чистих культур. У більшості пацієнтів (n = 16) спостерігалася моноінфекція, тоді як у кількох випадках (n = 11) була виявлена змішане інфікування ран, що включало два або три збудники. Серед грамнегативних ізолятів найчастіше виявлявся *Acinetobacter baumannii*, що становив 28,89 % усіх виявлених штамів. *Staphylococcus aureus* був найпоширенішим грампозитивним мікроорганізмом, що становив 20,00 % ізолятів. Повний розподіл збудників представлено в таблиці 7.2. Частина ізольованих штамів продемонструвала мультирезистентність до антибіотиків (n = 42).

Таблиця 7.2. Мікроорганізми, виділені з ранового вмісту

Мікроорганізм	Кількість	Відсоток, %
<i>Acinetobacter baumannii</i>	13	28,89
<i>Bacillus cereus</i>	2	4,45
<i>Candida albicans</i>	1	2,22
<i>Candida glabrata</i>	1	2,22
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	2,22
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	15,56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	13,33
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	2,22
<i>Pseudomonas putida</i>	1	2,22
<i>Staphylococcus aureus ss. aureus</i>	9	20,00
<i>Staphylococcus spp.</i>	3	6,67
Усього	45	100

У рамках протоколу лікування ран, електролітично озонована вода використовувалася для зрошення рани під час кожної зміни пов'язки або під час зміни системи NPWT у випадках глибоких або складних ран. Її застосування під

час зміни NPWT було особливо важливим, оскільки допомагало запобігти розвитку анаеробної мікрофлори в анаеробному середовищі, створеному терапією негативним тиском. На додаток до стандартного зрошення та промивання, у окремих випадках використовували імпульсне промивання високим тиском. Цей метод виявився особливо ефективним для лікування глибоких, вузьких ранових каналів, дозволяючи ретельно деконтамінувати та зменшуючи потребу в тривалому дренажі сліпих раневих мішків.

Через тяжкість та обширний характер бойових ран, а також високий ризик септичних ускладнень, проведення рандомізованого дослідження з плацебо або контрольною групою, що не отримувала лікування, було етично недоцільним. Крім того, мікробна флора у пацієнтів відрізнялася, що ще більше ускладнювало можливість стандартизації умов лікування. З цих причин системну антибіотикотерапію проводили всім пацієнтам відповідно до клінічних рекомендацій та тестування на антибіотикочутливість виділених мікроорганізмів. Озоновану воду використовували виключно як допоміжне лікування, спрямоване на посилення місцевого антимікробного контролю та доповнення системної антибіотикотерапії, а не на її заміну.

Протягом лікування постійно спостерігалось клінічне покращення стану ран. Безперервне застосування озонованої води відіграло сприятливу роль у підтримці чистоти ранового середовища, знижуючи ризик вторинної інфекції та сприяючи формуванню здорової грануляційної тканини. Наявність свіжої грануляційної тканини в оброблених ранах свідчила про сприятливі умови для загоєння.

У пацієнтів, яким була проведена дермопластика, не було зареєстровано жодного випадку відторгнення трансплантата. Трансплантати продемонстрували повну інтеграцію з навколишніми тканинами, що ще раз підтверджує придатність озонованої води як частини режиму догляду за ранами. Після виписки у всіх пацієнтів спостерігалось значне клінічне покращення. Тим, хто мав переломи, було рекомендовано продовжувати амбулаторне спостереження, включаючи

рентгенологічний контроль через місяць після виписки, для моніторингу загоєння кісток та загального відновлення.

Успішне використання озонованої води в лікуванні бойових ран, узгоджується з попередніми дослідженнями інших авторів, що описують її клінічну ефективність при різних станах. Було ефективно поєднано терапію ран негативним тиском з використанням вакуумного закриття з промиванням озонованою водою для лікування виразок діабетичної стопи, досягнувши сприятливих результатів загоєння ран [40]. Аналогічно, повідомлялося про позитивні результати використання промивання озонованою водою в концентрації 10 мг/л у поєднанні з вакуумним дренажем для лікування хронічного остеомієліту [279]. Ці дослідження додатково підтверджують роль озонованої води як цінної допоміжної терапії в лікуванні складних та інфікованих ран. Окрім цього у одному з досліджень вивчалось використання електролітично озонованої води та озонованої олії для лікування складного випадку акне, включивши їх в рутинний догляд за шкірою пацієнтки [280]. Бактерицидний ефект різних форм озону був вивчений у застосуванні газоподібного озону, озонованої води та олії проти мультирезистентних мікроорганізмів виділених із опікових ран. Застосування усіх форм ефективно знешкоджувало метицилінрезистентні штами *S. aureus*, панрезистентні штами *P. aeruginosa* та БЛРС штами *K. pneumoniae* [49].

Основні результати, отримані у цьому розділі, опубліковано в наступних публікаціях автора [280,281,290–293,282–289].

Оригінали статей доступні за посиланнями:

<https://doi.org/10.61751/ijmmr/1.2024.47>

<https://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13256-025-05386-w>

<https://ijmr.com.ua/journals/vol-11-no-1-2025/synergistic-potential-of-aqueous-ozone-sublethal-bacterial-damage-and-enhanced-antibiotic-susceptibility>

<https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/surgery/article/view/15271>

<https://doi.org/10.63341/bmbr/3.2025.46>

## РОЗДІЛ 8

### **Знешкодження мікроорганізмів та бактеріальних спор помірним електричним полем самостійно та у комбінації з обробкою газоподібним озоном**

Інактивація мікроорганізмів і бактеріальних спор є критичною проблемою для різних галузей, включаючи систему охорони здоров'я, фармацевтичну та харчову промисловість [202]. Традиційні методи інактивації мікроорганізмів, такі як термічна обробка та хімічні дезінфікуючі засоби, часто мають обмеження, включаючи потенційне утворення шкідливих побічних продуктів, появу стійких штамів та погіршення якості харчової продукції [294]. Споротворні мікроорганізми, відомі своєю стійкістю до екстремальних умов навколишнього середовища, створюють додаткові труднощі для вищеназваних галузей промисловості, де ефективна інактивація спор має вирішальне значення для забезпечення стерильності [295]. Внаслідок цього зростає інтерес до нетермічних і мінімально інвазивних технологій, які можуть ефективно інактивувати мікроорганізми та їх спори, зберігаючи при цьому властивості оброблених матеріалів.

Обробка помірним електричним полем (ПЕП) – це інноваційна нетермічна технологія, яка використовує електричні поля помірної інтенсивності (зазвичай 1-100 В/см) для руйнування мембран мікробних клітин за допомогою процесу, відомого як електропорація. Цей процес підвищує проникність клітинної мембрани, що призводить до загибелі клітини [149,296]. Обробка газоподібним озоном – інший нетермічний антибактеріальний метод, який використовує сильні окисні властивості озону для інактивації широкого спектру збудників. Здатність озону розкладатися на нешкідливий кисень робить його екологічно чистим дезінфікуючим засобом [26]. Обидва методи можуть інактивувати мікроорганізми без значного нагрівання, таким чином зберігаючи якість термочутливих речовин.

#### **8.1 Інактивація спор *Bacillus subtilis* помірним електричним полем**

### *Інактивація та проростання спор під впливом ПЕП та помірної термічної обробки*

Спочатку оцінювали інактивацію та проростання спор, при самостійній обробці ПЕП (300 В/см) при температурі нижче 30 °С, а також окремих обробках помірним нагріванням зразків (55, 65 і 75 °С). Інактивації спор *B. subtilis* при 55, 65 і 75 °С протягом 20, 40 і 60 хвилин без електричного поля виявлено не було ( $p > 0,05$ ) (рис. 8.1).

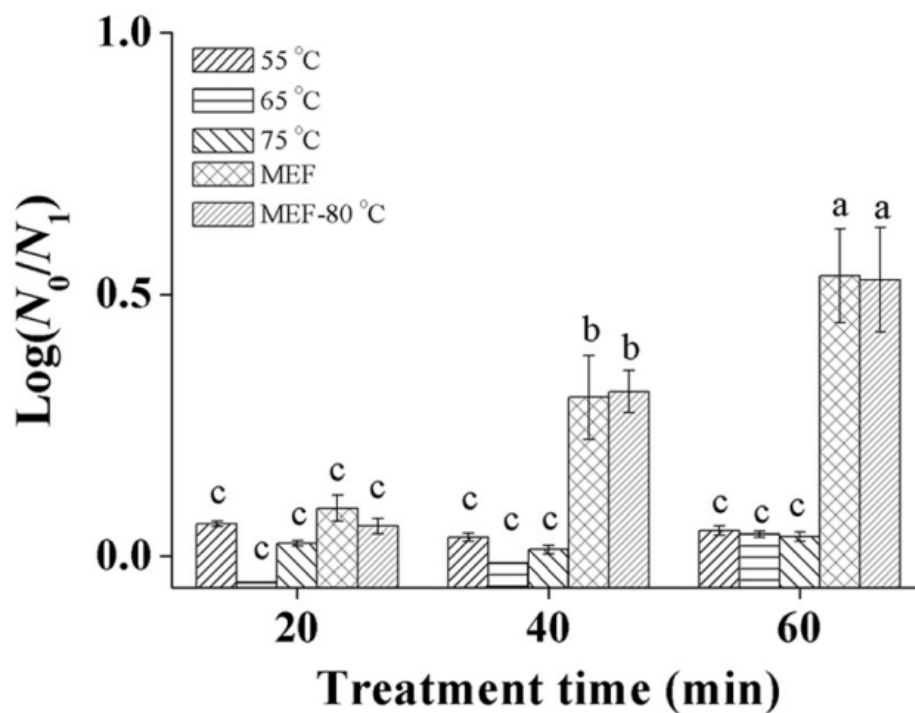


Рис. 8.1. Рівні інактивації спор, оброблених термічно при 55, 65 та 75 °С або ПЕП (< 30 °С) протягом 20, 40 і 60 хвилин, з наступним нагріванням при 80 °С протягом 30 хвилин. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Wang LH, Pyatkovskyy T, Yousef A, Zeng XA, Sastry SK. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation induced by moderate electric fields. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2020 Jun 1;62:102349. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102349>

Загалом спори можуть витримувати приблизно на 40 °C вищу температуру у порівнянні із вегетативними клітинами того ж штаму [297,298]. Крім того, не спостерігалося істотної різниці між подальшими обробками з і без додатковим прогріванням зразків до 80 °C протягом 30 хвилин ( $p > 0,05$ ), що вказує на відсутність проростання спор після обробки при 55, 65 і 75 °C. Спороцидний ефект самостійної обробки ПЕП був незначним, навіть коли її тривалість досягала 60 хвилин. Результатом такої обробки була інактивація близько 0,6 lg КУО/мл спор *B. subtilis* ( $p < 0,05$ ). Однак, навіть такий результат чітко вказує на стійкий нетермічний ефект при такій низькій температурі. Як і при помірній термічній обробці додатковий термічний шок при 80 °C протягом 30 хвилин виявив відсутність або незначне проростання спор ( $p > 0,05$ ) (див. рис. 8.1).

Порівняно з самостійними обробками ПЕП або помірним нагріванням, ефект інактивації спор значно посилювався, коли обробку ПЕП проводили при 55, 65 і 75 °C. Крім того, інактивація спор ПЕП була пов'язана з температурою та часом обробки. Наприклад, коли температура обробки становила 55 °C, приблизно 0,7 lg КУО/мл інактивації спор було отримано після 20 хвилин обробки ПЕП, і спороцидний ефект збільшувався з тривалістю обробки, досягаючи 1,3 та 1,8 lg КУО/мл протягом 40 і 60 хвилин відповідно ( $p < 0,05$ ) (рис. 8.2).

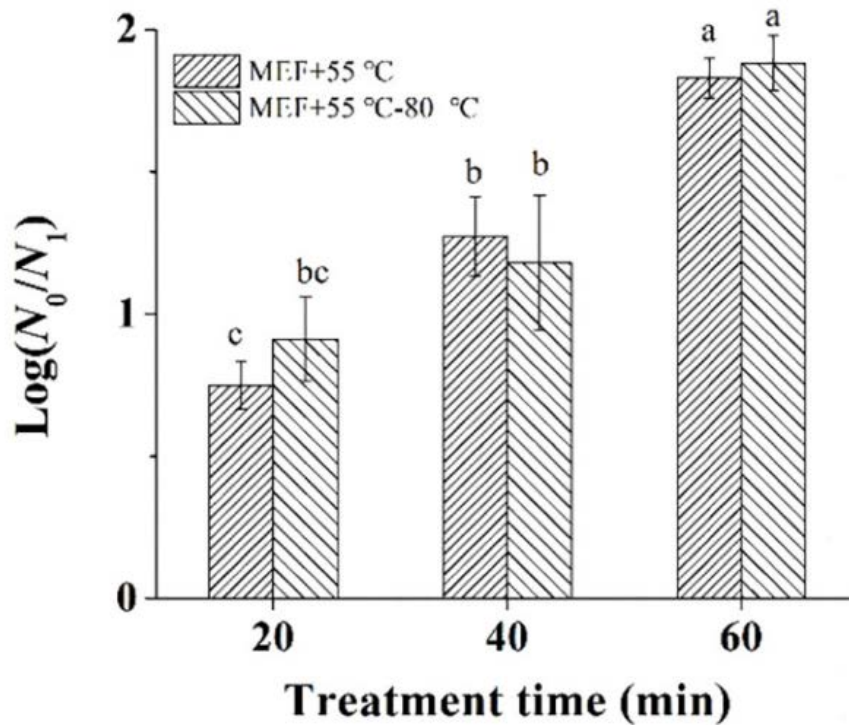


Рис. 8.2. Рівні інактивації спор, оброблених ПЕП при 55 °С протягом 20, 40 і 60 хвилин, а також з наступним нагріванням при 80 °С протягом 30 хвилин. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Wang LH, Pyatkovskyy T, Yousef A, Zeng XA, Sastry SK. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation induced by moderate electric fields. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2020 Jun 1;62:102349. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102349>

Для обробки ПЕП при 65 °С рівень інактивації спор становив 0,8 lg КУО/мл за 20 хвилин, цей показник достовірно ( $p < 0,05$ ) збільшився до 1,4 та 2,0 lg КУО/мл через 40 та 60 хвилин відповідно (рис. 8.3).

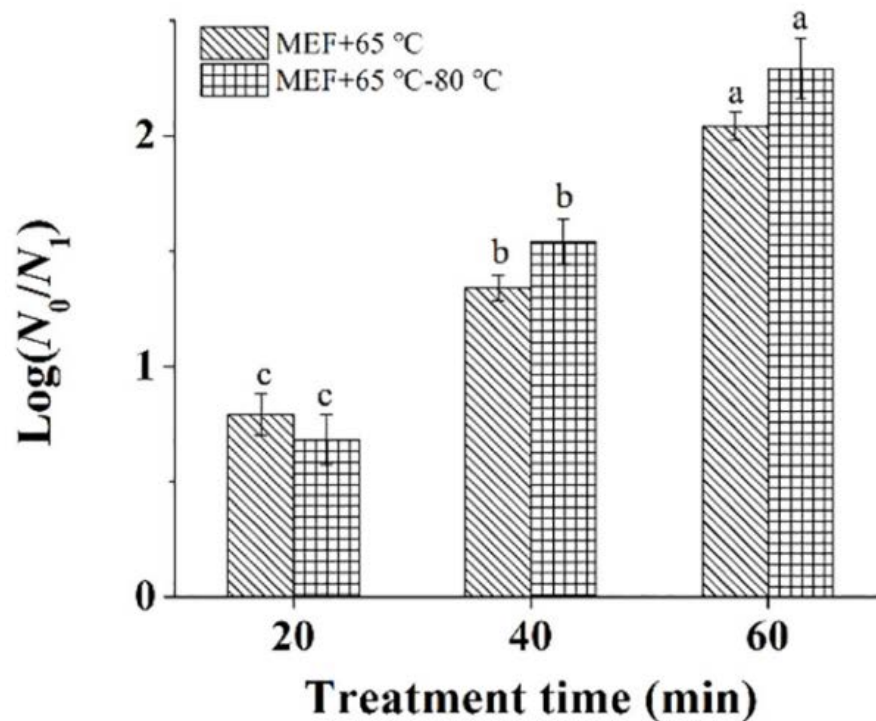


Рис. 8.3. Рівні інактивації спор, оброблених ПЕП при 65 °С протягом 20, 40 і 60 хвилин, а також з наступним нагріванням при 80 °С протягом 30 хвилин. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Wang LH, Pyatkovskyy T, Yousef A, Zeng XA, Sastry SK. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation induced by moderate electric fields. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2020 Jun 1;62:102349. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102349>

Відповідно, більш інтенсивна інактивація спор 0,9, 1,9 і 2,5 lg КУО/мл була отримана при обробці ПЕП при 75 °С протягом 20, 40 і 60 хвилин відповідно (рис. 8.4).

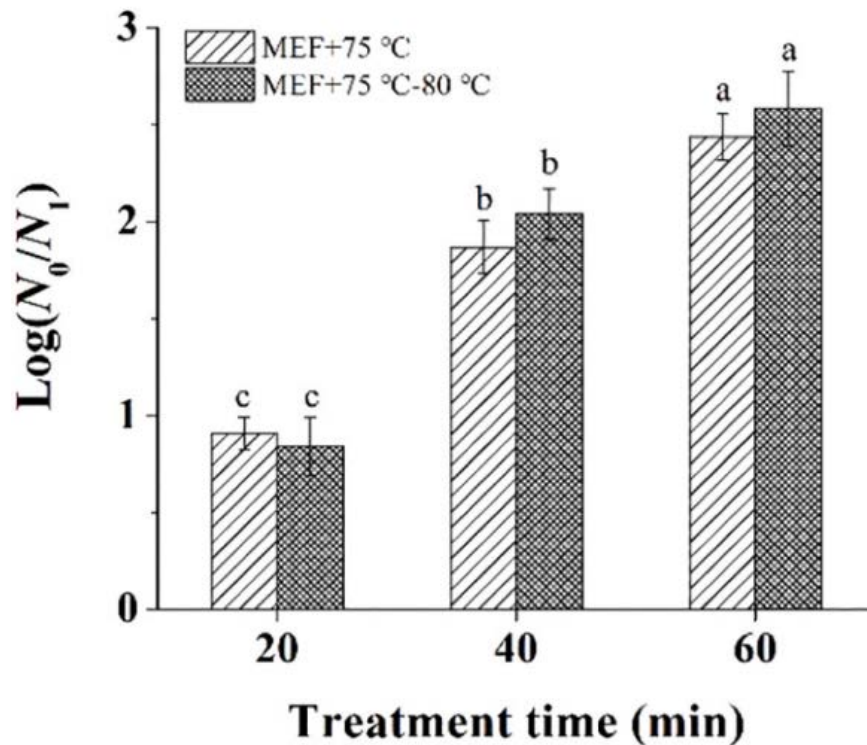


Рис. 8.4. Рівні інактивації спор, оброблених ПЕП при 75 °С протягом 20, 40 і 60 хвилин, а також з наступним нагріванням при 80 °С протягом 30 хвилин. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Wang LH, Pyatkovskyy T, Yousef A, Zeng XA, Sastry SK. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation induced by moderate electric fields. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2020 Jun 1;62:102349. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102349>

З іншого боку, проростання спор при обробці ПЕП було незначним ( $p > 0,05$ ), на що вказує відсутність додаткової інактивації ( $< 0,5 \text{ lg КУО/мл}$ ) після теплового шоку, навіть після обробки ПЕП при 75 °С (див. рис. 8.2, 8.3, 8.4).

### ***Оцінка цілісності цитоплазматичної мембрани за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії***

Підтвердження структурних пошкоджень спор, індукованих обробкою ПЕП, було отримано за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії при використанні флуоресцентних барвників SYTO 9 та йодиду пропідію. Як і

очікувалося, необроблені спори забарвлювалися барвником SYTO 9, демонструючи яскраво-зелену флуоресценцію, що вказувало на цілісність цитоплазматичної мембрани. Вплив ПЕП при 65 °С протягом 20 хв, 40 хв та 60 хв призвів до суттєвої зміни флуоресцентного сигналу від зеленого (інтактні) до червоного/жовтуватого (пошкоджені), що додатково підтвердило, що кортекс та внутрішня мембрана спор поступово пошкоджувалися (рис. 8.5).

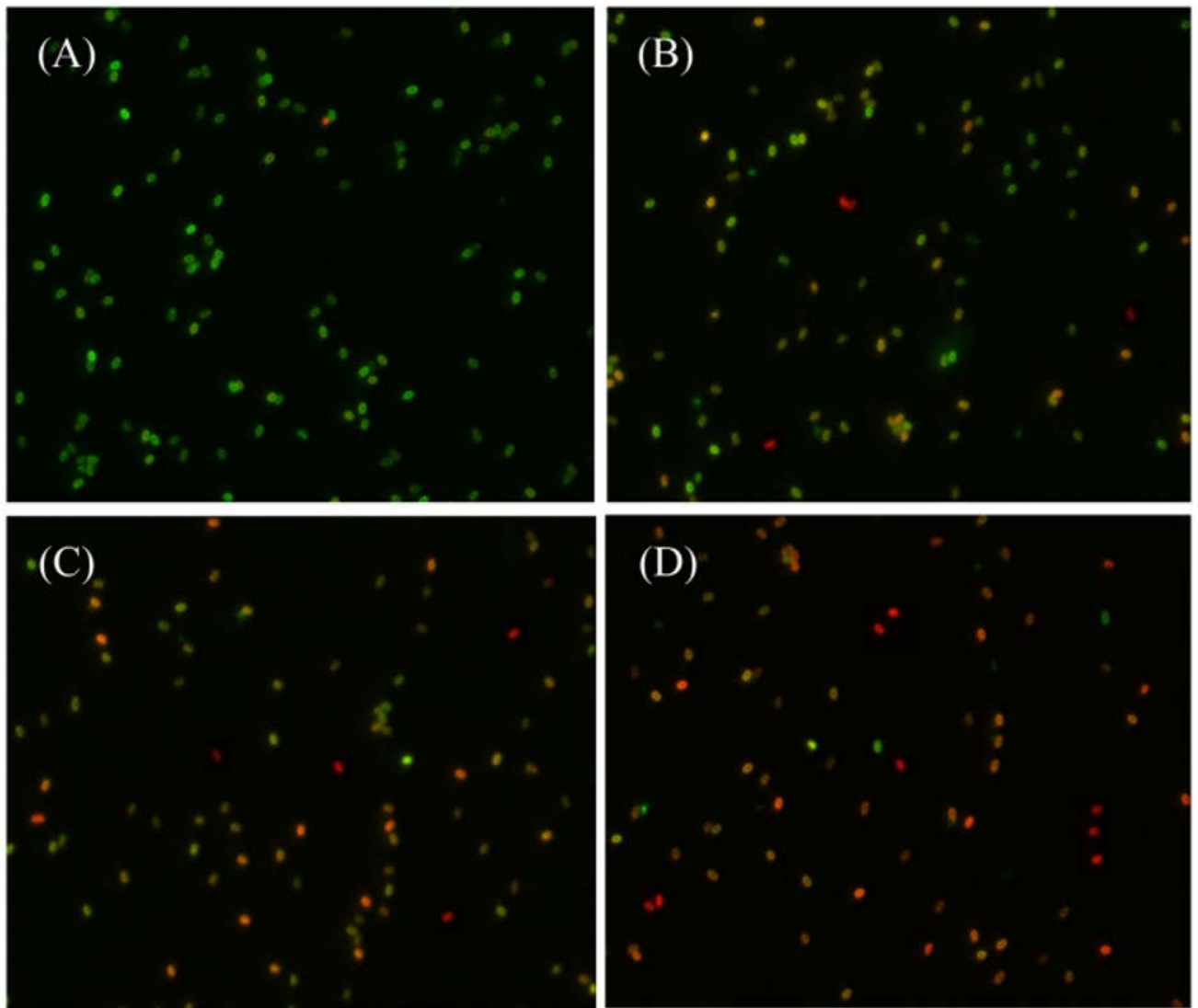


Рис. 8.5. Мікрофотографії спор, оброблених ПЕП при 65 °С (А, контроль, необроблений зразок); (В, обробка протягом 20 хв.); (С, обробка протягом 40 хв.); (D, обробка протягом 60 хв.) після фарбування зеленим флуоресцентним барвником SYTO 9 і червоним флуоресцентним барвником йодидом пропідію. Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія. Рисунок взято з оригінальної статті

автора Wang LH, Pyatkovskyy T, Yousef A, Zeng XA, Sastry SK. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation induced by moderate electric fields. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2020 Jun 1;62:102349. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102349>

У роботах інших авторів повідомлялося що зелений флуоресцент SYTO 9 може проникати в усі спори, як інактивовані так і інтактні, тоді як червоний флуоресцент йодид пропідію проникає лише в спори через пошкоджені структури внутрішньої мембрани, викликаючи зміщення та гасіння флуоресценції SYTO 9 шляхом передачі енергії флуоресценції [299]. Беручи наведені вище результати про проникнення барвників та відсутність додаткової інактивації при додатковій термічній обробці при 80 °С, можна зробити висновок, що обробка ПЕП за помірних температур (від 55 до 75 °С) інактивує спори, безпосередньо пошкоджуючи структури, а не індукуючи їх проростання.

## **8.2 Інактивація *Escherichia coli* K12 помірним електричним полем у комбінації з обробкою газоподібним озоном**

Обробка ПЕП призвела до статистично достовірної більшої інактивації *E. coli* K 12 у сирих яйцях у шкаралупі у порівнянні зі зразками, нагрітим звичайним способом (температура яєць при обох обробках не перевищувала 55 °С), при інокуляції зразків на MacConkey агар, спричинивши в середньому додаткову інактивацію 0,94 lg КУО/г (рис. 8.6).

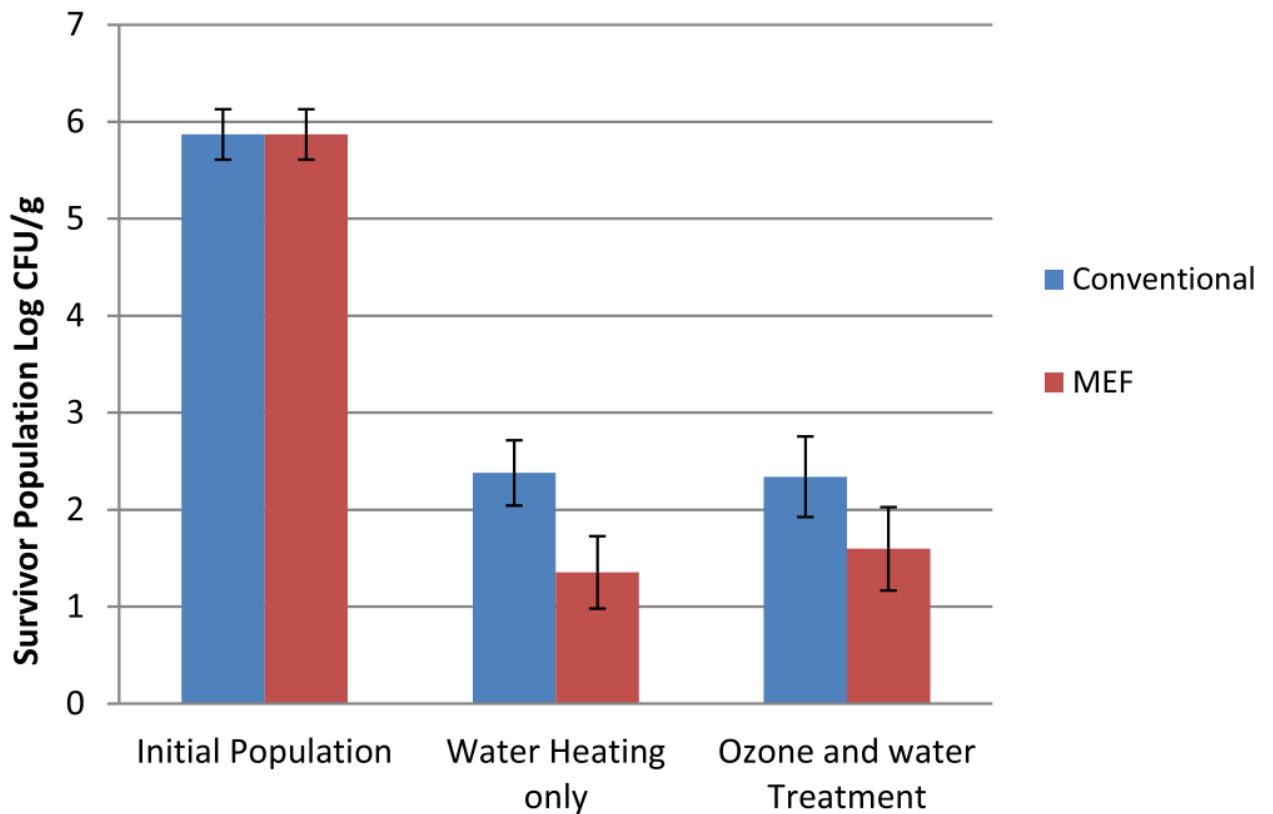


Рис. 8.6. Інактивація *E. coli* К12 ПЕП та термічною обробкою при 55 °С, з обробкою газоподібним озоном і без неї. Інокуляція зразків на MacConkey агар. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Kasler DR, Pyatkovskyy T, Yousef AE, Sastry SK. Effect of moderate electric field pretreatment in combination with ozonation on inactivation of *Escherichia coli* K12 in intact shell eggs. Lwt. 2020 Jun 1;127:109338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109338>

У роботах Perry et al. (2008, 2013) використовували водяну баню з температурою 57 °С із аналогічною тривалістю обробки, яка призвела до інактивації 3,10 lg КУО/г *Salmonella* Enteritidis у сирих яйцях у шкаралупі. Результати цієї роботи показують, що температуру обробки яєць можна знизити майже на 3 °С, що має призвести до значного покращення їх якості [211,300].

Додаткова попередня обробка газоподібним озоном при його концентрації 165 г/м<sup>3</sup> протягом 25 хвилин не призвела до очікуваного збільшення ефективності (див. рис. 8.6). Різниця в інактивації *E. coli* К12 при обробці ПЕП порівняно зі

звичайною термічною обробкою становила 0,74 lg КУО/г. У цьому контексті варто зазначити, що хоча *E. coli* K12 є придатним заміником сальмонел при термічній обробці, їх чутливість до озону може бути різною [301].

При інокуляції оброблених та необроблених серійних розведень зразків на середовище Plate count agar, хоча результат інактивації при обробці ПЕП і був вищим, не було статистично достовірної різниці у порівнянні зі звичайною термічною обробкою на водяній бані (рис. 8.7).

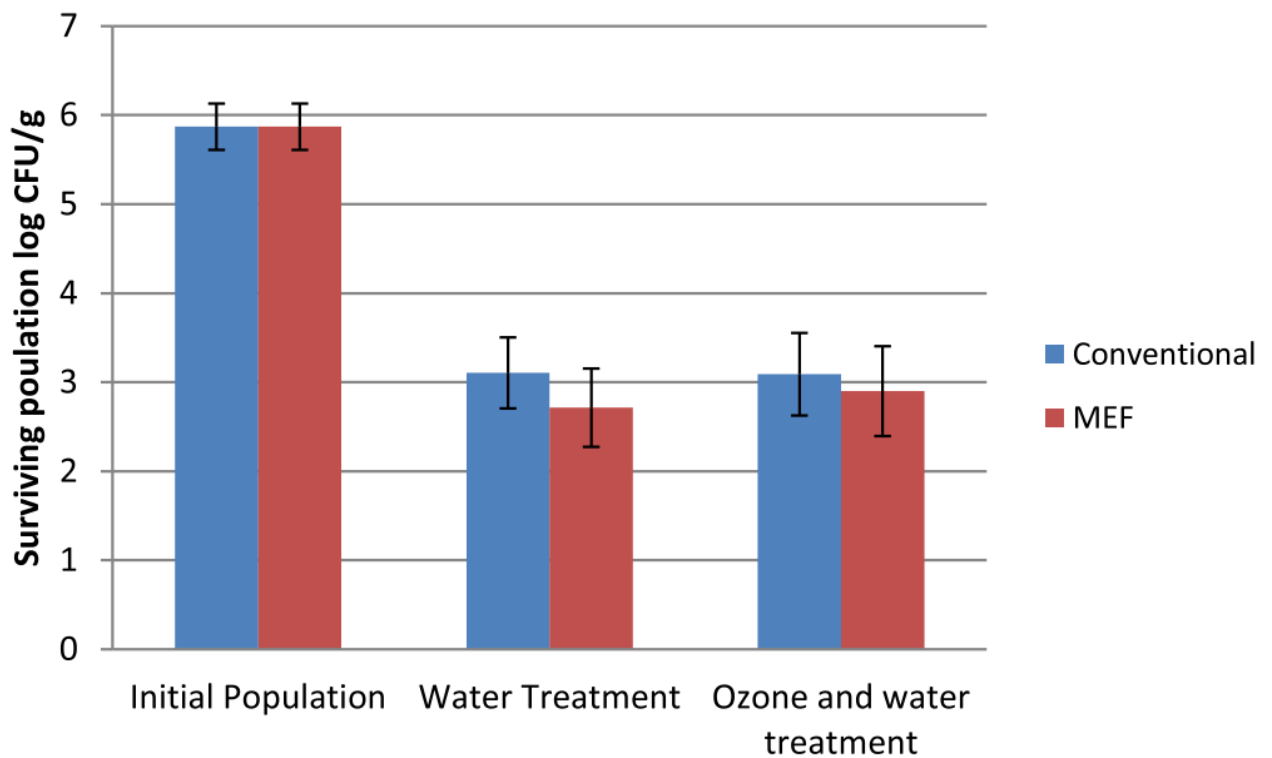


Рис. 8.7. Інактивація *E. coli* K12 ПЕП та термічною обробкою при 55 °С, з обробкою газоподібним озоном і без неї. Інокуляція зразків на Plate count agar. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Kasler DR, Pyatkovskyy T, Yousef AE, Sastry SK. Effect of moderate electric field pretreatment in combination with ozonation on inactivation of *Escherichia coli* K12 in intact shell eggs. Lwt. 2020 Jun 1;127:109338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109338>

Це пояснюється тим, що ПЕП пошкоджує цитоплазматичну мембрану клітин кишкової палички, яка потім відновлюється при посіві на неселективне середовище Plate count agar, тоді як селективне середовище MacConkey агар пригнічує ріст пошкоджених клітин [278]. Оскільки неселективне середовище забезпечує ідеальні умови для росту бактерій можна припустити, що пошкоджені бактеріальні клітини, отримані в результаті обробки ПЕП не виживуть довго в середовищі яйця через наявність у яєчному білку природніх антибактеріальних факторів. Це підтверджується у роботі Gurtler(2009), який показав, що Plate count agar є одним з найкращих середовищ для відновлення *Salmonella* spp., і зазначав, що відновлення сальмонел з яєчних продуктів і, зокрема, яєчних білків є складним через природні протимікробні речовини яєчного білка, які можуть посилити пошкодження бактеріальних клітин під час пастеризації [302].

Основні результати, отримані у цьому розділі, опубліковано в статтях автора [303,304].

Оригінали доступні за посиланнями:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1466856420302952?via%3Dihub>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643820303273?via%3Dihub>

## РОЗДІЛ 9

### **Знешкодження мікроорганізмів та бактеріальних спор високим гідростатичним тиском, ультразвуком, імпульсним електричним полем та їх комбінацією**

Серед нетермічних методів інактивації бактерій є обробка високим гідростатичним тиском, ультразвуком та імпульсним електричним полем, які мають свої унікальні механізми впливу на бактеріальну клітину, що призводять до її пошкодження та інактивації. Обробка високим тиском призводить до денатурації білків та ферментів, а також до пошкодження клітинних мембран [202]. Обробка ультразвуком викликає ефект кавітації у рідинах який у свою чергу створює інтенсивні локальні сили зсуву, які руйнують клітинні стінки і мембрани бактерій [158,305]. Електропорація, викликана імпульсним електричним полем, створює пори в клітинних мембранах, що призводить до підвищення їх проникності та подальшої загибелі клітини [141]. Поєднання цих методів пропонує новий підхід до інактивації мікроорганізмів, використовуючи переваги кожного з методів. Дослідження синергічних ефектів при поєднання цих нетермічних технологій дозволить визначити оптимальні умови для максимальної інактивації мікроорганізмів.

Вимірювання електропровідності в режимі реального часу під час обробки ВГТ може стати потужним інструментом для моніторингу інактивації мікроорганізмів. Цей метод може забезпечити негайну оцінку щодо ефективності процесу та допомогти оптимізувати параметри обробки, що забезпечить надійну інактивацію мікроорганізмів [306].

#### **9.1 Моніторинг знешкодження *Listeria innocua* високим гідростатичним тиском**

##### ***Оцінка впливу стерильної деіонізованої води на *L. innocua****

Оскільки для забезпечення низької початкової електропровідності зразків бактеріальні суспензії готувалися у стерильній деіонізованій воді, було перевірено її вплив на життєздатність *L. innocua* протягом однієї години, що відповідало тривалості експериментів із застосуванням ВГТ. Ресуспендування осаду клітин *L. innocua* в стерильній деіонізованій воді та інкубація протягом 1 години при кімнатній температурі не вплинула на життєздатність клітин. Після підрахунку колоній на середовищі ТСАДЕ не було виявлено достовірної різниці ( $p < 0,05$ ) між кількістю клітин, ресуспендованих у деіонізованій воді та пептонній воді (рис. 9.1).

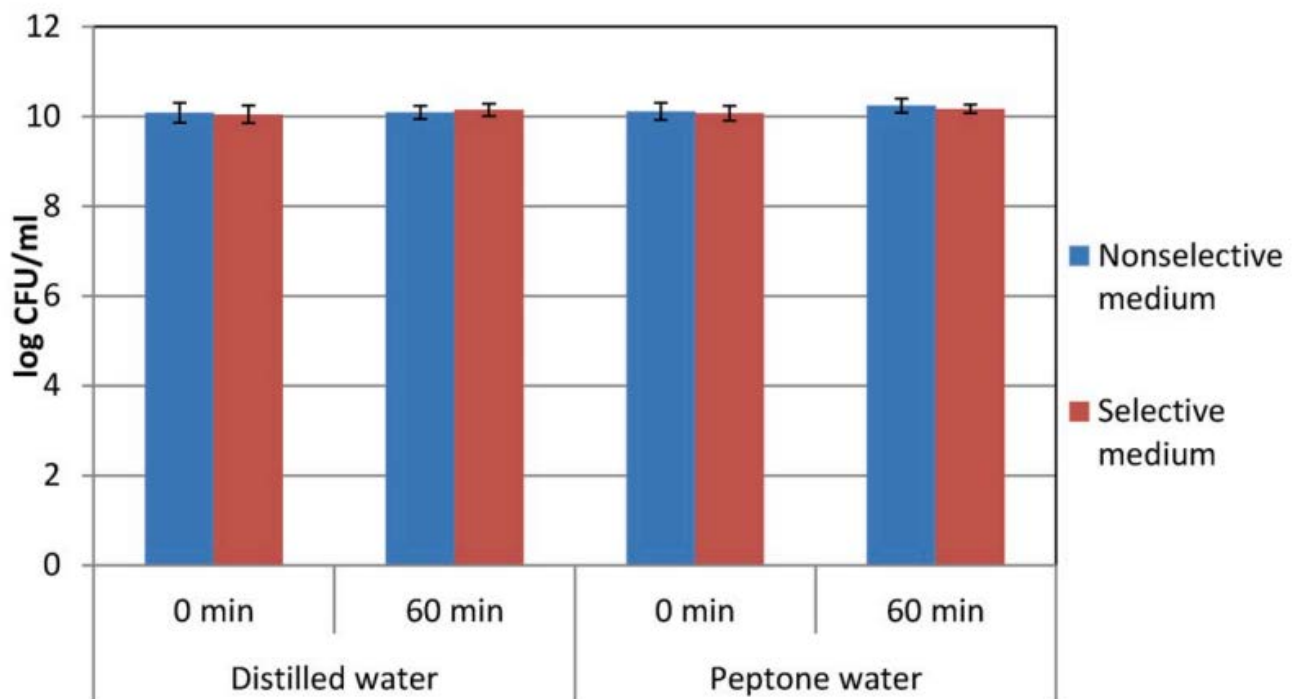


Рис. 9.1. Порівняння популяцій *L. innocua* після ресуспендування бактеріальних клітин у дистильованій воді та пептонній воді протягом 0 хв та 1 год. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy T, Yousef AE, Sastry SK. In-situ monitoring of inactivation of *Listeria innocua* under high hydrostatic pressure using electrical conductivity measurement. Journal of Food Engineering. 2020 Nov 1;285:110087. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110087>.

**Вимірювання електропровідності у суспензії під час обробки ВГТ**

Під час обробки суспензії *L. innocua* ВГТ зростала її електропровідність (рис. 9.2).

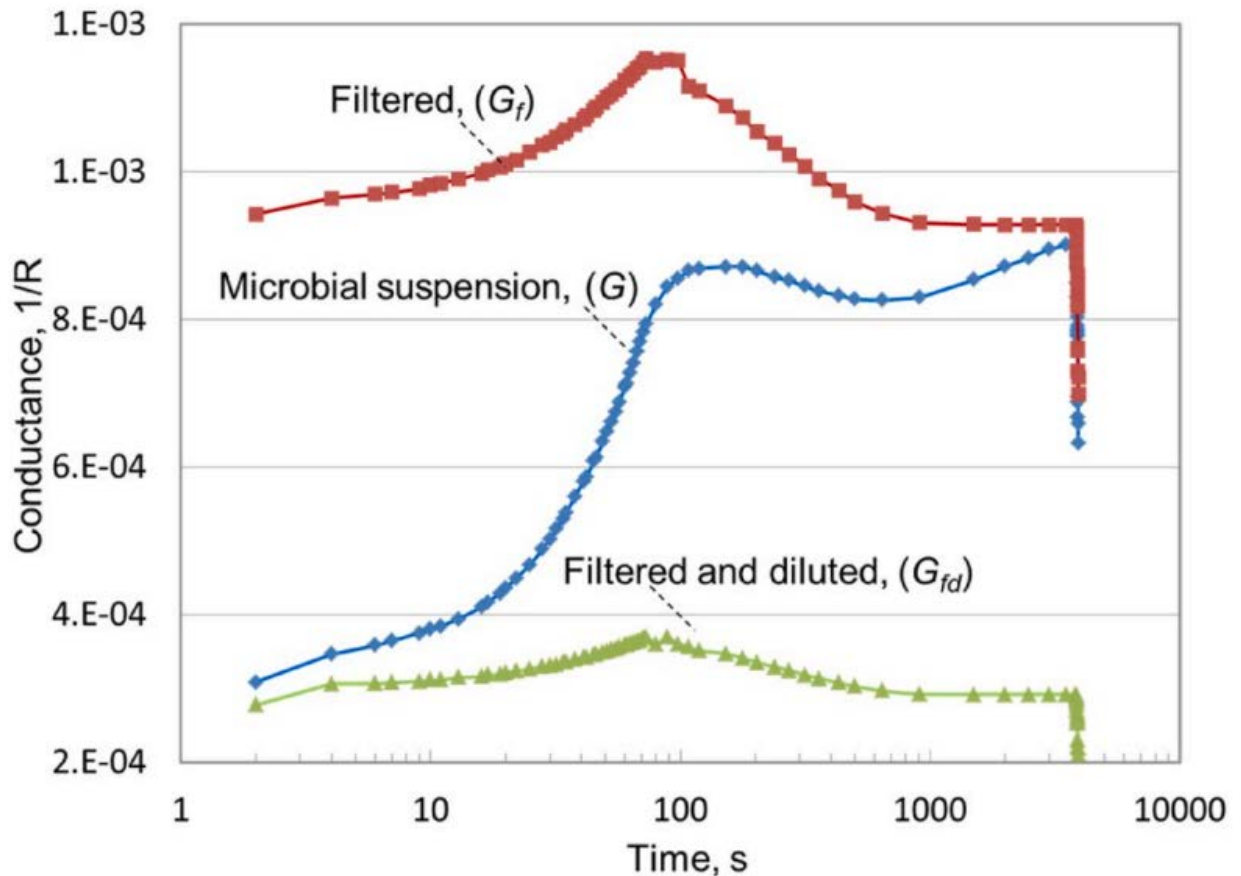


Рис. 9.2. Електропровідність іонних розчинів ( $G_f$ ,  $G_{fd}$ ) та суспензії мікроорганізмів ( $G$ ) під час застосування ВГТ при 500 МПа. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy T, Yousef AE, Sastry SK. In-situ monitoring of inactivation of *Listeria innocua* under high hydrostatic pressure using electrical conductivity measurement. Journal of Food Engineering. 2020 Nov 1;285:110087. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110087>.

Варто відзначити, що електропровідність зростала і досягала свого піку під час етапу підвищення тиску як при обробці клітинної суспензії, так і відфільтрованих електролітних розчинів отриманих після обробки ВГТ. Після цього спостерігалось незначне її зниження, яке пов'язане з охолодженням на початку періоду утримання тиску. Як для відфільтрованих, так і для

відфільтрованих та розведених електролітних розчинів зниження провідності з часом вирівнюється в результаті теплової рівноваги. Однак провідність клітинної суспензії спочатку знизилася через падіння температури, але потім продовжувала зростати протягом періоду утримання тиску через продовження ексудації електролітів з бактеріальних клітин.

На рис. 9.3 показана кількість летально та сублетально пошкоджених клітин *Listeria innocua* порівняно зі збільшенням співвідношення електропровідності суспензії  $\sigma/\sigma_0$  при обробці ВГТ при 300, 400 та 500 МПа та двох періодах витримки 0 та 60 хв.

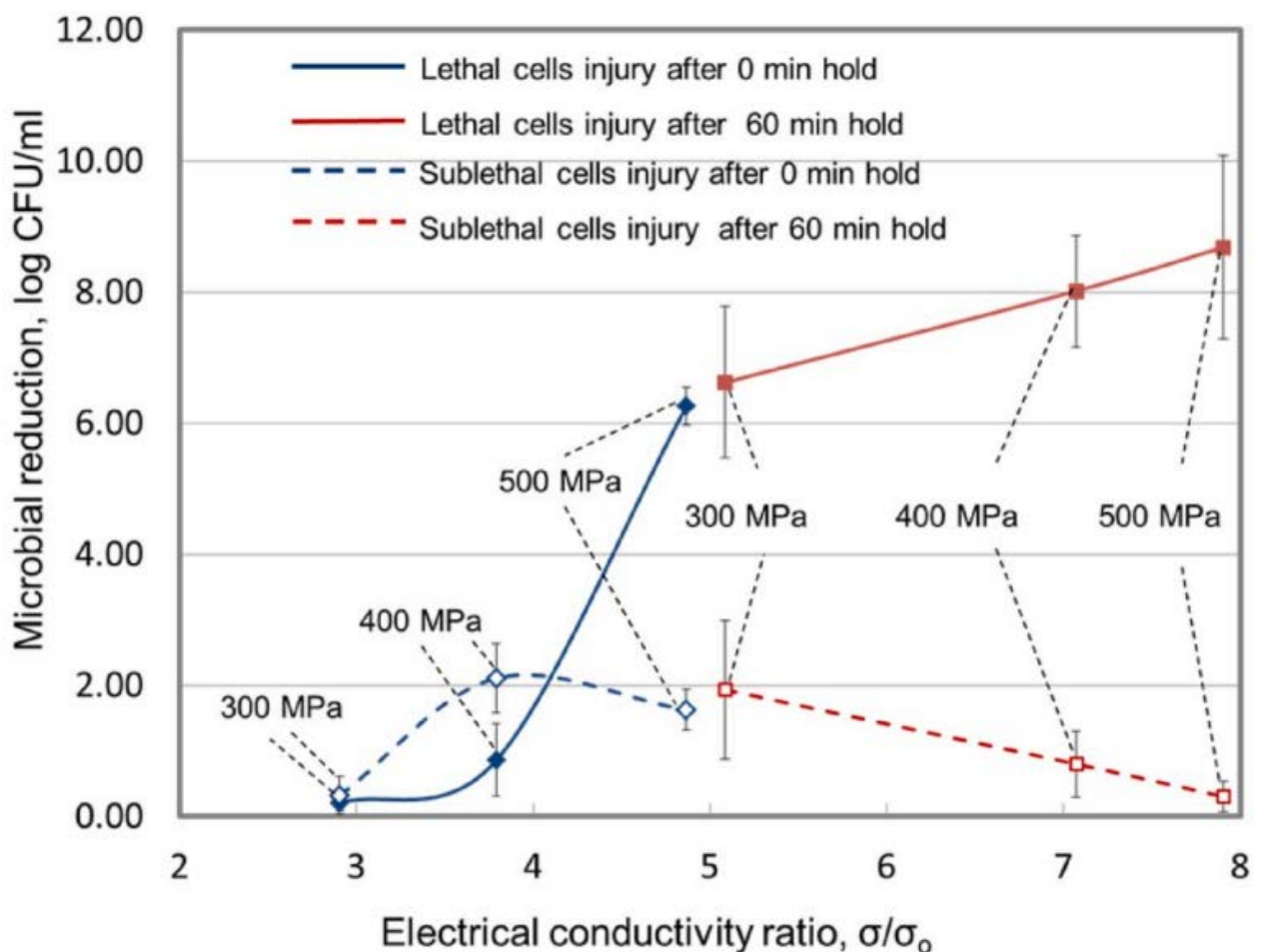


Рис. 9.3. Взаємозв'язок між коефіцієнтом електропровідності суспензії і зниженням кількості мікроорганізмів. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy T, Yousef AE, Sastry SK. In-situ monitoring of inactivation of *Listeria innocua* under

high hydrostatic pressure using electrical conductivity measurement. *Journal of Food Engineering*. 2020 Nov 1;285:110087. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110087>.

Як продемонстрували Kato & Hayashi (1999); San Martin et al. (2002), обробка ВГТ викликає витік внутрішньоклітинних речовин, що, як і очікувалося, спричинили збільшення електропровідності зі збільшенням кількості летально пошкоджених клітин [307,308].

При порівнянні коефіцієнтів електропровідності суспензії ( $F/F_0$ ) під час обробки ВГТ при 300, 400, 500 МПа та при атмосферному тиску (контроль) електропровідність різко зростала під час циклу досягнення цільового тиску і продовжувала повільно збільшуватися протягом періоду витримки (рис. 9.4).

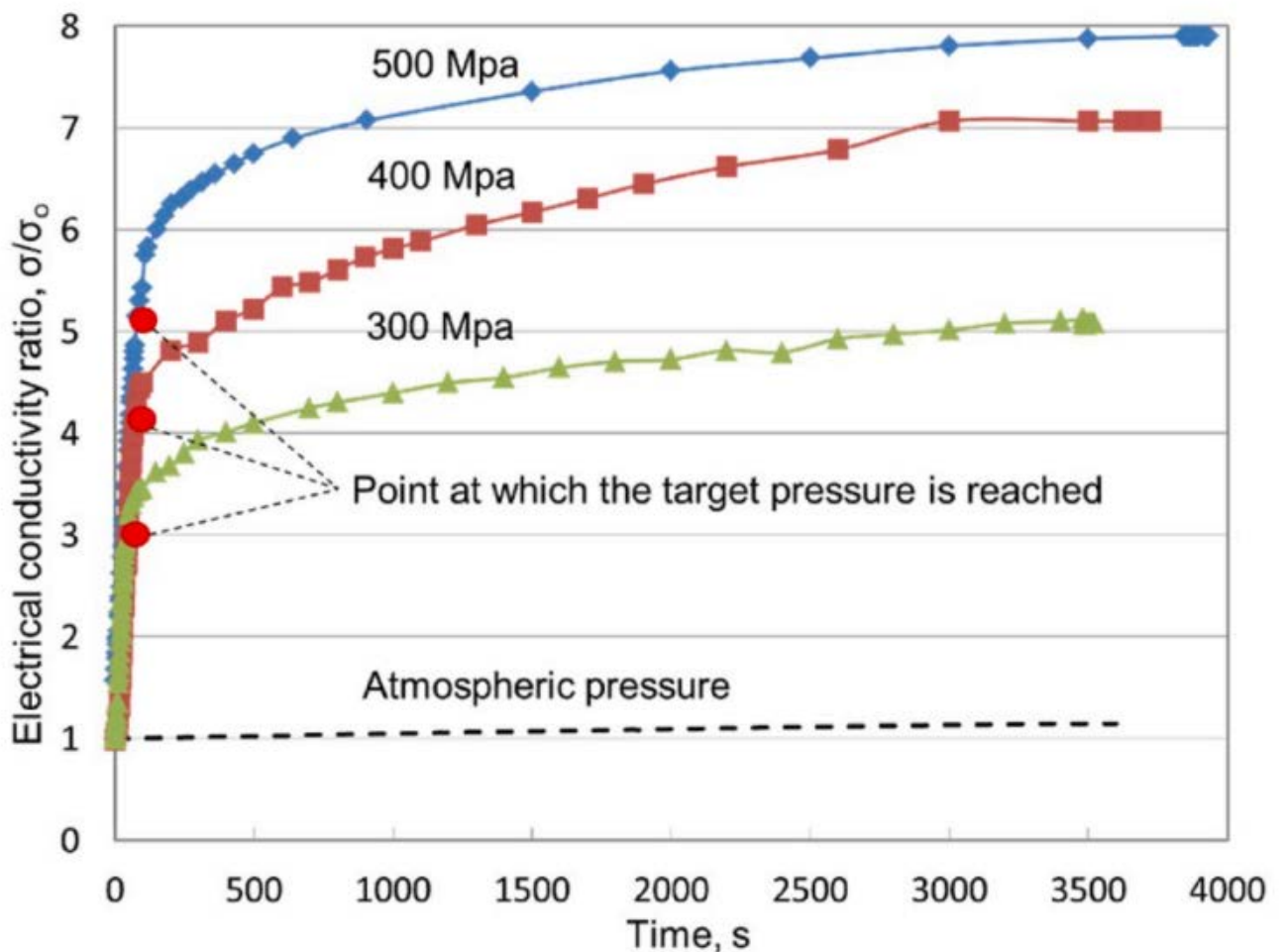


Рис. 9.4. Відносне підвищення електропровідності суспензії при застосуванні ВГТ при 300, 400, 500 МПа та атмосферному тиску. Рисунок взято з оригінальної статті автора Shynkaryk MV, Pyatkovskyy T, Yousef AE, Sastry SK. In-situ monitoring of

inactivation of *Listeria innocua* under high hydrostatic pressure using electrical conductivity measurement. Journal of Food Engineering. 2020 Nov 1;285:110087. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110087>

Коефіцієнт провідності не змінювався під час зниження тиску, що свідчить про те, що під час цієї фази (зниження тиску) майже не відбувалася або взагалі не відбувалася витік електролітів. Збільшення електропровідності в зразку, який витримували при атмосферному тиску не спостерігалось, що вказує на відсутність витоку вмісту клітин цих зразків протягом періоду дослідження. Чим вищим був прикладений тиск, тим була вища кінцева спостережувана провідність.

Отримані результати дають змогу стверджувати про можливість моніторингу інактивації мікроорганізмів під дією ВГТ. На момент обробки результатів та підготовки їх публікації не було джерел літератури, з якими можна було б порівняти наведені вище дані, оскільки, подібні дослідження раніше не проводилися.

## **9.2 Інактивація спор *Bacillus subtilis* високим гідростатичним тиском**

### ***Інактивація та проростання спор під впливом ВГТ***

Порівнювалася інактивація спор *Bacillus subtilis* при багаторазовій обробці високим гідростатичним тиском (БР-ВГТ) з трьома «імпульсами» (час витримки 3 хвилини) із загальним часом обробки 10 хвилин та одноразовою обробкою (ОР-ВГТ) протягом 10 хвилин. Суспензії спор *B. subtilis* піддавали БР-ВГТ та ОР-ВГТ під тиском 200-500 МПа при температурах 40 і 60 ° С. Загалом рівні інактивації після БР-ВГТ (без термічного шоку) були близькими або достовірно вищими ( $p < 0,05$ ) порівняно з рівнями інактивації після ОР-ВГТ (без термічного шоку) (рис. 9.5).

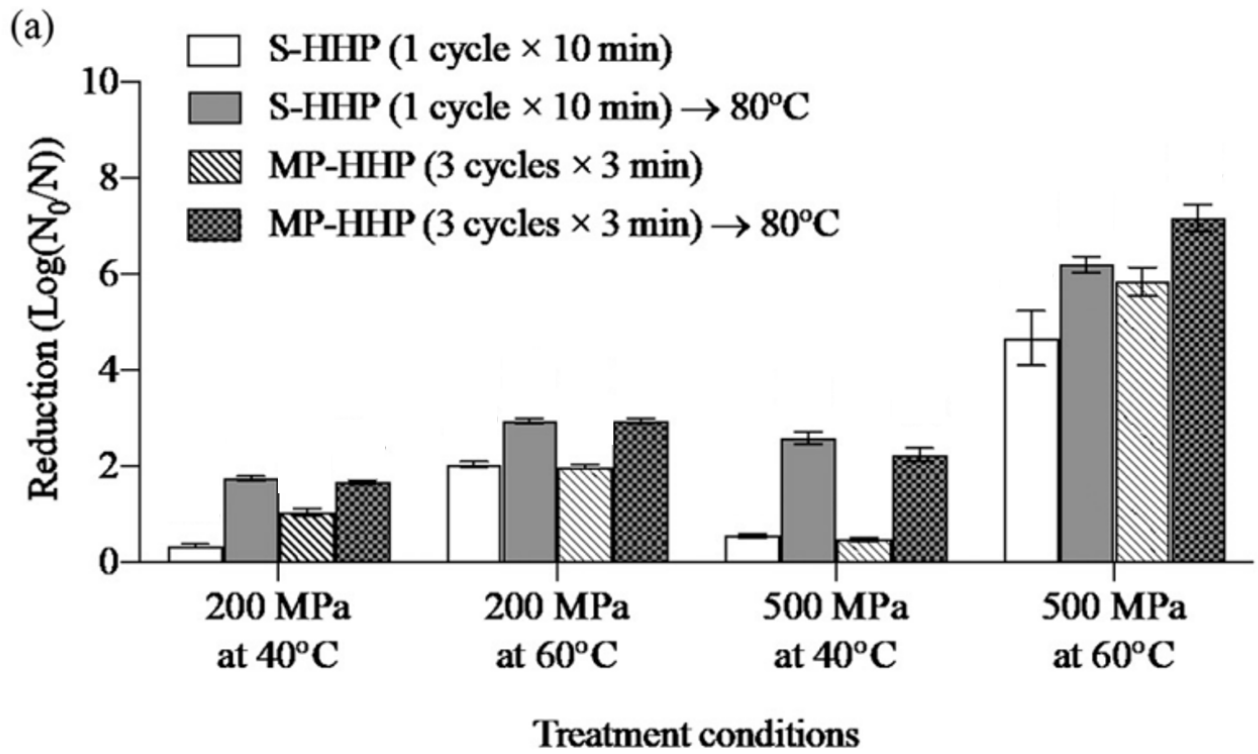


Рис. 9.5. Інактивація спор *B. subtilis* оброблених ОР-ВГТ та БР-ВГТ з та без наступною обробкою тепловим шоком (80 °С протягом 20 хвилин). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Mok JH, Sun Y, Pyatkovskyy T, Hu X, Sastry SK. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore inactivation by single-and multi-pulse high hydrostatic pressure (MP-HHP). Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2022 Oct 1;81:103147. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103147>.

Як і очікувалося, інактивація зростала з тиском і температурою, причому найефективніше знешкодження спор *B. subtilis* відбулося при БР-ВГТ при 500 МПа та 60 °С, яке досягло  $(5,8 \pm 0,3)$  lg КУО/мл, що приблизно на 1,2 lg КУО/мл більше, ніж при ОР-ВГТ. У всіх випадках додаткова термічна обробка (80 °С протягом 20 хвилин) показала значне збільшення показників інактивації порівняно з відповідними БР-ВГТ та ОР-ВГТ без термічного шоку, що вказує на значне проростання в усіх випадках, без істотних відмінностей між БР-ВГТ та ОР-ВГТ. Це свідчить про те, що хоча обробка БР-ВГТ загалом є більш ефективною щодо

інактивації, ніж ОР-ВГТ, цей ефект не є наслідком відмінностей у популяціях пророслих спор.

Вплив тиску на проростання спор, узгоджується з даними Doona et al. (2014), які зазначали, що активація проростання може відбуватися при тиску до 150 МПа шляхом активації рецепторів проростання, тоді як тиск 550 МПа та вище стимулює проростання незалежно від рецепторів проростання [309].

### ***Оцінка цілісності цитоплазматичної мембрани за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії***

Оброблені БР-ВГТ та ОР-ВГТ, а також необроблені спори досліджували за допомогою флуоресцентної мікроскопії після фарбування флуоресцентними барвниками для нуклеїнових кислот (пропідію йодид та SYTO 9). Пропідію йодид проникає лише в загиблі або пошкоджені клітини або спори та зв'язується з ДНК, випромінюючи червоний колір, тоді як SYTO 9 дифундує через непошкоджені мембрани та зв'язується з клітинною ДНК, випромінюючи зелений колір. Необроблені спори (як негативний контроль) забарвлювалися лише SYTO 9, що вказує на життєздатність спор і цілісність їхньої мембрани. При обробці БР-ВГТ більшість спор забарвлювалися йодидом пропідію і майже не сприймали SYTO 9. Усі зразки, оброблені ВГТ при 60 °С, показали більшу кількість мертвих (червоні) або нежиттєздатних (оранжеві) спор порівняно з тими, що були оброблені при 40 °С незалежно від режимів ВГТ (рис. 9.6).

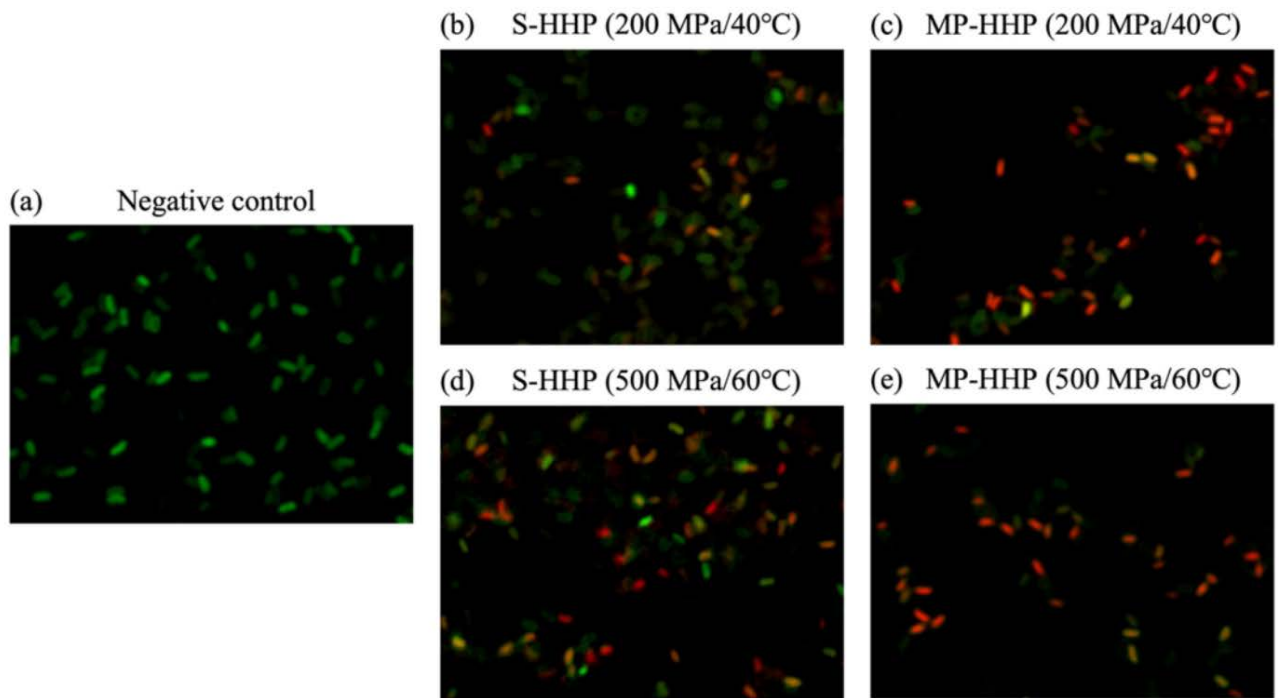


Рис. 9.6. Мікрофотографії спор *B. subtilis* після фарбування флуоресцентними барвниками для нуклеїнових кислот (SYTO 9 – зелений, пропідію йодид – червоний); (a) необроблені ВГТ, (b) після ОР-ВГТ при 200 МПа та 40 °С, (c) після БР-ВГТ при 200 МПа та 40 °С, (d) після ОР-ВГТ при 500 МПа та 60 °С, (e) після БР-ВГТ при 500 МПа та 60 °С. Рисунок взято з оригінальної статті автора Mok JH, Sun Y, Pyatkovskyy T, Hu X, Sastry SK. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore inactivation by single-and multi-pulse high hydrostatic pressure (MP-HHP). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2022 Oct 1;81:103147. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103147>.

Оранжеві спори були визначені як нежиттєздатні на основі робіт Laflamme, Lavigne, Ho, & Duchaine (2004) і Schottroff et al. (2018), які зазначають, що ці спори можуть демонструвати диференційовані результати подвійного фарбування йодидом пропідію, який концентрується в центрі спор і SYTO 9 на зовнішньому шарі пермеабілізованих спор [20,310]. Простежувалося видиме збільшення кількості нежиттєздатних спор при БР-ВГТ і підвищеній температурі. Ці нежиттєздатні спори можуть перебувати в проміжному стані через зміну цілісності мембрани або частково гідролізованої кори [23].

### 9.3 Комбінація високого гідростатичного тиску, ультразвуку та імпульсного електричного поля для інактивації *Listeria innocua*

#### ***Вплив середовища для проведення експериментів***

Не спостерігалось зменшення кількості мікроорганізмів після 60-хвилинної експозиції, а також статистичної різниці між концентрацією *L. innocua*, ресуспендованих у деіонізованій та пептонній воді ( $p > 0,05$ ) (див. рис. 9.1). Літературні дані про вплив деіонізованої води стосуються значно тривалішої експозиції. Зокрема Herbert & Foster (2001) виявили, що здатність до культивування та виживання *L. monocytogenes* у воді залежить від щільності, а суспензія  $10^7$  КУО/мл стає непридатною для культивування через 24 години [311]. Ці дослідження показують, що інактивація у деіонізованій воді відбувається протягом доби або більше. Оскільки наші експерименти проводилися протягом 1-2 годин після ресуспендування, можна припустити, що будь-які ефекти, які ми спостерігали, можна віднести виключно до результатів застосованої обробки.

#### ***Комбінована обробка ВГТ та ІЕП***

ІЕП→ВГТ); ВГТ з подальшим використанням ІЕП (ВГТ→ІЕП); одночасна обробка ІЕП та ВГТ (ІЕП+ВГТ).

Послідовно застосовані обробки ВГТ (200 та 400 МПа) та ІЕП (10-30 кВ/см) продемонстрували переважно адитивні ефекти із інактивацією приблизно 2 lg КУО/мл *L. innocua*. Однак при одночасному застосуванні спостерігалось більшу ефективність (інактивація понад 3 lg КУО/мл), що вказує на наявність синергічного ефекту (рис. 9.7).

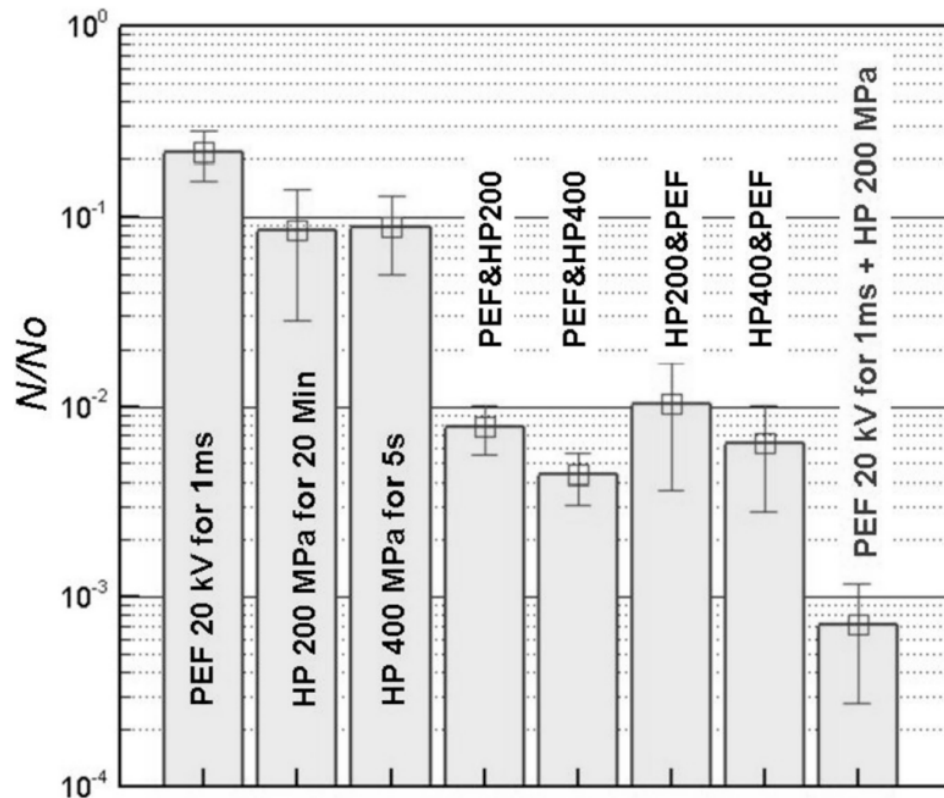


Рис. 9.7. Інактивація *Listeria innocua* ПЕП, ВГТ та їх комбінацією. Обробки позначені PEF&HPP та HPP&PEF є послідовними. Обробка позначена PEF + HPP є одночасною. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy TI, Shynkaryk MV, Mohamed HM, Yousef AE, Sastry SK. Effects of combined high pressure (HPP), pulsed electric field (PEF) and sonication treatments on inactivation of *Listeria innocua*. Journal of Food Engineering. 2018 Sep 1;233:49-56. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.002>

Можливим поясненням може бути синергізм між механічними та електричними силами стиснення, які діють одночасно на клітинну мембрану, що в результаті призводить до летального пошкодження клітини. Поясненням чому подібний синергізм не спостерігався при послідовних обробках (ВГТ→ПЕП чи ПЕП→ВГТ) може бути те, що 10-хвилинний період перенесення зразка з одного обладнання у інше може дозволити відновитися пошкодженим мікроорганізмам. Saulis (2010) описує фазу відновлення після ПЕП як тривалість від мілісекунд до години або навіть днів [312]. Що стосується обробки ВГТ, Lado & Yousef (2002)

відзначають, що реакція адаптації після стресу після ВГТ може виникнути для оборотно пошкоджених клітин, що може зробити ці клітини стійкими до інших методів обробки [313].

### **Комбінована обробка ВГТ та УЗ**

Експерименти показали, що коли обробка ультразвуком застосовується перед НРР, спостерігався лише адитивний ефект (інактивація  $\sim 2$  lg КУО/мл). З іншого боку, коли НРР супроводжувався обробкою ультразвуком, спостерігався синергічний ефект, що збільшував загальну інактивацію бактерій до 3 lg КУО/мл (рис. 9.8).

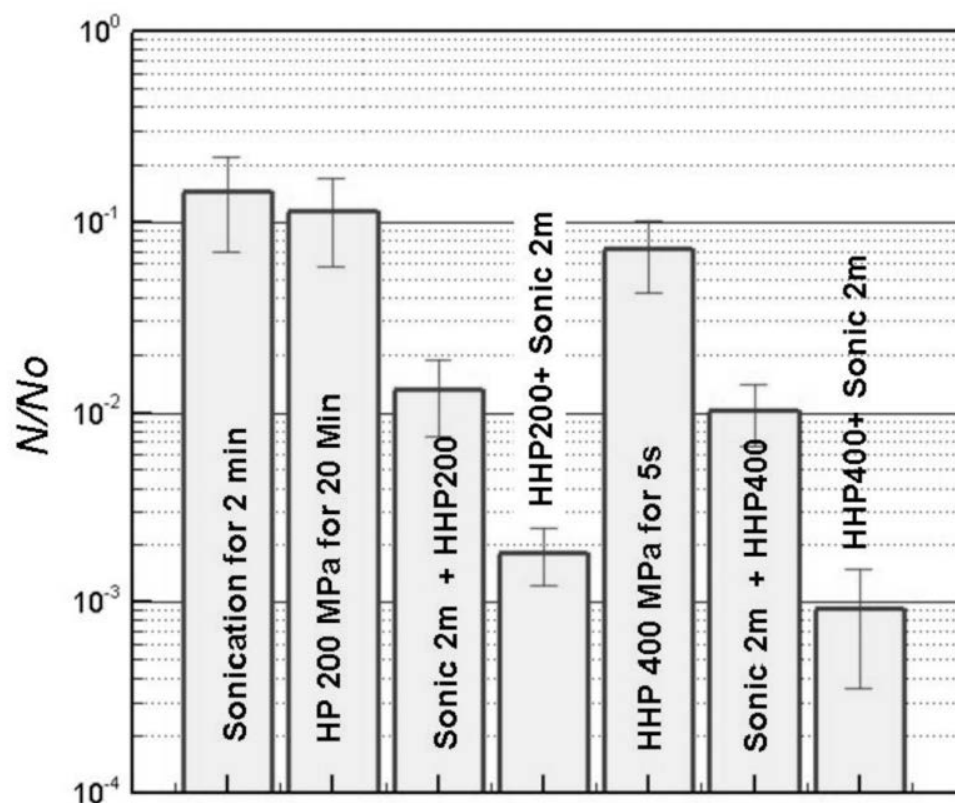


Рис. 9.8. Інактивація *Listeria innocua* ультразвуком, ВГТ та їх послідовною комбінацією. Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy TI, Shynkaryk MV, Mohamed HM, Yousef AE, Sastry SK. Effects of combined high pressure (HPP), pulsed electric field (PEF) and sonication treatments on inactivation of *Listeria innocua*. Journal of Food Engineering. 2018 Sep 1;233:49-56. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.002>

Це пояснюється тим, що обробка ультразвуком впливає (інактивує або пошкоджує) лише на ті бактерії, які знаходяться поблизу осередків кавітації. Проте ті мікроорганізми, які не перебувають в зонах кавітації, залишаються відносно неушкодженими. Це підтверджують дані літератури. Ananta et al. (2005), вивчаючи як грампозитивні, так і грамнегативні бактерії за допомогою проточної цитометрії та культивування на щільних середовищах, виявили, що лише частина клітин, які обробили ультразвуком, піддалися лізису, що було менше у порівнянні з бактеріями, які не демонстрували росту на середовищах [314]. Li et al. (2016) припускають, що розбіжність відповідає життєздатним, але некультивованим клітинам, і показують за допомогою проточної цитометрії, що кількість сублетально пошкоджених клітин невелика; вони також вказують на те, що ультразвукова обробка є процесом «все або нічого» [315]. Таким чином, обробка ВГТ після обробки ультразвуком діятиме на цю неуражену популяцію, отже відсутність синергії. Навпаки, ВГТ впливає на всі бактерії в зоні свого впливу, що підтверджено дослідженнями проведеними Ananta et al. (2004) за допомогою проточної цитометрії клітин, оброблених ВГТ [316]. Таким чином, всі бактерії, оброблені ВГТ, представлятимуть уражену популяцію, яка буде сприйнятлива до обробки ультразвуком.

#### ***Виявлення білків аналізом з біцинхоніною кислотою***

Підвищення електропровідності зразків вказував на вихід бактеріальних внутрішніх речовин. Склад супернатанту міг вказати чи відбувається витік бактеріальних білків. Однак результати аналізу білка з біцинхоніною кислотою не виявили суттєвої різниці ( $p > 0,05$ ) між обробленими та необробленими зразками, що свідчить про те, що хоча пермеабілізація відбувається, її недостатньо для забезпечення дифузії великих молекул, таких як білки з бактеріальних клітин (рис. 9.9).

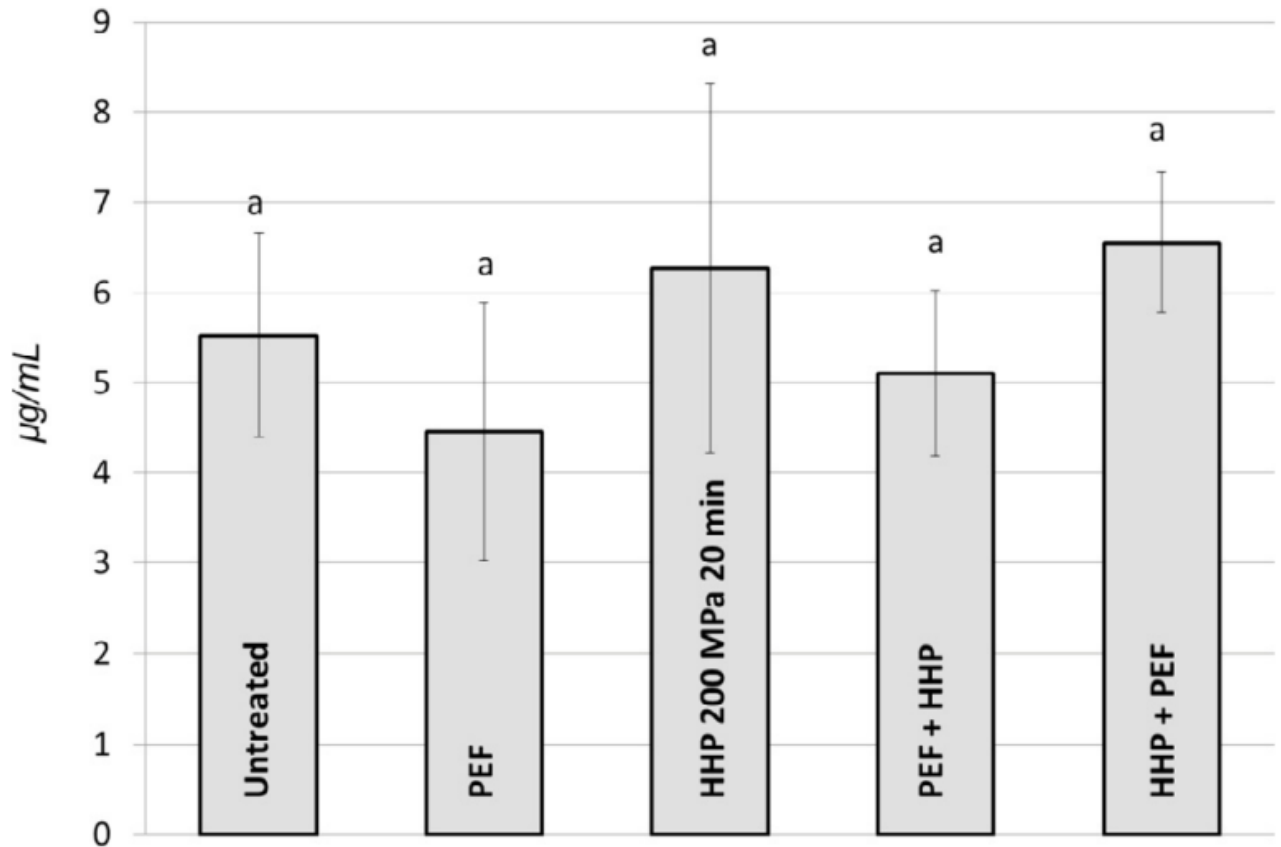


Рис. 9.9. Концентрація вивільнених білків необроблених і оброблених зразків *Listeria innocua*. Різні літери над планками похибок означають достовірну різницю ( $p < 0,05$ ). Планки похибок відображають середнє квадратичне відхилення. Рисунок взято з оригінальної статті автора Pyatkovskyy TI, Shynkaryk MV, Mohamed HM, Yousef AE, Sastry SK. Effects of combined high pressure (HPP), pulsed electric field (PEF) and sonication treatments on inactivation of *Listeria innocua*. Journal of Food Engineering. 2018 Sep 1;233:49-56. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.002>

Основні результати, отримані у цьому розділі, опубліковано в наступних публікаціях автора [16,154,317,318].

Оригінали доступні за посиланнями:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877420301850?via%3Dihub>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1466856422002326>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877418301481?via%3Dihub>

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення актуального наукового завдання щодо застосування нетермічних методів інактивації вегетативних та споротворних мікроорганізмів на підставі отриманих результатів досліджень.

1. Показано, що бактеріальна контамінація камер вакуумного охолодження та проникнення бактерій в товщу листків зелені можливі під час процесу вакуумного охолодження. Бактерії, розташовані зовні камери вакуумного охолодження, у сухому стані можуть переноситися у вакуумну камеру й поширюватися всередині неї під час стадії відновлення тиску до атмосферного. Доведено, що у межах камери кипіння вологої органічної речовини, спричиненої вакуумом, може поширювати контамінацію на інші місця камери. Встановлено, що у камері вакуумного охолодження інтерналізація бактерій до 3 lg КУО/г у товщу листя зелені відбувається інтенсивніше при нижчому тиску (0,6 кПа у порівнянні з 0,9 кПа) та повільнішому (0,35 л/хв у порівнянні з 2,19 л/хв) відновленню тиску до атмосферного.

2. Встановлено, що для досягнення ефективності рідкого дезінфікуючого засобу, його потрібно застосовувати у кількості не менше ніж 23 % від ваги листків шпинату *Spinacia oleracea* і при експозиції не менше 30 хв. Встановлено, що дезінфікуючі засоби були менш ефективними проти епіфітної флори листків шпинату *Spinacia oleracea* порівняно з інокульованими мікроорганізмами, демонструючи зниження кількості епіфітних бактерій від 1,4 до 1,7 lg КУО/г при початковій їх кількості 5,2 до 7,5 lg КУО/г завдяки існуванню інтерналізованої популяції мікроорганізмів ( $(4,9 \pm 0,5)$  lg КУО/г), що підтверджено експериментами з дезінфекцією поверхні листків. Тип дезінфікуючого засобу не впливав на ефективність інактивації *E. coli* O157:H7 на листках *Spinacia oleracea* за допомогою обприскування, даючи приблизно однаковий результат (інактивація 2,3-2,8 lg КУО/г). Визначено, що застосування дезінфікуючого засобу Pro-San L, який містить 0,66 % лимонної кислоти та 0,036 % додецилсульфату натрію, для

інактивації *E. coli* O157:H7 методом занурення було найефективнішим порівняно з методом вакуумного просочення, при якому інтерналізація бактерій посилювалася, а тканина листків *Spinacia oleracea* пошкоджувалася: (знешкодження 4,4 lg КУО/г та 3,3 lg КУО/г відповідно). Збільшення часу дії дезінфікуючого засобу Pro-San L, який містив органічну кислоту, до 3 діб не підвищувало ефективності дезінфекції (інактивація ~ 4 lg КУО/г), проте призводило до прогресуючого пошкодження листа *Spinacia oleracea*.

3. Доведено, що ефективність застосування газоподібного озону залежала від співвідношення маси продукту до газоподібного озону. Більша маса продукції (26,6 кг/м<sup>3</sup>) спричиняла його швидшу декомпозицію (до 5 хвилин від 1,5 г/м<sup>3</sup> до 0 г/м<sup>3</sup>). Ефективність газоподібного озону проти *E. coli* O157:H7 збільшувалася після вакуумного охолодження (інактивація 2,5 lg КУО/г проти 1,9 lg КУО/г), яке видаляє рідину з поверхні продукту та дозволяє газоподібному дезінфектанту проникнути глибше у пори та щілини на листках *Spinacia oleracea*. У той же час показано, що застосування рідких дезінфікуючих засобів після вакуумного охолодження є менш ефективним (інактивація 2,7 lg КУО/г) ніж застосування рідкого дезінфектанта самостійно (інактивація 2,8 lg КУО/г) через інтерналізацію інокульованих бактерій у тканину продукту, яка відбувалася під час процесу вакуумного охолодження. Встановлено, що короткочасна обробка (30 хв) високою концентрацією озону (1,5 г/м<sup>3</sup>) з подальшою тривалою обробкою (до трьох діб) низькою концентрацією озону (0,106 г/м<sup>3</sup>) мала синергічний ефект на інактивацію *E. coli* O157:H7 (інактивація на 3,8 lg КУО/г більше ніж при тривалій обробці без бустерної обробки).

4. При комбінуванні рідких та газоподібних дезінфектантів майже у всіх випадках спостерігали ефект слабший, ніж адитивний. Адитивний ефект обох дезінфектантів (газоподібний озон та рідкий Pro-San L) спостерігали тільки коли за обробкою рідким дезінфікуючим засобом слідувало застосування газоподібного озону під час вакуумного охолодження продукції (інактивація 3,9 lg КУО/г). Підвищення тиску у ємності для обробки до 68,9 кПа покращувало ефективність, сприяючи проникненню газу до збудника. Показано, що поєднання застосування

розпилення рідкого дезінфектанта з наступною довгостроковою обробкою газоподібним озоном зменшувало кількість *E. coli* O157:H7 нижче рівня детекції (інактивація понад 6 lg КУО/мл) після першого дня застосування і призводило до кращого вигляду листків шпинату, ніж довгострокове застосування рідких та газоподібних дезінфікуючих засобів окремо (інактивація 4,9 lg КУО/г та 4,7 lg КУО/г відповідно).

5. Засвідчено, що обробка 500 мл джерельної води шляхом електролізу протягом двох і п'яти хвилин утворювало водні розчини озону з концентраціями 0,74 та 1,72 мг/л відповідно. Встановлено, що ефективність дезінфекції води обробці електролізом залежала від вихідної концентрації мікроорганізмів у воді та тривалості їх контакту з озоном та активними формами кисню. Найменш забруднена мікроорганізмами (до 1,5 lg КУО/мл) водопровідна вода була повністю очищена. Джерельну воду, що містила в середньому 2,7 lg КУО/мл, було ефективно дезінфіковано за допомогою 5-хвилинної обробки з додатковою 5-хвилинною експозицією. У воді, отриманій з відкритої водойми, із 3,8 lg КУО/мл, не вдалося нейтралізувати всі наявні в ній бактерії. Після 5-хвилинної обробки та додаткової 10-хвилинної експозиції було знешкоджено 1,9 lg КУО/мл. Після обробки електролітично-озонованою водою (до 4 мг/л) клінічних штамів *S. aureus* та *E. coli* протягом 15 хвилин виявляли сублетальні пошкодження бактеріальних клітин у цих культурах. До 89,2 % популяції *S. aureus* та до 98,6 % *E. coli* були сублетально пошкодженими. Використання такої води при обробці хірургічних ран сприяло їх загоєнню без відторгнення аутогрануляцій.

6. Показано, що обробка суспензії спор *B. subtilis* помірним електричним полем (300 В/см) у поєднанні з помірною сублетальною термічною обробкою (55, 65 і 75 °С) може призвести до помітного зменшення їх концентрації. Обробкою помірним електричним полем протягом 60 хвилин було нейтралізовано 0,6 lg КУО/мл при початковій концентрації суспензії ~ 7 lg КУО/мл. За допомогою такої ж обробки у поєднанні з термічною обробкою при 55, 65 і 75 °С інактивовано 1,8 lg КУО/мл, 2,0 lg КУО/мл та 2,5 lg КУО/мл відповідно. Встановлено, що обробка помірним електричним полем (15,7 В/см) при температурі 55 °С сирих курячих

яєць, інокульованих *E. coli* K12, зменшувала популяцію мікроорганізмів всередині яєць та спричиняла сублетальні пошкодження бактеріальних клітин. При початковій концентрації популяції 5,5-6 lg КУО/г така обробка знешкоджувала ~ 4,4 lg КУО/г, що на 0,9 lg КУО/г більше порівняно з термічною обробкою при 55 °С у водяній бані.

7. Вперше доведено, що вимірювання електропровідності при обробці суспензії *Listeria innocua* високим гідростатичним тиском (300, 400, 500 МПа) можна використовувати для моніторингу ступеня пошкодження клітин. Результати роботи засвідчили, що електропровідність бактеріальної суспензії зростає зі збільшенням кількості летально ушкоджених клітин. Збільшення електропровідності під час циклу скидання тиску не спостерігали, що свідчило про те, що пошкодження клітин *Listeria innocua*, в основному, відбувалося під час періодів підвищення тиску та його утримання.

8. Встановлено, що ефективність обробки суспензії *Listeria innocua* імпульсним електричним полем залежала від його напруженості з вищою швидкістю інактивації при вищій нарузі. Послідовно застосовані обробки високим гідростатичним тиском (200 та 400 МПа) та імпульсним електричним полем (10-30 кВ/см) продемонстрували переважно адитивні ефекти (інактивація ~ 2 lg КУО/мл). Однак при одночасному застосуванні високого гідростатичного тиску і імпульсного електричного поля спостерігали синергічний ефект (інактивація понад 3 lg КУО/мл). Одночасна обробка високим гідростатичним тиском та імпульсним електричним полем збільшувала електропровідність найбільше, що свідчило про найбільший витік внутрішньоклітинних небілкових компонентів. Комбінації обробок високим гідростатичним тиском і обробки ультразвуком продемонстрували синергічний ефект (інактивація ~ 3 lg КУО/мл), коли за обробкою високим гідростатичним тиском проводили обробкою ультразвуком, але адитивний ефект (інактивація ~ 2 lg КУО/мл), коли обробка ультразвуком передувала обробці високим гідростатичним тиском.

9. Підтверджено, що багаторазова обробка суспензії спор високим гідростатичним тиском була більш ефективною в інактивації спор *B. subtilis*, ніж

його одноразова обробка протягом такого ж часу. Найбільшої інактивації у 5,8 lg КУО/мл (від початкової ~ 7 lg КУО/мл) було досягнуто при 500 МПа та 60 °С протягом трьох циклів по 3 хвилини кожен. Одноразова обробка при 500 МПа та 60 °С протягом 10 хвилин дозволила інактивувати на 1,2 lg КУО/мл менше. Доведено, що інтенсивніша інактивація спор *B. subtilis* при багаторазовій обробці високим гідростатичним тиском не пов'язана з інактивацією літичних ферментів кортексу чи деградацією малих кислоторозчинних білків, а спричинена механічним руйнуванням оболонки спори та цитоплазматичної мембрани.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. AL-Mamun M, Chowdhury T, Biswas B, Absar N. Food Poisoning and Intoxication: A Global Leading Concern for Human Health. In: Food Safety and Preservation [Internet]. Elsevier; 2018. p. 307–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128149560000111>  
doi:10.1016/B978-0-12-814956-0.00011-1
2. Chakka AK, Sriraksha MS, Ravishankar CN. Sustainability of emerging green non-thermal technologies in the food industry with food safety perspective: A review. *LWT*. 2021 Nov;151:112140. doi:10.1016/j.lwt.2021.112140
3. Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 population on baby spinach leaves by liquid sanitizers. *J Food Process Eng*. 2016;40(3):e12479. doi:10.1111/jfpe.12479
4. Zhang Z, Wang L, Zeng X, Han Z, Brennan CS. Non-thermal technologies and its current and future application in the food industry: a review. *Int J Food Sci Technol*. 2019 Jan 12;54(1):1–13. doi:10.1111/ijfs.13903
5. Khouryieh HA. Novel and emerging technologies used by the U.S. food processing industry. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2021 Jan;67:102559. doi:10.1016/j.ifset.2020.102559
6. Gomes J, Matos A, Gmurek M, Quinta-Ferreira RM, Martins RC. Ozone and photocatalytic processes for pathogens removal from water: A review. *Catalysts*. 2019;9(1):1–23. doi:10.3390/catal9010046
7. П'ятковський ТІ, Покришко ОВ, Данилков СО. Оцінка ефективності використання озонування для знезараження прісної води. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2023;(4):113–8. doi:10.11603/1811-2471.2023.v.i4.14189
8. Shumilova O, Tockner K, Sukhodolov A, Khilchevskiy V, De Meester L, Stepanenko S, et al. Impact of the Russia–Ukraine armed conflict on water resources and water infrastructure. *Nat Sustain*. 2023;6(5):578–86. doi:10.1038/s41893-023-01068-x

9. Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Danylkov S. Exploring water disinfection through electrolytic ozonation for application in wartime conditions. *Bull Med Biol Res.* 2024;6(1):43–51. doi:10.61751/bmbr/1.2024.43
10. Ross AIV, Griffiths MW, Mittal GS, Deeth HC. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol.* 2003;89(2–3):125–38. doi:10.1016/S0168-1605(03)00161-2 PubMed PMID: 14623378.
11. Van Impe J, Smet C, Tiwari B, Greiner R, Ojha S, Stulić V, et al. State of the art of nonthermal and thermal processing for inactivation of micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 2018;125(1):16–35. doi:10.1111/jam.13751
12. Sastry SK. Toward a Philosophy and Theory of Volumetric Nonthermal Processing. *J Food Sci.* 2016;81(6):E1431–46. doi:10.1111/1750-3841.13324
13. Torres JA, Velazquez G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *J Food Eng.* 2005;67(1–2):95–112. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.05.066
14. Gunther NW, Abdul-Wakeel A, Ramos R, Sheen S. Evaluation of hydrostatic high pressure and cold storage parameters for the reduction of campylobacter jejuni in chicken livers. *J Food Prot.* 2019;82(6):1039–44. doi:10.4315/0362-028X.JFP-18-469
15. Bolumar T, Orlie V, Sikes A, Aganovic K, Bak KH, Guyon C, et al. High-pressure processing of meat: Molecular impacts and industrial applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2021 Jan 14;20(1):332–68. doi:10.1111/1541-4337.12670
16. Mok JH, Sun Y, Pyatkovskyy T, Hu X, Sastry SK. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore inactivation by single- and multi-pulse high hydrostatic pressure (MP-HHP). *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2022;81. doi:10.1016/j.ifset.2022.103147
17. Schottroff F, Pyatkovskyy T, Reineke K, Setlow P, Sastry SK, Jaeger H. Mechanisms of enhanced bacterial endospore inactivation during sterilization by ohmic heating. *Bioelectrochemistry.* 2019;130.

- doi:10.1016/j.bioelechem.2019.107338
18. Knorr D, Heinz V, Angersbach A, Lee DU. Membrane permeabilization and inactivation mechanisms of biological systems by emerging technologies. *Engineering and Food for the 21st Century*. 2002. 699–713 p.
  19. Buckow R, Ng S, Toepfl S. Pulsed electric field processing of orange juice: A review on microbial, enzymatic, nutritional, and sensory quality and stability. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2013;12(5):455–67. doi:10.1111/1541-4337.12026
  20. Schottroff F, Fröhling A, Zunabovic-Pichler M, Krottenthaler A, Schlüter O, Jäger H. Sublethal injury and Viable but Non-culturable (VBNC) state in microorganisms during preservation of food and biological materials by non-thermal processes. *Front Microbiol*. 2018;9(NOV). doi:10.3389/fmicb.2018.02773
  21. Cebrián G, Mañas P, Condón S. Comparative resistance of bacterial foodborne pathogens to non-thermal technologies for food preservation. *Front Microbiol*. 2016;7(MAY). doi:10.3389/fmicb.2016.00734
  22. Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Balasubramaniam VM, Niranjan K, Knorr D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007;47(1):69–112. doi:10.1080/10408390600626420
  23. Fan L, Ismail BB, Hou F, Muhammad AI, Zou M, Ding T, et al. Thermosonication damages the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores and impels their inactivation. *Food Res Int*. 2019;125. doi:10.1016/j.foodres.2019.108514
  24. Ko E, Bai J. Effective control of antibiotic resistance using a sonication-based combinational treatment and its application to fresh food. *Ultrason Sonochem*. 2022 Nov;90:106198. doi:10.1016/j.ultsonch.2022.106198
  25. Predmore A, Sanglay G, Li J, Lee K. Control of human norovirus surrogates in fresh foods by gaseous ozone and a proposed mechanism of inactivation. *Food Microbiol*. 2015 Sep;50:118–25. doi:10.1016/j.fm.2015.04.004
  26. Perry JJ, Peña-Melendez M, Yousef AE. Ozone-based treatments for inactivation of *Salmonella enterica* in tree nuts: Inoculation protocol and surrogate suitability

- considerations. *Int J Food Microbiol.* 2019 May 16;297:21–6.  
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.025 PubMed PMID: 30856385.
27. Khadre MA, Yousef AE, Kim JG. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *Journal of Food Science.* 2001. p. 1242–52.  
doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x
  28. Melanie P, Niola C, Plataroti I, Mancini S, Fratini F. Use of Ozone in Veterinary Dentistry as an Alternative to Conventional Antibiotics and Antiseptics. *Vet Sci.* 2024 Apr 3;11(4):163. doi:10.3390/vetsci11040163
  29. Epelle EI, Macfarlane A, Cusack M, Burns A, Amaeze N, Richardson K, et al. Stabilisation of Ozone in Water for Microbial Disinfection. *Environ - MDPI.* 2022;9(4). doi:10.3390/environments9040045
  30. Marino M, Maifreni M, Baggio A, Innocente N. Inactivation of foodborne bacteria biofilms by aqueous and gaseous ozone. *Front Microbiol.* 2018 Aug 28;9(AUG). doi:10.3389/fmicb.2018.02024
  31. Shao L, Dong Y, Chen X, Xu X, Wang H. Modeling the elimination of mature biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. Using combined ultrasound and disinfectants. *Ultrason Sonochem.* 2020 Dec;69:105269. doi:10.1016/j.ultsonch.2020.105269
  32. Murakami M, Nagano K, Hamaoka K, Kato D, Kawai T, Murakami H, et al. Ozone Water Bactericidal and Cleaning Effects on Oral Diseases-related Planktonic and Bacterial Biofilms. *J Hard Tissue Biol.* 2021;30(1):27–32. doi:10.2485/jhtb.30.27
  33. Min B, Yoo D, Lee Y, Seo M, Kim H. Complete Genomic Analysis of *Enterococcus faecium* Heat-Resistant Strain Developed by Two-Step Adaptation Laboratory Evolution Method. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(July):1–14. doi:10.3389/fbioe.2020.00828
  34. Pereira RN, Vicente AA. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Res Int.* 2010;43(7):1936–43. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.013
  35. Хірна ТВ. Ефективність та відповідність гігієнічним вимогам фізико-

- хімічних способів знезаражування води (огляд літератури). *Анали Мечниковського Інституту*. 2006;(1):1–11.
36. Shmychkova O, Protsenko V, Velichenko A. Wastewater treatment from pharmaceuticals: A review. *Vopr Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii*. 2021;(3):4–31. doi:10.32434/0321-4095-2021-136-3-4-31
  37. İbanoğlu Ş. Applications of ozonation in the food industry. In: *Non-thermal Food Processing Operations* [Internet]. Elsevier; 2023. p. 55–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128187173000032>  
doi:10.1016/B978-0-12-818717-3.00003-2
  38. Zoutman D, Shannon M, Mandel A. Effectiveness of a novel ozone-based system for the rapid high-level disinfection of health care spaces and surfaces. *Am J Infect Control*. 2011 Dec;39(10):873–9. doi:10.1016/j.ajic.2011.01.012
  39. Alimohammadi M, Naderi M. Effectiveness of Ozone Gas on Airborne Virus Inactivation in Enclosed Spaces: A Review Study. *Ozone Sci Eng*. 2021;43(1):21–31. doi:10.1080/01919512.2020.1822149
  40. Hu X, Ni Y, Lian W, Kang L, Jiang J, Li M. Combination of negative pressure wound therapy using vacuum-assisted closure and ozone water flushing for treatment of diabetic foot ulcers. *Int J Diabetes Dev Ctries*. 2020 Apr 25;40(2):290–5. doi:10.1007/s13410-019-00769-4
  41. Murakami AN, Croti UA, Borim BC, De Marchi CH, Murakami RMR, Almeida MTG de, et al. Use of Ozonized Water in the Prevention of Surgical Site Infection in Children Undergoing Cardiovascular Surgery. *Brazilian J Cardiovasc Surg*. 2023;38(6). doi:10.21470/1678-9741-2023-0006
  42. Subiksha PS. Ozone and its uses in root canal therapy - A review. *J Pharm Sci Res*. 2016;8(9):1073–6.
  43. Kim JG, Yousef AE, Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *J Food Prot*. 1999;62(9):1071–87. doi:10.4315/0362-028X-62.9.1071 PubMed PMID: 10492485.
  44. Chuwa C, Vaidya D, Kathuria D, Gautam S. Ozone O<sub>3</sub> An Emerging Technology

- in the Food Industry. *Food Nutr J.* 2020;5(2):224. doi:10.29011/2575-7091.100124
45. Pandiselvam R, Subhashini S, Banuu Priya EP, Kothakota A, Ramesh SV, Shahir S. Ozone based food preservation: a promising green technology for enhanced food safety. *Ozone Sci Eng.* 2019 Jan 2;41(1):17–34. doi:10.1080/01919512.2018.1490636
  46. Rice RG. Applications of ozone for industrial wastewater treatment - A review. *Ozone: Science and Engineering.* Taylor and Francis Inc.; 1996. p. 477–515. doi:10.1080/01919512.1997.10382859
  47. Manasfi T. Ozonation in drinking water treatment: an overview of general and practical aspects, mechanisms, kinetics, and byproduct formation. *Comprehensive Analytical Chemistry* [Internet]. 1st ed. Elsevier B.V.; 2021. 85–111 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.coac.2021.02.003> doi:10.1016/bs.coac.2021.02.003
  48. Manasfi T, Houska J, Gebhardt I, von Gunten U. Formation of carbonyl compounds during ozonation of lake water and wastewater: Development of a non-target screening method and quantification of target compounds. *Water Res.* 2023 Jun;237:119751. doi:10.1016/j.watres.2023.119751
  49. Wang X, Liao D, Ji QM, Yang YH, Li MC, Yi XY, et al. Analysis of Bactericidal Effect of Three Medical Ozonation Dosage Forms on Multidrug-Resistant Bacteria from Burn Patients. *Infect Drug Resist.* 2022 Apr;Volume 15:1637–43. doi:10.2147/IDR.S353277
  50. Roth A, Krishnakumar A, Rahimi R. Ozone as a Topical Treatment for Infected Dermal Wounds. *Front Biosci - Elit.* 2023;15(2). doi:<https://doi.org/10.31083/j.fbe1502009>
  51. Pérez-Santonja JJ, Güell JL, Gris O, Vázquez Dorrego XM, Pellicer E, Benítez-Del-Castillo JM. Liposomal Ozonated Oil in Ocular Infections: A Review of Preclinical and Clinical Studies, Focusing on Its Antiseptic and Regenerative Properties. *Clin Ophthalmol.* 2022 Jun;Volume 16:1953–62. doi:10.2147/OPHTH.S360929

52. Gentili V, Strazzabosco G, Salgari N, Mancini A, Rizzo S, Beltrami S, et al. Ozonated Oil in Liposome Eyedrops Reduces the Formation of Biofilm, Selection of Antibiotic-Resistant Bacteria, and Adhesion of Bacteria to Human Corneal Cells. *Int J Mol Sci.* 2023;24(18). doi:10.3390/ijms241814078
53. Celenza G, Iorio R, Cracchiolo S, Petricca S, Costagliola C, Cinque B, et al. Antimycotic Activity of Ozonized Oil in Liposome Eye Drops against *Candida* spp. *Transl Vis Sci Technol.* 2020 Jul 2;9(8):4. doi:10.1167/tvst.9.8.4
54. Tara F, Zand-kargar Z, Rajabi O, Berenji F. The Effects of Ozonated Olive Oil and Clotrimazole Cream for Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Altern Ther Health Med.* 2016;22(4):44–9.
55. Gültekin FA, Bakkal BH, Sümer D, Köktürk F, Bektaş S. Effects of Ozonated Olive Oil on acute radiation proctitis in rats. *Balkan Med J.* 2013;30(4):369–74. doi:10.5152/balkanmedj.2013.9158
56. Crastechini E, Koga-Ito CY, Machado SDF, Teodoro GR, Back-Brito GN, Sangalli J, et al. Effect of ozonized olive oil on oral levels of *Candida* spp. in patients with denture stomatitis. *Brazilian Dent Sci.* 2018;21(1):111–8. doi:10.14295/bds.2018.v21i1.1489
57. Elshinawy MI, Al-madboly LA, Ghoneim WM. Synergistic Effect of Newly Introduced Root Canal Medicaments; Ozonated Olive Oil and Chitosan Nanoparticles, Against Persistent Endodontic Pathogens. *Front Microbiol.* 2018;(9):1371. doi:10.3389/fmicb.2018.01371
58. Nardi GM, Fais S, Casu C, Mazur M, Giorgio R Di, Grassi R, et al. Mouthwash Based on Ozonated Olive Oil in Caries Prevention: A Preliminary In-Vitro Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;(17):9106. doi:https://doi.org/10.3390/ijerph17239106
59. Khachatryan G, Khachatryan L, Krystyan M, Lenart-Boroń A, Krzan M, Kulik K, et al. Preparation of Nano/Microcapsules of Ozonated Olive Oil in Hyaluronan Matrix and Analysis of Physicochemical and Microbiological (Biological) Properties of the Obtained Biocomposite. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 13;23(22):14005. doi:10.3390/ijms232214005

60. Slavinskienė G, Grigonis A, Ivaškienė M, Sinkevičienė I, Andrulevičiūtė V, Ivanauskas L, et al. A Comparative Study of the Chemical Properties and Antibacterial Activity of Four Different Ozonated Oils for Veterinary Purposes. *Vet Sci*. 2024 Apr 1;11(4):161. doi:10.3390/vetsci11040161
61. Rangel K, Cabral FO, Lechuga GC, Carvalho JPRS, Villas-Bôas MHS, Midlej V, et al. Detrimental Effect of Ozone on Pathogenic Bacteria. *Microorganisms*. 2021 Dec 26;10(1):40. doi:10.3390/microorganisms10010040
62. Yousefi B, Banihashemian S, Feyzabadi Z, Hasanpour S, Kokhaei P, Abdolshahi A, et al. Potential therapeutic effect of oxygen-ozone in controlling of COVID-19 disease. *Med Gas Res*. 2022;12(2):33–40. doi:10.4103/2045-9912.325989
63. Afsah-Hejri L, Hajeb P, Ehsani RJ. Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2020 Jul 22;19(4):1777–808. doi:10.1111/1541-4337.12594
64. Westover C, Rahmatulloev S, Danko D, Afshin EE, O’Hara NB, Ounit R, et al. Ozone Disinfection for Elimination of Bacteria and Degradation of SARS-CoV2 RNA for Medical Environments. *Genes (Basel)*. 2022 Dec 28;14(1):85. doi:10.3390/genes14010085
65. Tizaoui C. Ozone: A Potential Oxidant for COVID-19 Virus (SARS-CoV-2). *Ozone Sci Eng*. 2020 Sep 2;42(5):378–85. doi:10.1080/01919512.2020.1795614
66. Ersoy ZG, Barisci S, Turkay O. Mechanisms of the Escherichia coli and Enterococcus faecalis inactivation by ozone. *LWT - Food Sci Technol*. 2018;100(1):306–13. doi:10.1016/j.lwt.2018.10.095
67. Baghal Asghari F, Dehghani MH, Dehghanzadeh R, Farajzadeh D, Shanehbandi D, Mahvi AH, et al. Performance evaluation of ozonation for removal of antibiotic-resistant Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa and genes from hospital wastewater. *Sci Rep*. 2021 Dec 31;11(1):24519. doi:10.1038/s41598-021-04254-z
68. Fan X, Sokorai KJB, Gurtler JB. Advanced oxidation process for the inactivation of Salmonella typhimurium on tomatoes by combination of gaseous ozone and aerosolized hydrogen peroxide. *Int J Food Microbiol*. 2020 Jan;312:108387.

- doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108387
69. Choudhury B, Portugal S, Mastanaiah N, Johnson JA, Roy S. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an open water system with ozone generated by a compact, atmospheric DBD plasma reactor. *Sci Rep*. 2018 Dec 4;8(1):17573. doi:10.1038/s41598-018-36003-0
  70. Li J, Li X, Li K, Tao T. Plasmas ozone inactivation of *Legionella* in deionized water and wastewater. *Environ Sci Pollut Res*. 2018 Apr 24;25(10):9697–707. doi:10.1007/s11356-018-1233-x
  71. Dong S, Li J, Kim MH, Cho J, Park SJ, Nguyen TH, et al. Deactivation of *Legionella Pneumophila* in municipal wastewater by ozone generated in arrays of microchannel plasmas. *J Phys D Appl Phys*. 2018 Jun 27;51(25):255501. doi:10.1088/1361-6463/aac379
  72. Mecha AC, Onyango MS, Ochieng A, Momba MN. Modelling inactivation kinetics of waterborne pathogens in municipal wastewater using ozone. *Environ Eng Res*. 2019 Dec 6;25(6):890–7. doi:10.4491/eer.2019.432
  73. Yáñez Noguez I, Orta de Velásquez MT, Atengueño Reyes K, Mendoza Garfias MB. Alternative Treatment to Remove Resistant Strains of *Vibrio cholerae* in Water. *J Environ Eng*. 2020 Oct;146(10):04020119. doi:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001795
  74. Ziyaina M, Rasco B. Inactivation of microbes by ozone in the food industry: A review. *African J Food Sci*. 2021 Mar 31;15(3):113–20. doi:10.5897/ajfs2020.2074
  75. Epelle EI, Macfarlane A, Cusack M, Burns A, Okolie JA, Mackay W, et al. Ozone application in different industries: A review of recent developments. *Chem Eng J*. 2023 Feb;454:140188. doi:10.1016/j.cej.2022.140188
  76. Ofori I, Maddila S, Lin J, Jonnalagadda SB. Ozone initiated inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in water: Influence of selected organic solvents prevalent in wastewaters. *Chemosphere*. 2018 Sep;206:43–50. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.04.164
  77. Moreira Fonseca PM, Buendía Palacios DA, de Sá Júnior PL, Miyakawa W,

- Damião ÁJ, Fernandes AB, et al. Preliminary Study: Comparative Analysis of the Effects of Ozone and Ultrasound on *Streptococcus Mutans*. *Ozone Sci Eng*. 2021 May 4;43(3):263–75. doi:10.1080/01919512.2020.1796581
78. Demir F, Atguden A. Experimental Investigation on the Microbial Inactivation of Domestic Well Drinking Water using Ozone under Different Treatment Conditions. *Ozone Sci Eng*. 2016 Jan 2;38(1):25–35. doi:10.1080/01919512.2015.1074534
79. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial Effect of a Novel Ozone-Generating Device on Micro-Organisms Associated with Primary Root Carious Lesions in vitro. *Caries Res*. 2000;34(6):498–501. doi:10.1159/000016630
80. Sung HJ, Song WJ, Kim KP, Ryu S, Kang DH. Combination effect of ozone and heat treatments for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in apple juice. *Int J Food Microbiol*. 2014 Feb;171:147–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.001
81. Panebianco F, Rubiola S, Chiesa F, Civera T, Di Ciccio PA. Effect of gaseous ozone on *Listeria monocytogenes* planktonic cells and biofilm: An in vitro study. *Foods*. 2021;10(7):1484. doi:10.3390/foods10071484
82. Shah NNAK, Rahman RA, Chuan LT, Hashim DM. Application of gaseous ozone to inactivate *Bacillus cereus* in processed rice. *J Food Process Eng*. 2011 Dec;34(6):2220–32. doi:10.1111/j.1745-4530.2009.00566.x
83. Novak JS, Yuan JTC. Increased Inactivation of Ozone-Treated *Clostridium perfringens* Vegetative Cells and Spores on Fabricated Beef Surfaces Using Mild Heat. *J Food Prot*. 2004 Feb;67(2):342–6. doi:10.4315/0362-028X-67.2.342
84. Zhang F, Xi J, Huang JJ, Hu HY. Effect of inlet ozone concentration on the performance of a micro-bubble ozonation system for inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *Sep Purif Technol*. 2013 Aug;114:126–33. doi:10.1016/j.seppur.2013.04.034
85. Wood JP, Wendling M, Richter W, Rogers J. The use of ozone gas for the inactivation of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* spores on building materials. *PLoS One*. 2020;15(5):e0233291. doi:10.1371/journal.pone.0233291

86. Wen G, Liang Z, Xu X, Cao R, Wan Q, Ji G, et al. Inactivation of fungal spores in water using ozone: Kinetics, influencing factors and mechanisms. *Water Res.* 2020;185:116218. doi:10.1016/j.watres.2020.116218 PubMed PMID: 32726715.
87. Epelle EI, Macfarlane A, Cusack M, Burns A, Mackay WG, Rateb ME, et al. Application of Ultraviolet-C Radiation and Gaseous Ozone for Microbial Inactivation on Different Materials. *ACS Omega.* 2022 Nov 29;7(47):43006–21. doi:10.1021/acsomega.2c05264
88. Sujayasree OJ, Chaitanya AK, Bhoite R, Pandiselvam R, Kothakota A, Gavahian M, et al. Ozone: An Advanced Oxidation Technology to Enhance Sustainable Food Consumption through Mycotoxin Degradation. *Ozone Sci Eng.* 2022 Jan 2;44(1):17–37. doi:10.1080/01919512.2021.1948388
89. Wainwright KE, Miller MA, Barr BC, Gardner IA, Melli AC, Essert T, et al. Chemical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *J Parasitol.* 2007 Aug;93(4):925–31. doi:10.1645/GE-1063R.1
90. Dumètre A, Le Bras C, Baffet M, Meneceur P, Dubey JP, Derouin F, et al. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet Parasitol.* 2008 May;153(3–4):209–13. doi:10.1016/j.vetpar.2008.02.004
91. Ran Z, Li S, Huang J, Yuan Y, Cui C, Williams CD. Inactivation of *Cryptosporidium* by ozone and cell ultrastructures. *J Environ Sci.* 2010 Dec;22(12):1954–9. doi:10.1016/S1001-0742(09)60345-4
92. Ogura AP, Sabogal-Paz LP. Detection of *Cryptosporidium Parvum* Oocysts in Artificially Contaminated Filter Backwash Water and Ozone Treatment at Pilot Scale. *Ozone Sci Eng.* 2022 Sep 3;44(5):426–37. doi:10.1080/01919512.2021.1960148
93. Nakada LYK, Franco RMB, Fiuza VR da S, Santos LU dos, Branco N, Guimarães JR. Pre-ozonation of source water: Assessment of efficacy against *Giardia duodenalis* cysts and effects on natural organic matter. *Chemosphere.* 2019 Jan;214:764–70. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.164
94. Wolf C, Von Gunten U, Kohn T. Kinetics of Inactivation of Waterborne Enteric

- Viruses by Ozone. *Environ Sci Technol*. 2018;52(4):2170–7.  
doi:10.1021/acs.est.7b05111 PubMed PMID: 29356522.
95. Sánchez G. Processing Strategies to Inactivate Hepatitis A Virus in Food Products: A Critical Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2015 Nov;14(6):771–84. doi:10.1111/1541-4337.12154
  96. Brié A, Boudaud N, Mssihid A, Loutreul J, Bertrand I, Gantzer C. Inactivation of murine norovirus and hepatitis A virus on fresh raspberries by gaseous ozone treatment. *Food Microbiol*. 2018 Apr;70:1–6. doi:10.1016/j.fm.2017.08.010
  97. Ding N, Neumann NF, Price LM, Braithwaite SL, Balachandran A, Belosevic M, et al. Ozone inactivation of infectious prions in rendering plant and municipal wastewaters. *Sci Total Environ*. 2014;470:717–25.  
doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.099 PubMed PMID: 24184548.
  98. Hara H, Chida J, Pasiana AD, Uchiyama K, Kikuchi Y, Naito T, et al. Vaporized hydrogen peroxide and ozone gas synergistically reduce prion infectivity on stainless steel wire. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6). doi:10.3390/ijms22063268 PubMed PMID: 33806892.
  99. Ding N, Neumann NF, Price LM, Braithwaite SL, Balachandran A, Mitchell G, et al. Kinetics of Ozone Inactivation of Infectious Prion Protein. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Apr 15;79(8):2721–30. doi:10.1128/AEM.03698-12
  100. Oliver JC, Bredarioli PAP, Leandro FD, Ferreira CBRJ, Veiga SMOM, Dias ALT. Ozone against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in contact lenses storage cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61. doi:10.1590/s1678-9946201961023
  101. Harada AMM, Nascimento MS. Effect of dry sanitizing methods on *Bacillus cereus* biofilm. *Brazilian J Microbiol*. 2021 Jun 23;52(2):919–26.  
doi:10.1007/s42770-021-00451-0
  102. Tiwari M, Scannell A, O'Donnell C. Effect of ozone in combination with cleaning in place reagent (cip) to control biofilms of spore-formers in food process environment. *Biosyst Food Eng Res Rev*. 2017;22:93–6.
  103. Wolkoff P, Clausen PA, Larsen ST, Hammer M, Nielsen GD. Airway effects of repeated exposures to ozone-initiated limonene oxidation products as model of

- indoor air mixtures. *Toxicol Lett.* 2012 Mar;209(2):166–72.  
doi:10.1016/j.toxlet.2011.12.008
104. Burnett RT, Smith-Doiron M, Stieb D, Raizenne ME, Brook JR, Dales RE, et al. Association between Ozone and Hospitalization for Acute Respiratory Diseases in Children Less than 2 Years of Age. *Am J Epidemiol.* 2001 Mar 1;153(5):444–52.  
doi:10.1093/aje/153.5.444
105. Wiegman CH, Li F, Ryffel B, Togbe D, Chung KF. Oxidative Stress in Ozone-Induced Chronic Lung Inflammation and Emphysema: A Facet of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front Immunol.* 2020 Sep 2;11:1957.  
doi:10.3389/fimmu.2020.01957
106. Michaudel C, Mackowiak C, Maillet I, Fauconnier L, Akdis CA, Sokolowska M, et al. Ozone exposure induces respiratory barrier biphasic injury and inflammation controlled by IL-33. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 Sep;142(3):942–58.  
doi:10.1016/j.jaci.2017.11.044
107. Valacchi G, Pagnin E, Corbacho AM, Olano E, Davis PA, Packer L, et al. In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radic Biol Med.* 2004 Mar;36(5):673–81.  
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.005
108. Gilmour MI, Park P, Selgrade MK. Ozone-enhanced Pulmonary Infection with *Streptococcus zooepidemicus* in Mice: The Role of Alveolar Macrophage Function and Capsular Virulence Factors. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Mar;147(3):753–60. doi:10.1164/ajrccm/147.3.753
109. Shynkaryk M V, Pyatkovskyy TI, Yousef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Eng.* 2016;191:10–8.  
doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025
110. Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Fresh produce sanitization by combination of gaseous ozone and liquid sanitizer. *J Food Eng.* 2017;210:19–26. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.03.031
111. Rangrazi A, Mirmortazavi A, Imani R, Nodehi D. Effect of Ozone on Corrosion

- Behavior of a Cobalt–Chromium Alloy Used in Removable Partial Denture Framework: An In Vitro Study. *J Adv Oral Res.* 2021;12(2):304–9. doi:10.1177/23202068211015748
112. Pandiselvam R, Sunoj S, Manikantan MR, Kothakota A, Hebbar KB. Application and Kinetics of Ozone in Food Preservation. *Ozone Sci Eng.* 2017;39(2):115–26. doi:10.1080/01919512.2016.1268947
113. Li P, Wu C, Yang Y, Wang Y, Yu S, Xia S, et al. Effects of microbubble ozonation on the formation of disinfection by-products in bromide-containing water from Tai Lake. *Sep Purif Technol.* 2018 Mar;193:408–14. doi:10.1016/j.seppur.2017.11.049
114. Koike K, Nifuku M, Izumi K, Nakamura S, Fujiwara S, Horiguchi S. Explosion properties of highly concentrated ozone gas. *J Loss Prev Process Ind.* 2005 Jul;18(4–6):465–8. doi:10.1016/j.jlp.2005.07.020
115. Marszałek K, Szczepańska J, Starzonek S, Woźniak Ł, Trych U, Skąpska S, et al. Enzyme inactivation and evaluation of physicochemical properties, sugar and phenolic profile changes in cloudy apple juices after high pressure processing, and subsequent refrigerated storage. *J Food Process Eng.* 2019 Jun 12;42(4):e13034. doi:10.1111/jfpe.13034
116. Sehrawat R, Kaur BP, Nema PK, Tewari S, Kumar L. Microbial inactivation by high pressure processing: principle, mechanism and factors responsible. *Food Sci Biotechnol.* 2021 Jan 6;30(1):19–35. doi:10.1007/s10068-020-00831-6
117. Huang HW, Wu SJ, Lu JK, Shyu YT, Wang CY. Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control.* 2017 Feb;72:1–8. doi:10.1016/j.foodcont.2016.07.019
118. Wei Chen H, Po Fang W. A novel method for the microencapsulation of curcumin by high-pressure processing for enhancing the stability and preservation. *Int J Pharm.* 2022 Feb;613:121403. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121403
119. Yadav KS, Kale K. High Pressure Homogenizer in Pharmaceuticals: Understanding Its Critical Processing Parameters and Applications. *J Pharm Innov.* 2020 Dec 11;15(4):690–701. doi:10.1007/s12247-019-09413-4

120. Dumay E, Chevalier-Lucia D, Picart-Palmade L, Benzaria A, Gràcia-Julià A, Blayo C. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends Food Sci Technol.* 2013 May;31(1):13–26. doi:10.1016/j.tifs.2012.03.005
121. Podolak R, Whitman D, Black DG. Factors Affecting Microbial Inactivation during High Pressure Processing in Juices and Beverages: A Review. *J Food Prot.* 2020 Sep;83(9):1561–75. doi:10.4315/JFP-20-096
122. de Alba M, Pérez-Andrés JM, Harrison SM, Brunton NP, Burgess CM, Tiwari BK. High pressure processing on microbial inactivation, quality parameters and nutritional quality indices of mackerel fillets. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2019 Jul;55:80–7. doi:10.1016/j.ifset.2019.05.010
123. Liu F, Wang Y, Bi X, Guo X, Fu S, Liao X. Comparison of Microbial Inactivation and Rheological Characteristics of Mango Pulp after High Hydrostatic Pressure Treatment and High Temperature Short Time Treatment. *Food Bioprocess Technol.* 2013 Aug 24;10(6):2675–2684. doi:10.1007/s11947-012-0953-z
124. Agregán R, Munekata PES, Zhang W, Zhang J, Pérez-Santaescolástica C, Lorenzo JM. High-pressure processing in inactivation of *Salmonella* spp. in food products. *Trends Food Sci Technol.* 2021 Jan;107:31–7. doi:10.1016/j.tifs.2020.11.025
125. Levy R, Okun Z, Shpigelman A. High-Pressure Homogenization: Principles and Applications Beyond Microbial Inactivation. *Food Eng Rev.* 2021 Sep 13;13(3):490–508. doi:10.1007/s12393-020-09239-8
126. Liu Y, Betti M, Gänzle MG. High pressure inactivation of *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, and spoilage microbiota on poultry meat. *J Food Prot.* 2012;75(3):497–503. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-316 PubMed PMID: 22410223.
127. Bièche C, de Lamballerie M, Chevret D, Federighi M, Tresse O. Dynamic proteome changes in *Campylobacter jejuni* 81-176 after high pressure shock and subsequent recovery. *J Proteomics.* 2012;75(4):1144–56. doi:10.1016/j.jprot.2011.10.028 PubMed PMID: 22079248.
128. Ceuppens S, Li D, Uyttendaele M, Renault P, Ross P, Ranst M Van, et al.

- Molecular Methods in Food Safety Microbiology: Interpretation and Implications of Nucleic Acid Detection. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2014 Jul;13(4):551–77. doi:10.1111/1541-4337.12072
129. Silva JL, Oliveira AC, Vieira TCRG, de Oliveira GAP, Suarez MC, Foguel D. High-Pressure Chemical Biology and Biotechnology. *Chem Rev.* 2014 Jul 23;114(14):7239–67. doi:10.1021/cr400204z
130. Georget E, Sevenich R, Reineke K, Mathys A, Heinz V, Callanan M, et al. Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure processing in complex matrices: A review. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2015 Feb;27:1–14. doi:10.1016/j.ifset.2014.10.015
131. Soni A, Oey I, Silcock P, Bremer P. Bacillus Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2016 Nov;15(6):1139–48. doi:10.1111/1541-4337.12231
132. Sarker MR, Akhtar S, Torres JA, Paredes-Sabja D. High hydrostatic pressure-induced inactivation of bacterial spores. *Crit Rev Microbiol.* 2015 Jan 2;41(1):18–26. doi:10.3109/1040841X.2013.788475
133. Jofré A, Aymerich T, Bover-Cid S, Garriga M. Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. *Int Microbiol.* 2010;13(3):105–12. doi:10.2436/20.1501.01.115
134. Kameník J, Dušková M, Dorotíková K, Hušáková M, Ježek F. The Effect of High-Pressure Processing on the Survival of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Steak Tartare: The Good- or Best-Case Scenario? *Microorganisms.* 2023;11(2):377. doi:10.3390/microorganisms11020377
135. Zhou Y, Karwe M V., Matthews KR. Differences in inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 strains in ground beef following repeated high pressure processing treatments and cold storage. *Food Microbiol.* 2016;58:7–12. doi:10.1016/j.fm.2016.02.010 PubMed PMID: 27217352.
136. Lee SH, Choe J, Shin DJ, Yong HI, Choi Y, Yoon Y, et al. Combined effect of high pressure and vinegar addition on the control of *Clostridium perfringens* and

- quality in nitrite-free emulsion-type sausage. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2019;52(July 2018):429–37. doi:10.1016/j.ifset.2019.02.006
137. Argyri AA, Papadopoulou OS, Nisiotou A, Tassou CC, Chorianopoulos N. Effect of high pressure processing on the survival of *Salmonella Enteritidis* and shelf-life of chicken fillets. *Food Microbiol.* 2018 Apr;70:55–64. doi:10.1016/j.fm.2017.08.019
138. Garner AL. Pulsed electric field inactivation of microorganisms: from fundamental biophysics to synergistic treatments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019 Oct 7;103(19):7917–29. doi:10.1007/s00253-019-10067-y
139. Zheng Z, Jin Y, Zhang L, Xu X, Yang N. Inactivation of microorganisms in foods by electric field processing: A review. *J Agric Food Res.* 2024 Jun;16:101109. doi:10.1016/j.jafr.2024.101109
140. Roobab U, Abida A, Chacha JS, Athar A, Madni GM, Ranjha MMAN, et al. Applications of Innovative Non-Thermal Pulsed Electric Field Technology in Developing Safer and Healthier Fruit Juices. *Molecules.* 2022 Jun 23;27(13):4031. doi:10.3390/molecules27134031
141. Gómez B, Munekata PES, Gavahian M, Barba FJ, Martí-Quijal FJ, Bolumar T, et al. Application of pulsed electric fields in meat and fish processing industries: An overview. *Food Res Int.* 2019;123(April):95–105. doi:10.1016/j.foodres.2019.04.047 PubMed PMID: 31285034.
142. Cavalcanti RN, Balthazar CF, Margalho LP, Freitas MQ, Sant’Ana AS, Cruz AG. Pulsed electric field-based technology for microbial inactivation in milk and dairy products. *Curr Opin Food Sci.* 2023 Dec;54:101087. doi:10.1016/j.cofs.2023.101087
143. Bhat ZF, Morton JD, Mason SL, Bekhit AEDA. Current and future prospects for the use of pulsed electric field in the meat industry. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(10):1660–74. doi:10.1080/10408398.2018.1425825 PubMed PMID: 29393666.
144. Ji F, Sun J, Sui Y, Qi X, Mao X. Microbial inactivation of milk by low intensity direct current electric field: Inactivation kinetics model and milk characterization.

- Curr Res Food Sci. 2022;5:1906–15. doi:10.1016/j.crfs.2022.10.015
145. Ariza-Gracia MÁ, Cabello MP, Cebrián G, Calvo B, Álvarez I. Experimental and computational analysis of microbial inactivation in a solid by ohmic heating using pulsed electric fields. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2020 Oct;65:102440. doi:10.1016/j.ifset.2020.102440
146. Ranjha MMAN, Kanwal R, Shafique B, Arshad RN, Irfan S, Kieliszek M, et al. A Critical Review on Pulsed Electric Field: A Novel Technology for the Extraction of Phytoconstituents. *Molecules.* 2021 Aug 12;26(16):4893. doi:10.3390/molecules26164893
147. Nuccitelli R. Application of Pulsed Electric Fields to Cancer Therapy. *Bioelectricity.* 2019 Mar;1(1):30–4. doi:10.1089/bioe.2018.0001
148. Kantala C, Supasin S, Intra P, Rattanadecho P. Evaluation of Pulsed Electric Field and Conventional Thermal Processing for Microbial Inactivation in Thai Orange Juice. *Foods.* 2022 Apr 12;11(8):1102. doi:10.3390/foods11081102
149. Gavahian M, Tiwari BK. Moderate electric fields and ohmic heating as promising fermentation tools. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2020;64:102422. doi:10.1016/j.ifset.2020.102422
150. Müller WA, Ferreira Marczak LD, Sarkis JR. Microbial inactivation by ohmic heating: Literature review and influence of different process variables. *Trends Food Sci Technol.* 2020 May;99:650–9. doi:10.1016/j.tifs.2020.03.021
151. Harris F, Dennison SR, Phoenix DA. The Antimicrobial Effects of Ultrasound. *Nov Antimicrob Agents Strateg.* 2014;331–56. doi:10.1002/9783527676132.ch11
152. Majid I, Nayik GA, Nanda V. Ultrasonication and food technology: A review. Yildiz F, editor. *Cogent Food Agric.* 2015 Dec 31;1(1):1071022. doi:10.1080/23311932.2015.1071022
153. Hernández-Hernández HM, Moreno-Vilet L, Villanueva-Rodríguez SJ. Current status of emerging food processing technologies in Latin America: Novel non-thermal processing. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2019;58:102233. doi:10.1016/j.ifset.2019.102233
154. Pyatkovskyy TI, Shynkaryk M V, Mohamed HM, Yousef AE, Sastry SK. Effects

- of combined high pressure (HPP), pulsed electric field (PEF) and sonication treatments on inactivation of *Listeria innocua*. *J Food Eng.* 2018;233:49–56. doi:10.1016/j.jfoodeng.2018.04.002
155. Wu X, Narsimhan G. Synergistic effect of low power ultrasonication on antimicrobial activity of melittin against *Listeria monocytogenes*. *LWT.* 2017 Jan;75:578–81. doi:10.1016/j.lwt.2016.10.008
156. Andaluz-Mejía L, Ruiz-De Anda D, Ozuna C. Non-Thermal Technologies Combined with Antimicrobial Peptides as Methods for Microbial Inactivation: A Review. *Processes.* 2022 May 17;10(5):995. doi:10.3390/pr10050995
157. Lee H, Kim H, Cadwallader KR, Feng H, Martin SE. Sonication in combination with heat and low pressure as an alternative pasteurization treatment – Effect on *Escherichia coli* K12 inactivation and quality of apple cider. *Ultrason Sonochem.* 2013 Jul;20(4):1131–8. doi:10.1016/j.ultsonch.2013.01.003
158. Zinoviadou KG, Galanakis CM, Brnčić M, Grimi N, Boussetta N, Mota MJ, et al. Fruit juice sonication: Implications on food safety and physicochemical and nutritional properties. *Food Res Int.* 2015 Nov;77:743–52. doi:10.1016/j.foodres.2015.05.032
159. Bucciol F, Lamberti L, Cravotto G. Application of sonication in the food industry. In: *Non-thermal Food Processing Operations* [Internet]. Elsevier; 2023. p. 465–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012818717300007X> doi:10.1016/B978-0-12-818717-3.00007-X
160. Nutter J, Correa de Carvalho M, Zarbo Colombo AA, Jagus RJ, Agüero MV. Thermal and nonthermal sonication: Extraction of bioactive compounds from beet leaves and microbiological quality of extracts. *J Food Process Eng.* 2023 Jun 9;46(6):e14294. doi:10.1111/jfpe.14294
161. S. Alsaedy N, F. Almilly R, Al-Shannag M. Testing of a Potentially Used Antiseptic Consists of Povidon Iodine, Hydrogen Peroxide and Aloe Vera. *Iraqi J Chem Pet Eng.* 2023;24(1):105–12. doi:10.31699/ijcpe.2023.1.12
162. Makhayeva DN, Irmukhametova GS, Khutoryanskiy V V. Advances in

- antimicrobial polymeric iodophors. *Eur Polym J.* 2023 Dec;201:112573.  
doi:10.1016/j.eurpolymj.2023.112573
163. Pinna A, Donadu MG, Usai D, Dore S, D'Amico-Ricci G, Boscia F, et al. In vitro antimicrobial activity of a new ophthalmic solution containing povidone-iodine 0.6% ( IODIM ® ). *Acta Ophthalmol.* 2020 Mar 5;98(2):e178-80.  
doi:10.1111/aos.14243
164. Sanitizers. In: *Principles of Food Sanitation* [Internet]. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2006. p. 165–89. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/0-387-25085-9\\_10](http://link.springer.com/10.1007/0-387-25085-9_10) doi:10.1007/0-387-25085-9\_10
165. Makhayeva DN, Irmukhametova GS, Khutoryanskiy V V. Polymeric Iodophors: Preparation, Properties, and Biomedical Applications. *Rev J Chem.* 2020;10(1–2):40–57. doi:10.1134/s2079978020010033
166. Gottardi W. Iodine as Disinfectant. In: *Iodine Chemistry and Applications* [Internet]. Wiley; 2014. p. 375–410. Available from: <https://scihub.se/https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9781118909911.ch20> doi:10.1002/9781118909911.ch20
167. Watkinson W. Chemistry of detergents and disinfectants. *Cleaning-in-Place: Dairy, Food and Beverage Operations.* [Internet]. Tamime A, editor. Wiley; 2008. 56–80 p. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781444302240> doi:10.1002/9781444302240
168. Singh M, Fisher J. Cleaning and disinfection in the brewing industry. In: *Brewing Microbiology* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2003. p. 337–66. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-9250-5\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-9250-5_11) doi:10.1007/978-1-4419-9250-5\_11
169. Kampf G. Sodium Hypochlorite. In: *Antiseptic Stewardship* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2024. p. 267–343. Available from: [https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-66074-0\\_10](https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-66074-0_10) doi:10.1007/978-3-031-66074-0\_10
170. Tomičić R, Tomičić Z, Nićetin M, Knežević V, Raspor P. Food grade

- disinfectants based on hydrogen peroxide / peracetic acid and sodium hypochlorite interfere with the adhesion of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel of differing surface r. *Biofouling*. 2023;39(9–10):990–1003.  
doi:10.1080/08927014.2023.2288886
171. Liu H, Zhang J, Liu J, Cao G, Xu F, Li X. Bactericidal Mechanisms of Chlorine Dioxide against Beta-Hemolytic *Streptococcus* CMCC 32210. *Curr Issues Mol Biol*. 2023;45(6):5132–44. doi:10.3390/cimb45060326 PubMed PMID: 37367075.
172. Gallandat K, Kolus RC, Julian TR, Lantagne DS. A systematic review of chlorine-based surface disinfection efficacy to inform recommendations for low-resource outbreak settings. *Am J Infect Control*. 2021 Jan;49(1):90–103.  
doi:10.1016/j.ajic.2020.05.014
173. Maciel PMF, Fava N de MN, Lamon AW, Fernandez-Ibañez P, Byrne JA, Sabogal-Paz LP. Household water purification system comprising cartridge filtration, UVC disinfection and chlorination to treat turbid raw water. *J Water Process Eng*. 2021 Oct;43:102203. doi:10.1016/j.jwpe.2021.102203
174. Crider YS, Tsuchiya M, Mukundwa M, Ray I, Pickering AJ. Adoption of Point-of-Use Chlorination for Household Drinking Water Treatment: A Systematic Review. *Environ Health Perspect*. 2023 Jan;131(1). doi:10.1289/EHP10839
175. Cano C, Meneses Y, Chaves BD. Application of Peroxyacetic Acid for Decontamination of Raw Poultry Products and Comparison to Other Commonly Used Chemical Antimicrobial Interventions: A Review. *J Food Prot*. 2021 Oct;84(10):1772–83. doi:10.4315/JFP-21-107
176. Mokgatla RM, Gouws PA, Brözel VS. Mechanisms contributing to hypochlorous acid resistance of a *Salmonella* isolate from a poultry-processing plant. *J Appl Microbiol*. 2002;92(3):566–73. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01565.x PubMed PMID: 11872134.
177. Ampiauw RE, Yaqub M, Lee W. Electrolyzed water as a disinfectant: A systematic review of factors affecting the production and efficiency of hypochlorous acid. *J*

- Water Process Eng. 2021 Oct;43:102228. doi:10.1016/j.jwpe.2021.102228
178. Ren S, Zhang Q, Yuan M, Cui C, Qiu S, Deng F. Enhanced electrolytic production of hypochlorous acid using phosphorus-modified carbon felt electrodes: A study in disinfectant synthesis. *Chemosphere*. 2024 Oct;365:143367. doi:10.1016/j.chemosphere.2024.143367
  179. Murashevych B, Girenko D, Maslak H, Stepanskyi D, Abraimova O, Netronina O, et al. Acute inhalation toxicity of aerosolized electrochemically generated solution of sodium hypochlorite. *Inhal Toxicol*. 2022 Jan 28;34(1–2):1–13. doi:10.1080/08958378.2021.2013348
  180. Lawal-Ayinde BM, Morita T, Oda K, Nazmul T, Kurose M, Nomura T, et al. Virus purification highlights the high susceptibility of SARS-CoV-2 to a chlorine-based disinfectant, chlorous acid. *PLoS One*. 2023;18(7 July):1–13. doi:10.1371/journal.pone.0288634 PubMed PMID: 37450488.
  181. Achanta S, Jordt SE. Toxic effects of chlorine gas and potential treatments: a literature review. *Toxicol Mech Methods*. 2021 May 4;31(4):244–56. doi:10.1080/15376516.2019.1669244
  182. Gon G, Dansero L, Aiken AM, Bottomley C, Dancer SJ, Graham WJ, et al. A Better Disinfectant for Low-Resourced Hospitals? A Multi-Period Cluster Randomised Trial Comparing Hypochlorous Acid with Sodium Hypochlorite in Nigerian Hospitals : The EWASH Trial. *Microorganisms*. 2022;10(5):910. doi:https://doi.org/10.3390/microorganisms10050910
  183. Onodera S, Yamada K, Jamaji Y, Ishikura S, Suzuki S. Chemical changes of organic compounds in chlorinated water. *J Chromatogr A*. 1986 Jan;354:293–303. doi:10.1016/S0021-9673(01)87030-8
  184. Lim K, Li WY, Dinata A, Ho ET. Comparing the antibacterial efficacy and functionality of different commercial alcohol-based sanitizers. *PLoS One*. 2023;18(3 March):1–11. doi:10.1371/journal.pone.0282005 PubMed PMID: 36972234.
  185. Abuga K, Nyamweya N. Alcohol-Based Hand Sanitizers in COVID-19 Prevention: A Multidimensional Perspective. *Pharmacy*. 2021;9(1):64.

- doi:10.3390/pharmacy9010064
186. Lee J, Jing J, Yi TP, Bose RJC, Mccarthy JR, Tharmalingam N, et al. Hand Sanitizers: A Review on Formulation Aspects, Adverse Effects, and Regulations. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(9):3326.  
doi:<https://doi.org/10.3390/ijerph17093326>
187. Wang Q, Gao J, Chen H, Liu Y, Fu X, An J, et al. Removal of antibiotic resistant bacteria by the coupled system of ferrous ion activated peroxy monosulfate (PMS) and sodium percarbonate (SPC): Performance and mechanisms. *Chem Eng J*. 2024 Jul;491:152046. doi:10.1016/j.cej.2024.152046
188. Sofokleous P, Ali S, Wilson P, Buanz A, Gaisford S, Mistry D, et al. Sustained antimicrobial activity and reduced toxicity of oxidative biocides through biodegradable microparticles. *Acta Biomater*. 2017 Dec;64:301–12.  
doi:10.1016/j.actbio.2017.10.001
189. Boyce JM, Havill NL, Otter JA, McDonald LC, Adams NMT, Cooper T, et al. Impact of Hydrogen Peroxide Vapor Room Decontamination on *Clostridium difficile* Environmental Contamination and Transmission in a Healthcare Setting. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008 Aug 2;29(8):723–9. doi:10.1086/589906
190. Havill NL, Moore BA, Boyce JM. Comparison of the Microbiological Efficacy of Hydrogen Peroxide Vapor and Ultraviolet Light Processes for Room Decontamination. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012 May 2;33(5):507–12.  
doi:10.1086/665326
191. Otter JA, Puchowicz M, Ryan D, Salkeld JAG, Cooper TA, Havill NL, et al. Feasibility of Routinely Using Hydrogen Peroxide Vapor to Decontaminate Rooms in a Busy United States Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30(6):574–7. doi:10.1086/597544 PubMed PMID: 19415969.
192. Bauermeister LJ, Bowers JWJ, Townsend JC, McKee SR. The Microbial and Quality Properties of Poultry Carcasses Treated with Peracetic Acid as an Antimicrobial Treatment. *Poult Sci*. 2008 Nov;87(11):2390–8.  
doi:10.3382/ps.2008-00087
193. Leggett MJ, Spencer Schwarz J, Burke PA, McDonnell G, Denyer SP, Maillard

- JY. Mechanism of sporicidal activity for the synergistic combination of peracetic acid and hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(4):1035–9. doi:10.1128/AEM.03010-15 PubMed PMID: 26637595.
194. Stearns R, Freshour A, Shen C. Literature review for applying peroxyacetic acid and/or hydrogen peroxide to control foodborne pathogens on food products. *J Agric Food Res.* 2022 Dec;10:100442. doi:10.1016/j.jafr.2022.100442
195. Kunigk L, Gomes DR, Forte F, Vidal KP, Gomes LF, Sousa PF. The influence of temperature on the decomposition kinetics of peracetic acid in solutions. *Brazilian J Chem Eng.* 2001 Jun;18(2):217–20. doi:10.1590/S0104-66322001000200009
196. Osimitz TG, Droege W. Quaternary ammonium compounds: perspectives on benefits, hazards, and risk. *Toxicol Res Appl.* 2021 Jan 8;5. doi:10.1177/23978473211049085
197. Jennings MC, Minbiole KPC, Wuest WM. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. *ACS Infect Dis.* 2015 Jul 10;1(7):288–303. doi:10.1021/acsinfecdis.5b00047
198. Fazlara A, Ekhtelat M. The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. *Am J Agric Environ Sci.* 2012;12(1):23–9.
199. Suarez DL, Spackman E, Senne DA, Bulaga L, Welsch AC, Froberg K. The Effect of Various Disinfectants on Detection of Avian Influenza Virus by Real Time RT-PCR. *Avian Dis.* 2003 Sep;47(s3):1091–5. doi:10.1637/0005-2086-47.s3.1091
200. Yim JH, Song KY, Kim H, Bae D, Chon JW, Seo KH. Effectiveness of calcium hypochlorite, quaternary ammonium compounds, and sodium hypochlorite in eliminating vegetative cells and spores of *Bacillus anthracis* surrogate. *J Vet Sci.* 2021;22(1). doi:10.4142/jvs.2021.22.e11
201. Pyatkovskyy T. Application of gaseous ozone and its aqueous solution for inactivation of pathogenic microorganisms: A literature review. *Bull Med Biol Res.* 2023 Aug 4;5(3):47–57. doi:10.61751/bmbr.2706-6290.2023.3.47
202. Pyatkovskyy T. Inactivation of microorganisms by high hydrostatic pressure: A

- literature review. *Bull Med Biol Res.* 2023;5(4):53–61.  
doi:10.61751/bmbr/4.2023.53
203. Pyatkovskyy T, Pokryshko O. Antimicrobial activity of ozonated oils and their applications in medicine – a narrative review. *Eur J Clin Exp Med.* 2025;23(2):512–7. doi:10.15584/ejcem.2025.2.28
204. Pokryshko O, Pyatkovskyy T. Alcohol-based hand sanitizers in Ukraine: a comparative evaluation of their effectiveness. *Перспективи та інновації науки.* 2025 Jul 8;52(6):1683–96. doi:10.52058/2786-4952-2025-6(52)-1683-1696
205. Покришко О, Красій Н, П'ятковський Т. Скринінгове вивчення ефективності спиртовмісних антисептичних засобів для рук. In: *Довкілля і здоров'я: матеріали XXIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю.* Тернопіль, Україна: Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського; 2024. p. 98–100.
206. Minogue TD, Daligault HA, Davenport KW, Bishop-Lilly KA, Broomall SM, Bruce DC, et al. Complete Genome Assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922, a Serotype O6 Reference Strain. *Genome Announc.* 2014 Oct 30;2(5):e00969-14. doi:10.1128/genomeA.00969-14
207. Makarova O, Johnston P, Walther B, Rolff J, Roesler U. Complete Genome Sequence of the Disinfectant Susceptibility Testing Reference Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538. *Genome Announc.* 2017 May 11;5(19):e00293-17. doi:10.1128/genomeA.00293-17
208. Haykir O, Mohácsi-Farkas C, Engelhardt T. Enhanced heat resistance of *Listeria innocua* as a surrogate of *Listeria monocytogenes* after sublethal heat treatment. *Acta Aliment.* 2022 Jun 13;51(2):241–8. doi:10.1556/066.2022.00013
209. Li H, Tajkarimi M, Osburn BI. Impact of vacuum cooling on *Escherichia coli* O157:H7 infiltration into lettuce tissue. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(10):3138–42. doi:10.1128/AEM.02811-07
210. Yesil M, Kasler DR, Huang E, Yousef AE. Efficacy of Gaseous Ozone Application during Vacuum Cooling against *Escherichia coli* O157:H7 on Spinach Leaves as Influenced by Bacterium Population Size. *J Food Prot.* 2017

- Jul;80(7):1066–71. doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-284
211. Perry JJ, Yousef AE. Factors Affecting Thermal Resistance of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis ODA 99-30581-13 in Shell Egg Contents and Use of Heat-Ozone Combinations for Egg Pasteurization. *J Food Prot.* 2013 Feb;76(2):213–9. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-324
212. Rodríguez-Peña M, Pérez JAB, Llanos J, Saez C, Barrera-Díaz CE, Rodrigo MA. Understanding ozone generation in electrochemical cells at mild pHs. *Electrochim Acta.* 2021 Apr;376:138033. doi:10.1016/j.electacta.2021.138033
213. Wang BB. Research on drinking water purification technologies for household use by reducing total dissolved solids (TDS). Dhaka MS, editor. *PLoS One.* 2021 Sep 28;16(9):e0257865. doi:10.1371/journal.pone.0257865
214. Chen Z, Zhu C, Zhang Y, Niu D, Du J. Effects of aqueous chlorine dioxide treatment on enzymatic browning and shelf-life of fresh-cut asparagus lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biol Technol.* 2010;58(3):232–8. doi:10.1016/j.postharvbio.2010.06.004
215. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1994;32:5–8. doi:10.1385/0-89603-268-x:5
216. Park HS, Yang J, Choi HJ, Kim KH. Effective Thermal Inactivation of the Spores of *Bacillus cereus* Biofilms Using Microwave. *J Microbiol Biotechnol.* 2017 Jul 28;27(7):1209–15. doi:10.4014/jmb.1702.02009
217. Zhao W, Yang R, Shen X, Zhang S, Chen X. Lethal and sublethal injury and kinetics of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk by pulsed electric fields. *Food Control.* 2013 Jul;32(1):6–12. doi:10.1016/j.foodcont.2012.11.029
218. Weinstein MP, Lewis JS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 30th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA. 2020. 332 p. doi:10.1128/JCM.01864-19 PubMed PMID: 31915289.
219. Pyatkovskyy T, Pokryshko O. Comparison of the ergonomics of plating techniques. *Ann Mechnikov Institute, N 2, 2023.* 2023;(2):45–8. doi:10.5281/zenodo.8048366

220. П'ятковський Т, Покришко О. Використання методу Копакабана для інокуляції суспензії мікроорганізмів на щільні живильні середовища. In: Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині: матеріали підсумкової III науково-практичної міжнародної дистанційної конференції. Харків, Україна: Національний фармацевтичний університет; 2023. p. 52–3.
221. П'ятковський Т, Покришко О. Патент України на корисну модель №155668, МПК C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/66 (2015.01) Спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища. Україна: Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського; u202302947, 2023.
222. Cassin MH, Lammerding AM, Todd ECD, Ross W, McColl RS. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int J Food Microbiol.* 1998;41(1):21–44. doi:10.1016/S0168-1605(98)00028-2
223. Ackers ML, Mahon BE, Leahy E, Goode B, Damrow T, Hayes PS, et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis.* 1998;177(6):1588–93. doi:10.1086/515323
224. Underwood W, Melotto M, He SY. Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell Microbiol.* 2007;9(7):1621–9. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00938.x
225. Rodgers SL, Cash JN, Siddiq M, Ryser ET. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *J Food Prot.* 2004;67(4):721–31. doi:10.4315/0362-028X-67.4.721
226. Ahmad MS, Siddiqui MW. Factors Affecting Postharvest Quality of Fresh Fruits. In: *Postharvest Quality Assurance of Fruits* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 7–32. Available from: [https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-21197-8\\_2](https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-21197-8_2) doi:10.1007/978-3-319-21197-8\_2
227. Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry S. Postharvest ozone gas and liquid sanitizer combinational treatment of baby spinach for inactivation of *E. coli* O157:H7. In: *IFT Annual Meeting & Food Expo*. Chicago, IL, USA; 2013.

228. Shynkaryk M, Pyatkovskyy T, Yousef A, Sastry S. Pilot scale combinational treatment of baby spinach with ozone gas and liquid sanitizer for inactivation of *E. coli* O157:H7. In: IFT Annual Meeting & Food Expo. Chicago, IL, USA; 2015. p. 223.
229. Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry S. Baby spinach sanitation by combination of gaseous ozone and liquid sanitizer. In: Conference of Food Engineering (CoFE 2016). Columbus, OH, USA; 2016. p. 150.
230. Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry S. Baby spinach combinational treatment with gaseous ozone and liquid sanitizers for inactivation of *E. coli* O157:H7. In: Conference of Food Engineering (CoFE 2014). Omaha, NE, USA; 2014.
231. Cahoon LB. Water Purification: Treatment of Microbial Contamination. *Advances in Water Purification Techniques: Meeting the Needs of Developed and Developing Countries* [Internet]. Elsevier Inc.; 2019. 385–395 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814790-0.00015-6> doi:10.1016/B978-0-12-814790-0.00015-6
232. McDonald K, Sun DW. Vacuum cooling technology for the food processing industry: A review. *J Food Eng.* 2000;45(2):55–65. doi:10.1016/S0260-8774(00)00041-8
233. Vonasek E, Nitin N. Influence of vacuum cooling on *Escherichia coli* O157: H7 infiltration in fresh leafy greens via a multiphoton-imaging approach. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(1):106–15. doi:10.1128/AEM.02327-15
234. Vurma M, Pandit RB, Sastry SK, Yousef AE. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and natural microbiota on spinach leaves using gaseous ozone during vacuum cooling and simulated transportation. *J Food Prot.* 2009;72(7):1538–46. doi:10.4315/0362-028X-72.7.1538
235. Erickson MC, Webb CC, Diaz-Perez JC, Phatak SC, Silvoy JJ, Davey L, et al. Surface and internalized *Escherichia coli* O157: H7 on field-grown spinach and lettuce treated with spray-contaminated irrigation water. *J Food Prot.* 2010;73(6):1023–9. doi:10.4315/0362-028X-73.6.1023

236. Erickson MC. Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2012;3(1):283–310. doi:10.1146/annurev-food-022811-101211
237. Unger-Bimczok B, Kottke V, Hertel C, Rauschnabel J. The influence of humidity, hydrogen peroxide concentration, and condensation on the inactivation of *geobacillus stearothermophilus* spores with hydrogen peroxide vapor. *J Pharm Innov.* 2008;3(2):123–33. doi:10.1007/s12247-008-9027-1
238. Pyatkovskyy T, Ranjbaran M, Datta AK, Sastry SK. Factors affecting contamination and infiltration of *Escherichia coli* K12 into spinach leaves during vacuum cooling. *J Food Eng.* 2021;311. doi:10.1016/j.jfoodeng.2021.110735
239. Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry S. Gaseous ozone treatment of baby spinach inoculated with *E. coli* O157:H7. In: IFT Annual Meeting & Food Expo. New Orleans, LA, USA; 2014.
240. Shynkaryk MV, Mohamed HM, Pyatkovskyy TI, Yousef AE, Sastry SK. Engineering Aspects of Fresh Produce Safety. In: Conference of Food Engineering (CoFE 2016). Columbus, OH, USA; 2016. p. 143.
241. Shynkaryk M, Pyatkovskyy T, Sastry S. Diffusion of a sanitizer gas through leaf stomata with volumetric and surface breakdown reactions. In: The 28th International Symposium on Transport Phenomena. Peradeniya, Sri Lanka; 2017.
242. Pyatkovskyy T, Heskitt B, Sastry S. Possible ways of fresh produce contamination during vacuum cooling. In: IFT Annual Meeting & Food Expo. Chicago, IL, USA; 2018.
243. Pyatkovskyy T, Heskitt B, Sastry S. Effect of vacuum cooling on *E. coli* K 12 infiltration in fresh baby spinach. In: Conference of Food Engineering (CoFE 2018). Minneapolis, MN, USA; 2018. p. 191.
244. П'ятковський Т, Покришко О, Данилков С. Озон як засіб дезінфекції харчових продуктів (на прикладі листя шпинату) і води. In: Здобутки клінічної та експериментальної медицини: матеріали підсумкової LXVII науково-практичної конференції. Тернопіль, Україна: Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського; 2024. p. 155–7.
245. Tauxe R, Kruse H, Hedberg C, Potter M, Madden J, Wachsmuth K. Microbial

- hazards and emerging issues associated with produce: A preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiologic Criteria for Foods. *J Food Prot.* 1997;60(11):1400–8. doi:10.4315/0362-028X-60.11.1400
246. Jongen W. Improving the safety of fresh fruit and vegetables. *Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables.* 2005. 1–639 p. doi:10.1533/9781845690243
247. Carnahan JE, Jenner EL, Wat EKW. Prevention of ozone injury to plants by a new protectant chemical. *Phytopathology.* 1978;68(8):1225–9. doi:10.1094/Phyto-68-1225
248. Shynkaryk M V, Pyatkovskyy T, Mohamed HM, Yousef AE, Sastry SK. Physics of fresh produce safety: Role of diffusion and tissue reaction in sanitization of leafy green vegetables with liquid and gaseous ozone-based sanitizers. *J Food Prot.* 2015;78(12):2108–16. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-290
249. Shynkaryk M, Pyatkovskyy T, Yousef A, Sastry S. Pathogen Inactivation in Fresh Produce by Incorporation of Sanitizers into Existing Operations Within the Produce Chain. In: National Integrated Food Safety Initiative (NIFSI) Project Director Meeting. Washington, DC, USA; 2014.
250. Pereira P, Bašić F, Bogunovic I, Barcelo D. Russian-Ukrainian war impacts the total environment. *Sci Total Environ.* 2022 Sep;837:155865. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.155865
251. Hafeez A, Shamair Z, Shezad N, Javed F, Fazal T, Rehman S ur, et al. Solar powered decentralized water systems: A cleaner solution of the industrial wastewater treatment and clean drinking water supply challenges. *J Clean Prod.* 2021;289. doi:10.1016/j.jclepro.2020.125717
252. Guzel-Seydim ZB, Greene AK, Seydim AC. Use of ozone in the food industry. *LWT.* 2004;37(4):453–60. doi:10.1016/j.lwt.2003.10.014
253. Ding W, Jin W, Cao S, Zhou X, Wang C, Jiang Q, et al. Ozone disinfection of chlorine-resistant bacteria in drinking water. *Water Res.* 2019 Sep;160:339–49. doi:10.1016/j.watres.2019.05.014
254. Ikhlaq A, Qazi UY, Akram A, Rizvi OS, Sultan A, Javaid R, et al. Potable Water Treatment in a Batch Reactor Benefited by Combined Filtration and Catalytic

- Ozonation. *Water (Switzerland)*. 2022;14(15). doi:10.3390/w14152357
255. Hirahara Y, Iwata K, Nakamuro K. Effect of Citric Acid on Prolonging the Half-life of Dissolved Ozone in Water. *Food Saf.* 2019;7(4):90–4. doi:10.14252/foodsafetyfscj.d-19-00005
256. Varol K. Determination of maximum ozone concentrations and half-life of ozone in some drinking water and high quality pure water produced in new system devices. *Fresenius Environ Bull.* 2022;31(2):2285–94.
257. Seki M, Tatsuya I, Hiroshi T, Masayuki N. Microbicidal effects of stored aqueous ozone solution generated by nano-bubble technology. In *Vivo (Brooklyn)*. 2017;31(4):579–83. doi:https://doi.org/10.21873%2Finvivo.11097
258. Meunier L, Canonica S, Von Gunten U. Implications of sequential use of UV and ozone for drinking water quality. *Water Res.* 2006;40(9):1864–76. doi:10.1016/j.watres.2006.02.030
259. Gorito AM, Pesqueira JFJR, Moreira NFF, Ribeiro AR, Pereira MFR, Nunes OC, et al. Ozone-based water treatment (O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/UV, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for removal of organic micropollutants, bacteria inactivation and regrowth prevention. *J Environ Chem Eng.* 2021;9(4):10–4. doi:10.1016/j.jece.2021.105315
260. Vu HP, Nguyen LN, Zdarta J, Nga TT V., Nghiem LD. Blue-Green Algae in Surface Water: Problems and Opportunities. *Curr Pollut Reports.* 2020 Jun 27;6(2):105–22. doi:10.1007/s40726-020-00140-w
261. Shevchenko O, Bezrodnyi D. Artificial salinization of the aquifer in poltava sequence deposits in the village of tarasivka, Kyiv region. *Geochemistry Technog.* 2020 Aug;32(4):40–9. doi:10.15407/geotech2020.32.040
262. Zhang T, Tao YZ, Yang HW, Chen Z, Wang XM, Xie YF. Study on the removal of aesthetic indicators by ozone during advanced treatment of water reuse. *J Water Process Eng.* 2020 Aug;36:101381. doi:10.1016/j.jwpe.2020.101381
263. Ren X, Wu Q, Shu J, Chen C, Tiraferri A, Liu B. Efficient removal of organic matters and typical odor substances in rural drinking water using Ozone-BAC-UF combined system to meet new water quality standards in China. *Sep Purif Technol.* 2023 Dec;327:124899. doi:10.1016/j.seppur.2023.124899

264. Tripathi S, Hussain T. Water and Wastewater Treatment through Ozone-based technologies. In: Development in Wastewater Treatment Research and Processes [Internet]. Elsevier; 2022. p. 139–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323855839000156>  
doi:10.1016/B978-0-323-85583-9.00015-6
265. Hendrickson C, Oremo J, Akello OO, Bunde S, Rayola I, Akello D, et al. Decentralized solar-powered drinking water ozonation in Western Kenya: an evaluation of disinfection efficacy. *Gates Open Res.* 2020 Oct 15;4:56.  
doi:10.12688/gatesopenres.13138.2
266. Okada F, Nay K. Electrolysis for Ozone Water Production. In: Electrolysis [Internet]. InTech; 2012. p. 243–72. Available from: <http://www.intechopen.com/books/electrolysis/electrolysis-for-ozone-water-production> doi:10.5772/51945
267. Andoyo R, Prawitasari IAP, Mardawati E, Cahyana Y, Sukarminah E, Rialita T, et al. Retention time of ozone at various water condition. *J Phys Conf Ser.* 2018;1080(1):012033. doi:10.1088/1742-6596/1080/1/012033
268. Heebner A, Abbassi B. Electrolysis catalyzed ozonation for advanced wastewater treatment. *J Water Process Eng.* 2022;46:102638.
269. Gardoni D, Vailati A, Canziani R. Decay of Ozone in Water: A Review. *Ozone: Science and Engineering.* 2012. p. 233–42. doi:10.1080/01919512.2012.686354
270. Elovitz MS, von Gunten U, Kaiser HP. The Influence of Dissolved Organic Matter Character on Ozone Decomposition Rates and R ct. In. 2000. p. 248–69. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2000-0761.ch016>  
doi:10.1021/bk-2000-0761.ch016
271. Pyatkovskyy TI, Pokryshko O V, Zahrychuk HY, Danylkov SO. Kinetics of electrolytic ozone generation and decomposition in fresh water: influence of bacterial contamination and water source. *Med Clin Chem.* 2025 Mar 25;(2):50–5. doi:10.11603/mcch.2410-681X.2025.i2.15525
272. П'ятковський Т, Покришко О, Данилков С. Використання озонованої води для інактивації мікроорганізмів in vitro. In: Здобутки клінічної та

- експериментальної медицини: матеріали підсумкової LXV науково-практичної конференції. Тернопіль, Україна: Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського; 2022. р. 96–7.
273. П'ятковський Т, Покришко О, Данилков С. Знезараження прісної води електролітичним озонуванням. In: Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині: матеріали підсумкової IV науково-практичної міжнародної дистанційної конференції. Харків, Україна: Національний фармацевтичний університет; 2024. р. 147–9.
274. П'ятковський Т, Покришко О, Загречук Г, Данилков С. Динаміка концентрації озону у водному розчині в присутності бактерій. In: VII національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 180-річчю з дня народження Іллі Мечникова: матеріали науково-практичної конференції. Харків, Україна: ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України»; 2025. р. 75–6.
275. Khanashyam AC, Shanker MA, Kothakota A, Mahanti NK, Pandiselvam R. Ozone Applications in Milk and Meat Industry. *Ozone Sci Eng.* 2022 Jan 2;44(1):50–65. doi:10.1080/01919512.2021.1947776
276. Nagy A. Beauty and physics — Physics projects based on modern aesthetic and medical treatments. *J Phys Conf Ser.* 2021;1929(1):012027. doi:10.1088/1742-6596/1929/1/012027
277. Lemmen SW, Lewalter K. Antibiotic stewardship and horizontal infection control are more effective than screening, isolation and eradication. *Infection.* 2018;46(5):581–90. doi:10.1007/s15010-018-1137-1 PubMed PMID: 29796739.
278. Wesche AM, Gurtler JB, Marks BP, Ryser ET. Stress, Sublethal Injury, Resuscitation, and Virulence of Bacterial Foodborne Pathogens. *J Food Prot.* 2009 May;72(5):1121–38. doi:10.4315/0362-028X-72.5.1121
279. Yasheng T, Mijiti A, Yushan M, Liu Z, Liu Y, Yusufu A. Ozonated water lavage and physiological saline irrigation combined with vacuum-sealed drainage in the treatment of 18 cases of chronic osteomyelitis. *J Int Med Res.* 2021 Mar

- 30;49(3):030006052199953. doi:10.1177/0300060521999530
280. Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Markowski A, Chernyshova T, Danylkov S. Topical ozone application for severe acne with serological evidence of prior varicella-zoster infection after unsuccessful antibiotic and corticosteroid treatment: a case report. *J Med Case Rep.* 2025 Jul 12;19(1):337. doi:10.1186/s13256-025-05386-w
281. Климнюк С, Покришко О, П'ятковський Т, Ткачук Н. Персистенція *S.aureus* у студентів медичного університету та їх чутливість до антибіотиків. *Biomed Biosoc Anthropol.* 2010;15:14–5.
282. Ковальчук А, П'ятковський Т. Динаміка змін мікробіологічних показників експериментальних опікових ран при проведенні ранньої некректомії з використанням ліофілізованих ксенодермотрансплантатів вторинного зрізу. *Вісник наукових досліджень.* 2010;(2):46–9.
283. П'ятковський Т, Чорній Н, Покришко О. Застосування септофіту для лікування захворювань пародонта у хворих на хронічний панкреатит. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини.* 2011;(2):108–10.
284. Манащук Н, Покришко О, П'ятковський Т. Етіологічна структура захворювань пародонту у хворих на неспецифічний виразковий коліт. *Клінічна та експериментальна патологія.* 2012;39(1):110–3.
285. П'ятковський Т, Чорній Н, Покришко О. Мікробіоценоз ясенних щілин та пародонтальних кишень при гінгівіті та пародонтиті I ст. на фоні хронічного панкреатиту. *Український медичний альманах.* 2012;15(5):263–4.
286. Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Bilyk O, Danylkov S. The use of aqueous ozone solution in the treatment of mine blast injury with extensive soft tissue defects: A case study. *Int J Med Med Res.* 2024 Apr 26;10(1):47–55. doi:10.61751/ijmmr/1.2024.47
287. Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Krasii N, Danylkov S. Synergistic potential of aqueous ozone: Sublethal bacterial damage and enhanced antibiotic susceptibility. *Int J Med Med Res.* 2025 Mar 19;11(1):6–13. doi:10.63341/ijmmr/1.2025.06
288. Pyatkovskyy TI, Pokryshko O V., Bilyk O V., Danylkov SO. Ozonated water as

- an adjunct in the management of combat-induced wounds: a prospective study. Шпитальна хірургія Журнал імені Л Я Ковальчука. 2025 May 28;(2):54–60. doi:10.11603/2414-4533.2025.2.15271
289. Volch I, Mykhailyshyn H, Kravets N, Pyatkovskyy T, Bukata V. Biofilm formation and antibiotic resistance of clinical isolates from diabetic foot ulcers. Bull Med Biol Res. 2025 Sep 2;7(3):46–53. doi:10.63341/bmbr/3.2025.46
290. Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Krasii N, Danylkov S. Activity of aqueous ozone against multiresistant isolates and its impact on antibiotic sensitivity in surgical patients. In: 20th Jubilee RECOOP Bridges in Life Sciences Conference. Prague, Czech Republic: ISBN 978-615-6006-06-6; 2025. p. 22.
291. П'ятковський Т, Покришко О, Красій Н, Данилков С. Сублетальні пошкодження мікроорганізмів, спричинені водним розчином озону. In: Актуальні питання біології та медицини: матеріали XXI всеукраїнської наукової конференції. Полтава, Україна: ДЗ «Луганський національний університет імені Тараса Шевченка»; 2025.
292. Покришко О, Красій Н, П'ятковський Т. Етіологія гнійно-запальних інфекцій м'яких тканин у учасників бойових дій та цивільних осіб. In: Матеріали XVI з'їзду Товариства мікробіологів України імені С. Виноградського. Тернопіль, Україна: Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського; 2025. p. 199.
293. Волч І, Михайлишин Г, Кравець Н, П'ятковський Т. Оцінка антибіотикочутливості та здатності до формування біоплівки клінічних штамів, виділених з виразок діабетичної стопи. In: Практична медицина військового часу: Матеріали науково-практичної конференції. Харків, Україна: ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України»; 2025. p. 12–3.
294. Tao Y, Sun DW, Hogan E, Kelly AL. High-Pressure Processing of Foods: An Overview. Emerging Technologies for Food Processing. 2014. 3–24 p. doi:10.1016/B978-0-12-411479-1.00001-2
295. Patterson MF. Microbiology of pressure-treated foods. J Appl Microbiol.

- 2005;98(6):1400–9. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02564.x
296. Mok JH, Pyatkovskyy T, Yousef A, Sastry SK. Combined effect of shear stress and moderate electric field on the inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple juice. *J Food Eng.* 2019;262:121–30. doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.05.019
297. Hauck-Tiburski J, Rosenthal A, Iaconelli C, Perrier-Cornet JM, Gervais P. Inactivation of dried spores of *Bacillus subtilis* 168 by a treatment combining high temperature and pressure. *Int J Food Microbiol.* 2019 Apr;295:1–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.017
298. Rao L, Zhao L, Wang Y, Chen F, Hu X, Setlow P, et al. Mechanism of inactivation of *Bacillus subtilis* spores by high pressure CO<sub>2</sub> at high temperature. *Food Microbiol.* 2019 Sep;82:36–45. doi:10.1016/j.fm.2019.01.014
299. Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol.* 2007 May 15;73(10):3283–90. doi:10.1128/AEM.02750-06
300. Perry JJ, Rodriguez-Romo LA, Yousef AE. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in shell eggs by sequential application of heat and ozone. *Lett Appl Microbiol.* 2008 Jun;46(6):620–5. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02367.x
301. Hu M, Gurtler JB. Selection of Surrogate Bacteria for Use in Food Safety Challenge Studies: A Review. *J Food Prot.* 2017 Sep;80(9):1506–36. doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-536
302. Gurtler JB. Evaluation of plating media for recovering *Salmonella* from thermally treated egg albumen. *J Appl Poult Res.* 2009 Jul;18(2):297–309. doi:10.3382/japr.2008-00109
303. Wang LH, Pyatkovskyy T, Yousef A, Zeng XA, Sastry SK. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation induced by moderate electric fields. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2020;62(April):102349. doi:10.1016/j.ifset.2020.102349
304. Kasler DR, Pyatkovskyy T, Yousef AE, Sastry SK. Effect of moderate electric field pretreatment in combination with ozonation on inactivation of *Escherichia*

- coli K12 in intact shell eggs. *LWT*. 2020;127. doi:10.1016/j.lwt.2020.109338
305. Zhu J, Wang Y, Li X, Li B, Liu S, Chang N, et al. Combined effect of ultrasound, heat, and pressure on *Escherichia coli* O157:H7, polyphenol oxidase activity, and anthocyanins in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) juice. *Ultrason Sonochem*. 2017;37:251–9. doi:10.1016/j.ultsonch.2017.01.017
306. Palaniappan S, Sastry SK. Electrical conductivity of selected juices: influences of temperature, solids content, applied voltage, and particle size. *J Food Process Eng*. 1991;14(4):247–60. doi:10.1111/j.1745-4530.1991.tb00135.x
307. Kato M, Hayashi R. Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999;63(8):1321–8. doi:10.1271/bbb.63.1321
308. San Martín MF, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2002;42(6):627–45. doi:10.1080/20024091054274
309. Doona CJ, Ghosh S, Feeherry FF, Ramirez-Peralta A, Huang Y, Chen H, et al. High pressure germination of *Bacillus subtilis* spores with alterations in levels and types of germination proteins. *J Appl Microbiol*. 2014;117(3):711–20. doi:10.1111/jam.12557
310. Laflamme C, Lavigne S, Ho J, Duchaine C. Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. *J Appl Microbiol*. 2004;96(4):684–92. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02184.x
311. Herbert KC, Foster SJ. Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: Characterization of the response and the role of known and novel components. *Microbiology*. 2001;147(8):2275–84. doi:10.1099/00221287-147-8-2275
312. Saulis G. Electroporation of cell membranes: The fundamental effects of pulsed electric fields in food processing. *Food Eng Rev*. 2010;2(2):52–73. doi:10.1007/s12393-010-9023-3
313. Lado BH, Yousef AE. Alternative food-preservation technologies: Efficacy and mechanisms. *Microbes Infect*. 2002;4(4):433–40. doi:10.1016/S1286-4579(02)01557-5

314. Ananta E, Voigt D, Zenker M, Heinz V, Knorr D. Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. *J Appl Microbiol.* 2005;99(2):271–8. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02619.x
315. Li J, Ahn J, Liu D, Chen S, Ye X, Ding T. Evaluation of ultrasound-induced damage to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(6):1828–37. doi:10.1128/AEM.03080-15
316. Ananta E, Heinz V, Knorr D. Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiol.* 2004;21(5):567–77. doi:10.1016/j.fm.2003.11.008
317. Shynkaryk M V, Pyatkovskyy T, Yousef AE, Sastry SK. In-situ monitoring of inactivation of *Listeria innocua* under high hydrostatic pressure using electrical conductivity measurement. *J Food Eng.* 2020;285. doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110087
318. Shynkaryk M, Pyatkovskyy T, Yousef A, Sastry S. Electrical conductivity: an indicator of high hydrostatic pressure-induced bacterial cell damage. In: *Conference of Food Engineering (CoFE 2014)*. Omaha, NE, USA; 2014.
319. Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Res.* 2005 Sep;39(15):3650–6. doi:10.1016/j.watres.2005.06.006
320. Hirneisen KA, Kniel KE. Inactivation of internalized and surface contaminated enteric viruses in green onions. *Int J Food Microbiol.* 2013 Sep;166(2):201–6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.013
321. Hiroshi T, Mieji S, Kousuke I, Yoshiaki M, Tanaka H, Sakurai M, et al. Inactivation of Influenza Virus by Ozone Gas. *IHI Eng Rev.* 2009;42(2):108–11.
322. Yano H, Nakano R, Suzuki Y, Nakano A, Kasahara K, Hosoi H. Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by gaseous ozone treatment. *J Hosp Infect.* 2020 Dec;106(4):837–8. doi:10.1016/j.jhin.2020.10.004
323. Hudson JB, Sharma M, Vimalanathan S. Development of a Practical Method for

- Using Ozone Gas as a Virus Decontaminating Agent. *Ozone Sci Eng.* 2009 May 29;31(3):216–23. doi:10.1080/01919510902747969
324. Wang Q, Markland S, Kniel KE. Inactivation of Human Norovirus and Its Surrogates on Alfalfa Seeds by Aqueous Ozone. *J Food Prot.* 2015 Aug;78(8):1586–91. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-029
325. Sangsanont J, Kurisu F, Furumai H, Katayama H. Ozone disinfection kinetics of poliovirus 1 determined by cell culture assay, RT-qPCR and ethidium monoazide qPCR reduction in a continuous quench-flow reactor. *J Appl Microbiol.* 2020 Dec 10;129(6):1530–40. doi:10.1111/jam.14787
326. Blanchard EL, Lawrence JD, Noble JA, Xu M, Joo T, Ng NL, et al. Enveloped Virus Inactivation on Personal Protective Equipment by Exposure to Ozone. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci.* 2020. doi:10.1101/2020.05.23.20111435 PubMed PMID: 32511511.
327. Khadre MA, Yousef AE. Susceptibility of Human Rotavirus to Ozone, High Pressure, and Pulsed Electric Field. *J Food Prot.* 2002 Sep;65(9):1441–6. doi:10.4315/0362-028X-65.9.1441
328. Rocha-Pimienta J, Martillanes S, Ramírez R, Garcia-Parra J, Delgado-Adamez J. *Bacillus cereus* spores and *Staphylococcus aureus* sub. *aureus* vegetative cells inactivation in human milk by high-pressure processing. *Food Control.* 2020 Jul;113:107212. doi:10.1016/j.foodcont.2020.107212
329. Stratakos AC, Inguglia ES, Linton M, Tollerton J, Murphy L, Corcionivoschi N, et al. Effect of high pressure processing on the safety, shelf life and quality of raw milk. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2019;52(January):325–33. doi:10.1016/j.ifset.2019.01.009
330. Yang D, Li R, Dong P, Rao L, Wang Y, Liao X. Influence of pressurization rate and mode on cell damage of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by high hydrostatic pressure. *Front Microbiol.* 2023 Mar 2;14:1108194. doi:10.3389/fmicb.2023.1108194
331. Allison A, Daniels E, Chowdhury S, Fouladkhah A. Effects of Elevated Hydrostatic Pressure against Mesophilic Background Microflora and Habituated

- Salmonella Serovars in Orange Juice. *Microorganisms*. 2018 Mar 9;6(1):23.  
doi:10.3390/microorganisms6010023
332. Jackowska-Tracz A, Tracz M. Effects of high hydrostatic pressure on *Campylobacter jejuni* in poultry meat. *Pol J Vet Sci*. 2015;18(2):261–6.  
doi:10.1515/pjvs-2015-0034 PubMed PMID: 26172174.
333. Hsu H, Sheen S, Sites J, Cassidy J, Scullen B, Sommers C. Effect of High Pressure Processing on the survival of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (Big Six vs. O157:H7) in ground beef. *Food Microbiol*. 2015 Jun;48:1–7.  
doi:10.1016/j.fm.2014.12.002
334. Mukhopadhyay S, Sokorai K, Ukuku D, Fan X, Juneja V, Sites J, et al. Inactivation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe puree by high hydrostatic pressure with/without added ascorbic acid. *Int J Food Microbiol*. 2016 Oct;235:77–84. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.007
335. Sheen S, Cassidy J, Scullen B, Uknalis J, Sommers C. Inactivation of *Salmonella* spp. in ground chicken using high pressure processing. *Food Control*. 2015 Nov;57:41–7. doi:10.1016/j.foodcont.2015.04.005
336. Gracia MJ, Lázaro R, Pérez-Arquillué C, Pagán R, Ramos S, Garcia JL, et al. High-pressure processing (HPP) of raw and dry-cured ham from experimentally infected pigs as a potential tool for the risk control of *Toxoplasma gondii*. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2020;61(February):102315.  
doi:10.1016/j.ifset.2020.102315

## ДОДАТКИ

### Додаток А1

**Таблиця 1.1.** Інактивація мікроорганізмів озоном

Збудник	Інактивація (lg КУО)	Час обробки (хв)	Концентрація озону (мг/л)	Температура ( °С)	Субстрат	Тип обробки	Посилання
<i>Bacillus cereus</i> (вегетативні клітини)	3,62	420	0,4	20 ± 3	Приготований рис, інокульований бактеріальною суспензією	Газоподібний озон	[82]
<i>Bacillus subtilis</i> (спори)	5,2	3	140	Не вказана	Суспензія спор у буферному розчині	Озон розчинений у буферному розчині	[84]
<i>Clostridium perfringens</i> - вегетативні клітини - спори	1,5 0,87	5	5	4 → 45 4 → 55	Суспензія мікроорганізмів нанесена на шматочки яловичини	Озонована вода (метод озонування не вказаний)****	[83]

<i>Enterococcus faecalis</i>	98 %***	10	5 мг/хв*	13	Природно контамінована вода з приватного джерела	Вода озонована барботуванням	[78]
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	2,9	30	1,5	10	Суспензія бактерій нанесена на листя шпинату	Газоподібний озон під тиском 69 кПа*	[109]
<i>Legionella pneumophila</i>	>3	15	0,033**	22	Суспензія бактерій у 0,01 М фосфатному буферному розчині	Озон розчинений у буферному розчині	[71]
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,79	1	2-3	25	Пастеризований яблучний сік, інокульований суспензією бактерій	Пропускання газоподібного озону крізь зразки соку	[80]
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,7	10	50	Кімнатна (без вказаних значень)	Суспензія бактерій нанесена на середовище TSA	Газоподібний озон	[81]

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,8	4	0,095**	Кімнатна (без вказаних значень)	Суспензія бактерій у дистильованій воді	Дистильована вода озонована барботуванням	[69]
<i>Salmonella enterica</i> серовар <i>Enteritidis</i>	2,9	30	160	Не вказана	Суспензія бактерій нанесена на мигдаль	Газоподібний озон під тиском 12,5 psig*	[26]
<i>Shigella flexneri</i>	3,19 4,46	15 30	20,83 мг- хв/л*	Кімнатна (без вказаних значень)	Суспензія бактерій у моделі стічних вод	Стічні води озоновані барботуванням	[72]
<i>Shigella sonnei</i>	5,6	1	2,2	Не вказана	Суспензія бактерій у дистильованій воді	Дистильована вода озонована барботуванням	[74]
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,4	2	0,095**	Кімнатна (без вказаних значень)	Суспензія бактерій у дистильованій воді	Дистильована вода озонована барботуванням	[69]
<i>Staphylococcus aureus</i>	>2	4	2	23-24	Суспензія бактерій нанесена на тканину (65 %	Газоподібний озон	[75]

					поліестер, 35 % бавовна)		
<i>Streptococcus mutans</i>	2,91	10 сек*	Не вимірювали, вказані дані виробника: 0.052 % (v/v), подача 13,33 мл/сек*	23	Суспензія бактерій нанесена на скляні кульки	Газоподібний озон	[79]
<i>Vibrio cholerae</i>	3,26 4,52	15 30	20,83 мг-хв/л*	Кімнатна (без вказаних значень)	Суспензія бактерій у моделі стічних вод	Стічні води озоновані барботуванням	[72]

**Примітки:** \* - одиниці вимірювання згідно оригінальної публікації, \*\* - початкова концентрація озону, \*\*\* - одиниці вимірювання згідно оригінальної публікації, відповідає інактивації до 2 log, \*\*\*\* - використовувалася комбінована обробка озоною водою протягом 5 хв, та подальшим підігріванням зразків протягом 30 хв

## Додаток А2

Таблиця 1.2. Інактивація вірусів озоном

Збудник	Інактивація (lg БУО/мл)	Час обробки (хв)	Концентрація озону (мг/л)	Температура ( °С)	Субстрат	Тип обробки	Посилання
Аденовірус типу 40	3,55	10	0,3	5	Фосфатний буферний розчин	Дистильована вода озонована барботуванням	[319]
Вірус гепатиту А	2,9  1,5	10	6,25	20	Вірус нанесений на поверхню зеленої цибулі  Вірус інтерналізований у зелену цибулю	Дистильована вода озонована барботуванням	[320]
Вірус грипу типу А підтипу H1N1	99,999 %*	150	20	23-29	Суспензія вірусів висушена на поверхні скляних та пластикових чашок Петрі	Газоподібний озон	[321]
Коронавірус SARS-CoV-2	3,3	55	6	25	Суспензія вірусів висушена на поверхні	Газоподібний озон	[322]

					пластинки з нержавіючої сталі		
Мишачий коронавірус (сурогат вірусу SARS)	3,0	60	20-25**	20	Суспензія вірусів висушена на поверхні предметних скелець	Газоподібний озон	[323]
Мишачий норовірус 1 (сурогат людського норовірусу)	4,1	10	6 %***	25	Фосфатний буферний розчин	Газоподібний озон	[25]
Норовірус людини	2,5	30	6,25	22	Насіння люцерни інокульоване вірусним фільтратом	Озонована вода (метод озонування не вказаний)	[324]
Поліовірус типу 1	2,76	0,7 сек****	0,25	5	Фосфатний буферний розчин	Фосфатний буферний розчин озонований барботуванням	[325]

Респіраторно-синцитіальний вірус А2	4,0	40	20	24	Вірус на поверхні респіратора N95	Газоподібний озон	[326]
Риновірус 1А і 14	2,0	60	28**	20	Вірус нанесений на стерильну скляну поверхню	Газоподібний озон	[323]
Ротавірус штам Wa	8,0	1	25	25	Суспензія вірусів	Дистильована вода озонована барботуванням	[327]

**Примітки:** \* - одиниці вимірювання згідно оригінальної публікації, відповідає інактивації 5 log, \*\* - поступове збільшення концентрації до зазначеної протягом 15 хвилин, \*\*\* - одиниці вимірювання згідно оригінальної публікації, відповідає 60000 мг/л, \*\*\*\* - одиниці вимірювання згідно оригінальної публікації

## Додаток АЗ

Таблиця 1.3. Ефект озону на біоплівки, утворені бактеріями

Збудник	Тип поверхні	Тип обробки	Концентрація озону (мг/л)	Час обробки (хв)	Ефект	Посилання
<i>Bacillus cereus</i>	Поліпропіленова пластина	Газоподібний озон	45 ± 2	30	Інактивація 2,16 lg КУО/см <sup>2</sup>	[101]
<i>Bacillus subtilis</i>	Пластина з нержавіючої сталі	Газоподібний озон	1,4	4,5	Інактивація >6 lg КУО/мл	[102]
<i>Listeria monocytogenes</i>	Циліндр з нержавіючої сталі	Водопровідна вода озонована електролітичним способом	0,5	20	Інактивація 1,65 lg КУО/см <sup>2</sup> при статичній обробці (замочування) Інактивація 3,29 lg КУО/см <sup>2</sup> при обробці потоком води (1 л/хв)	[30]
<i>Listeria monocytogenes</i>	Циліндр з нержавіючої сталі	Газоподібний озон	0,2 2	60 2	Інактивація 2,12 lg КУО/см <sup>2</sup> Інактивація >5,33 lg КУО/см <sup>2</sup>	[30]

					(відсутність росту)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Контейнер для контактних лінз (матеріал не вказаний)	Дистильована вода озонована барботуванням	4	20	Інактивація 7,42 lg КУО/см <sup>2</sup>	[100]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Циліндр з нержавіючої сталі	Водопровідна вода озонована електrolітичним способом	0,5	20	Інактивація 1,56 lg КУО/см <sup>2</sup> при статичній обробці (замочування) Інактивація 3,52 lg КУО/см <sup>2</sup> при обробці потоком води (1 л/хв)	[30]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Циліндр з нержавіючої сталі	Газоподібний озон	20	60	Інактивація 5,51 lg КУО/см <sup>2</sup>	[30]
<i>Salmonella spp.*</i>	Пластина з нержавіючої сталі	Озонована вода (метод озонування не вказаний)	16	20	Інактивація <0,8 lg КУО/см <sup>2</sup> проте спостерігалось потенціювання (до 2 lg КУО/см <sup>2</sup> ) у комбінації з	[31]

					ультразвуком (40 кГц)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Циліндр з нержавіючої сталі	Водопровідна вода озонована електролітичним способом	0,5	20	Інактивація 2,15 lg КУО/см <sup>2</sup> при статичній обробці (замочування)  Інактивація 4,47 lg КУО/см <sup>2</sup> при обробці потоком води (1 л/хв)	[30]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Циліндр з нержавіючої сталі	Газоподібний озон	20	20	Інактивація >5,47 lg КУО/см <sup>2</sup>  (відсутність росту)	[101]

**Примітки:** \* - суміш штамів *Salmonella enterica* серовар *Agona*, *Salmonella enterica* серовар *Enteritidis*, *Salmonella enterica* серовар *Infantis*, *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium*

## Додаток А4

Таблиця 1.4. Інактивація мікроорганізмів у рідинах та рідких харчових продуктах високим гідростатичним тиском

Збудник	Субстрат	Тиск (МПа)	Початкова температура (°C)	Час обробки (хв)	Інактивація (lg КУО/мл)	Посилання	
<i>Bacillus cereus</i> СЕСТ 131 (вегетативні клітини)	Людське молоко	379	10	233 с*	4.62	[328]	
		593,96			6.93		
Суміш штамів <i>Escherichia coli</i> (NCTC 11601, NCTC 11602, NCTC 11603, NCTC 9706, NCTC 9707)	Сире молоко	400	18	1	0,85	[329]	
				500	3		1.1**
					5		2.2**
		600		1	0.9**		
				3	1.9**		
				5	2.6**		
				1	3.6**		
				3	5.6		
		5		6.8			
		<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 12900		Суспензія бактерій у фізіологічному розчині	450		Не вказана

Суміш штамів <i>Listeria monocytogenes</i> (FMT 1750, NCTC 11994, NCTC 5214, NCTC 10888, NCTC 19118)	Сире молоко	400	18	1	1.42	[329]
				3	1.5**	
				5	2.1**	
		500		1	1.6**	
				3	3.1**	
				5	5..48	
		600		1	3.2**	
				3	5.65	
				5	5.91	
Суміш сероварів <i>Salmonella</i> (Номери ATCC 13076, 8387, 6962, 9270, 14028)***	Апельсиновий сік	103	25	10	0.75	[331]
				241	25	
		380	25	4	0.69	
				8	1.44	
				10	1.88	
				2	2.76	
				4	5.56	
				8	>7	
		10	>7			

<i>Staphylococcus aureus</i> СЕСТ 976	Людське молоко	379 593,96	10	233 с*	2.73 5.81	[328]
Штами <i>Staphylococcus aureus</i>	Культура у середовищі ВНІ (Brain Heart Infusion)	400	15	10	2.01	[133]
СТС 1008		600	15	10	7.96	
СТС 1019		900	Не вказана	5	>8	
		400	15	10	1.55	
		600	15	10	5.78	
СТС 1021		900	Не вказана	5	>8	
		400	15	10	1.82	
		600	15	10	7.32	
СЕСТ 976		900	Не вказана	5	>8	
		400	15	10	1.81	
		600	15	10	7.79	
СЕСТ 4466		900	Не вказана	5	>8	
		400	15	10	1.94	
		600	15	10	7.90	
		900	Не вказана	5	>8	

**Примітки:** \* – одиниці вимірювання згідно оригінальної публікації; \*\* – дані представлені у вигляді графіку без наведення точних чисел, числа у таблиці відтворені приблизно; \*\*\* – опис використаних мікроорганізмів згідно оригінальної публікації. Номери штамів відповідають *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076,

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo ATCC 8387, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport ATCC 6962, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Anatum ATCC 9270, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028

## Додаток А5

Таблиця 1.5. Інактивація мікроорганізмів у напіврідких та твердих харчових продуктах високим гідростатичним тиском

Збудник	Субстрат	Тиск (МПа)	Початкова температура (°C)	Час обробки (хв)	Інактивація (lg КУО/г)	Посилання
<i>Campylobacter jejuni</i>	Курячий фарш	200	4	5	0*	[332]
				10	0*	
				15	0*	
		300		5	2.7	
				10	≥6.87	
				15	≥6.87	
		400		5	≥6.87	
				10	≥6.87	
				15	≥6.87	
Суміш вегетативних клітин штамів <i>Clostridium perfringens</i> типу F (КССМ12098, КССМ40946, КССМ40947, КСТС5101)	Свиняча ковбаса емульсійного типу	500	4	4 цикли по 3 хв	1.9	[136]

Суміш сероварів <i>Escherichia coli</i> (O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145)	Яловичий фарш	250	5-7	5	0.7	[333]
		350		15**	1.6	
				30**	2.3	
		450		5	2.4	
				15**	3.5	
				30**	4.7	
5	4.4					
			15**	5.6		
Суміш сероварів <i>Escherichia coli</i> (O91, O146, O153, O156)	Татарський біфштекс	400	3 ± 1	5 хв обробки + 168 год зберігання при 4 °С	1.8	[134]
		600			>4.7	
Суміш штамів <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (ATCC 43888, 43889, 43890, 45756, 11082)	Яловичий фарш	250	5-7	5	0.2	[333]
		350		15**	0.7	
				30**	1.0	
		450		5	1.0	
				15**	2.1	
				30**	3.2	
5	3.5					

				15**	6.9	
Суміш штамів <i>Listeria monocytogenes</i> (Scott A, 43256, 51742)	Пюре дині	400	8	5	2.9	[334]
			15		3.1	
		500	8	5	5.6	
			15		≥7	
Суміш штамів <i>Salmonella enterica</i> (S. Poona RM 2350, S. Newport H1275, S. Stanley H0558)	Пюре дині	300	8	5	2.7	[334]
			15		3.1	
		400	8	5	4.8	
			15		5.8	
		500	8	5	≥7	
			15		≥7	
Суміш штамів <i>Salmonella Typhimurium</i> DT 104, S. Newport ATCC 6962, S. Enteritidis ATCC 13076, S. Senftenberg ATCC 8400, S. Kentucky FSIS 074	Курячий фарш	250	4-6	15	0.5	[335]
		350		15	1.7	
		450		10	>5	
<i>Toxoplasma gondii</i> штам VEG	Сира шинка	100-400	6 ± 1	1	Інфекційний***	[336]
		600		20	Неінфекційний	

	в'ялена шинка	600		3-10	Інфекційний***	
				20	Неінфекційний	

**Примітки:** \* – обробка при 200 МПА не показала статистично достовірної інактивації; \*\* – обробка 15 та 30 хвилин складалася з повторюваних циклів по 5 хвилин; \*\*\* – зразки шинки перевірялися на інфекційність шляхом інокуляції мишей з подальшим виявленням цист у їх мозку

## Додаток А6

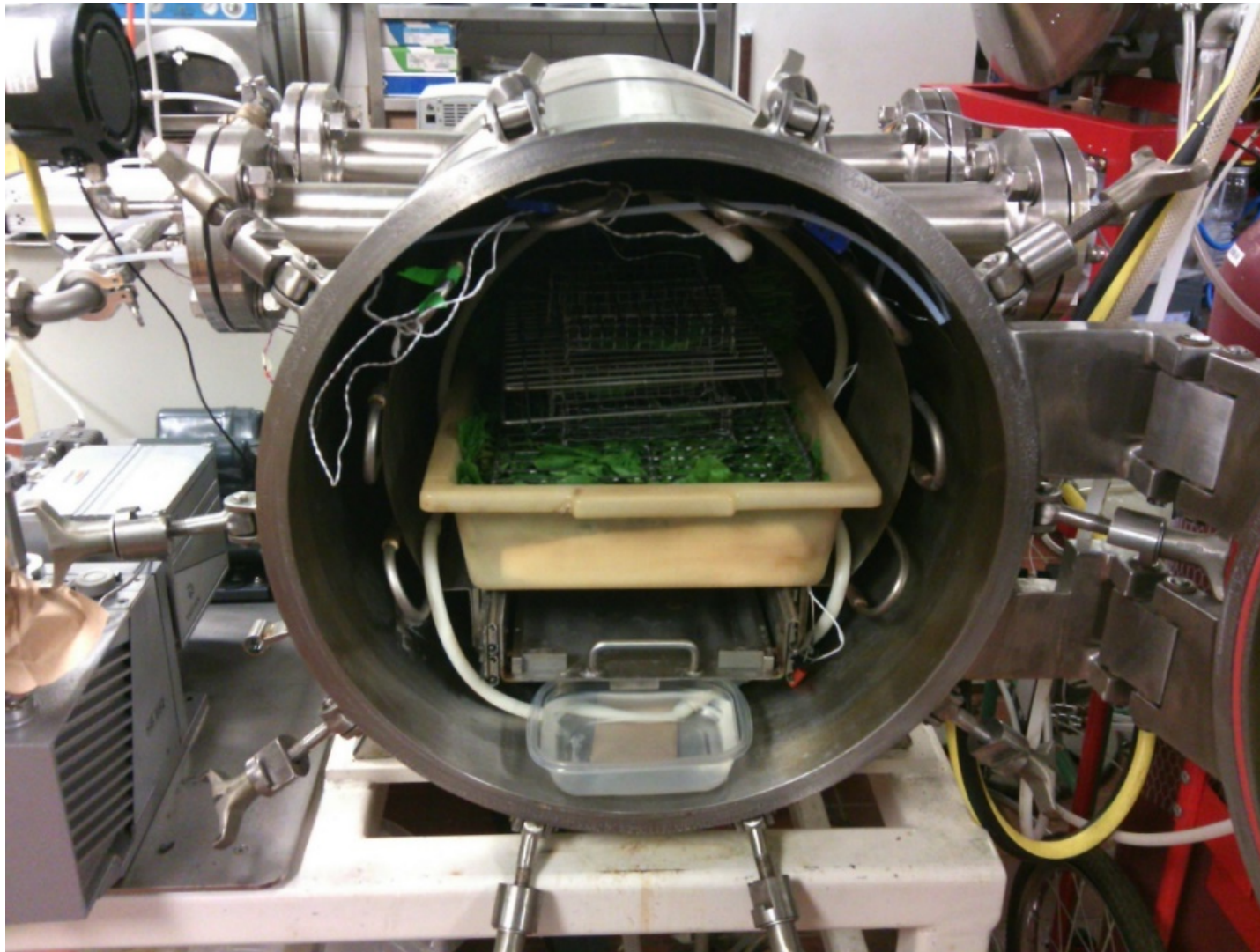


Рис. 4.6. Завантаження установки листям шпинату *Spinacia oleracea* 2600 г/м<sup>3</sup>

## Додаток А7

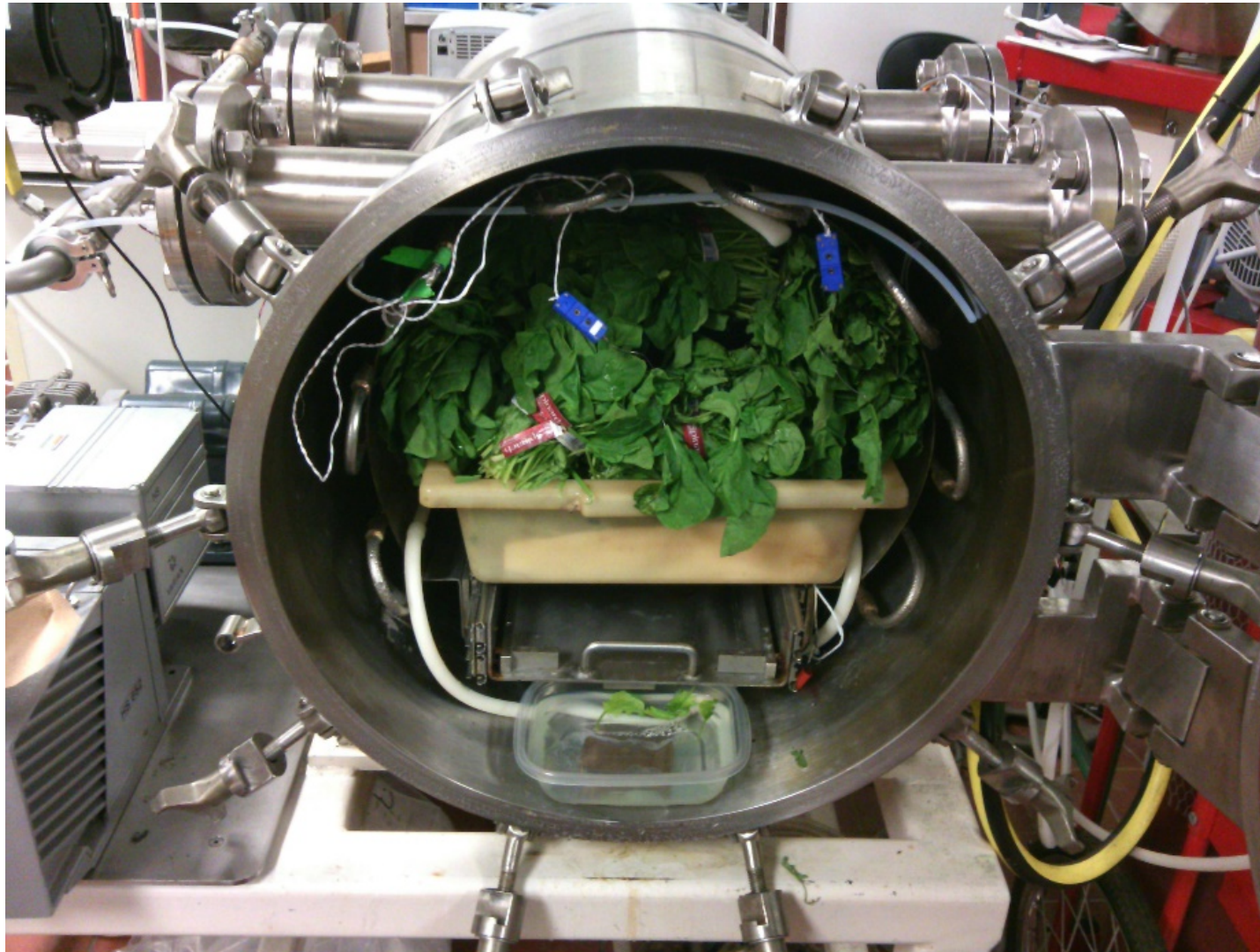


Рис. 4.7. Завантаження установки листям шпинату *Spinacia oleracea* 26600 г/м<sup>3</sup>

## Додаток А8



А



В



С

Рисунок 6.11. А та В – використання озонатора від сонячної батареї; С – використання озонатора від портативного зовнішнього акумулятора.

## Додаток Б

### Апробація результатів дисертації.

IFT Annual Meeting & Food Expo 2013 (13-16 липня 2013 р., Чикаго, Іллінойс, США) – стендова доповідь і публікація тез.

Conference of Food Engineering 2014 (7-9 квітня 2014 р., Омаха, Небраска, США) – стендова доповідь і публікація тез.

National Integrated Food Safety Initiative (NIFSI) Project Director Meeting (8 травня 2014 р., Вашингтон, округ Колумбія, США) – стендова доповідь і публікація тез.

IFT Annual Meeting & Food Expo 2014 (21-24 червня 2014 р., Новий Орлеан, Луїзіана, США) – стендова доповідь і публікація тез.

IFT Annual Meeting & Food Expo 2015 (11-14 липня 2015 р., Чикаго, Іллінойс, США) – стендова доповідь і публікація тез.

Conference of Food Engineering 2016 (12-14 вересня 2016 р., Колумбус, Огайо, США) – усна доповідь і публікація тез.

The 28th International Symposium on Transport Phenomena (22-24 вересня 2017 р., Пераденія, Шрі-Ланка) – усна доповідь і публікація тез.

IFT Annual Meeting & Food Expo 2018 (15-18 липня 2018 р., Чикаго, Іллінойс, США) – стендова доповідь і публікація тез.

Conference of Food Engineering 2018 (9-12 вересня 2018 р., Міннеаполіс, Міннесота, США) – усна доповідь і публікація тез.

Підсумкова LXV науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (9 червня 2022 р., Тернопіль, Україна) – усна доповідь і публікація тез.

Підсумкова III міжнародна науково-практична дистанційна конференція «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (24 березня 2023 р., Харків, Україна) – усна доповідь і публікація тез.

Підсумкова IV міжнародна науково-практична дистанційна конференція «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (22 березня 2024 р., Харків, Україна) – усна доповідь і публікація тез.

XXIII Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Довкілля і здоров'я» (25-27 квітня 2024 р., Тернопіль, Україна) – усна доповідь і публікація тез.

Підсумкова LXVII науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (13-14 червня 2024 р., Тернопіль, Україна) – усна доповідь і публікація тез.

20th Jubilee RECOOP Bridges in Life Sciences Conference (2-3 квітня 2025 р., Прага, Чехія) – усна доповідь і публікація тез.

Науково-практична конференція «VII національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 180-річчю з дня народження Іллі Мечникова» (15-16 травня 2025 р., Харків, Україна) – усна доповідь і публікація тез.

XXI всеукраїнська наукова конференція «Актуальні питання біології та медицини» (29-30 травня 2025 р., Лубни, Україна) – усна доповідь і публікація тез.

XVI з'їзд Товариства мікробіологів України імені С. Виноградського (2-6 червня 2025 р., Тернопіль, Україна) – усна доповідь і публікація тез.

Науково-практична конференція «Практична медицина військового часу» (6 грудня 2025 р., Харків, Україна) – усна доповідь і публікація тез.

## Додаток В

## Патент



## Додаток Г

### Акти впровадження

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти з наукової роботи Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України

професор І. М. Кліщ

« 204 » \_\_\_\_\_ 2024 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Найменування пропозиції для впровадження:** Застосування газоподібного озону та його водного розчину для інактивації патогенних мікроорганізмів.
- Установа-розробник:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, м. Тернопіль, вул. Словацького 2, 46001
- Розробник:** П'ятковський Тарас Іванович.
- Джерела інформації:** Pyatkovskyy T, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Fresh produce sanitization by combination of gaseous ozone and liquid sanitizer. Journal of Food Engineering. 2017 Oct 1;210:19-26. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.031>.  
Pyatkovskyy T. Application of gaseous ozone and its aqueous solution for inactivation of pathogenic microorganisms: A literature review. Bulletin of Medical and Biological Research. 2023 17(3):47-57. <https://doi.org/10.61751/bmbr.2706-6290.2023.3.47>.
- Базова установа, яка проводить впровадження:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології.
- Результати застосування:** з січня 2024 року по травень 2024 року.
- Форма впровадження:** впроваджено у навчальний процес – у матеріали лекцій і практичних занять для студентів, аспірантів, здобувачів кафедри мікробіології, вірусології та імунології.
- Ефективність впровадження:** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів, лікарів-інтернів, лікарів-слухачів, аспірантів, стосовно оптимізації інактивації патогенних мікроорганізмів.
- Зауваження, пропозиції:** не вносилися.

#### Відповідальний за впровадження:

Кандидат медичних наук, доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України



Л. Б. Романюк

## «ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти з наукової роботи Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України

професор І. М. Кліщ

« 9 вересня » 2024 р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Знезараження води за допомогою електролітичного озонування для застосування в умовах воєнного часу.
2. **Установа-розробник:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, м. Тернопіль, вул. Словацького 2, 46001
3. **Розробник:** П'ятковський Тарас Іванович.
4. **Джерела інформації:** П'ятковський ТІ, Pokryshko ОВ, Danylkov СО. Оцінка ефективності використання озонування для знезараження прісної води. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 19, Грудень 2023;(4):113-8. <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2023.v.i4.14189>.  
Pyatkovskyy T., Pokryshko O., Danylkov S. Exploring water disinfection through electrolytic ozonation for application in wartime conditions. Bulletin of Medical and Biological Research. 2024 6(1), 43-51. <https://doi.org/10.61751/bmbr/1.2024.43>
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, кафедра загальної гігієни та екології.
6. **Результати застосування:** з січня 2024 року по травень 2024 року.
7. **Форма впровадження:** впроваджено у навчальний процес – у матеріали лекцій і практичних занять для студентів, аспірантів, здобувачів кафедри загальної гігієни та екології.
8. **Ефективність впровадження:** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів, лікарів-інтернів, лікарів-слухачів, аспірантів, стосовно інактивації мікроорганізмів у воді та покращенні її якості.
9. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися.

**Відповідальний за впровадження:**

Доктор медичних наук, професор кафедри загальної гігієни та екології медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України

О. В. Лотоцька

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор  
ТОВ «Медична лабораторія Панакея»

В. Роженко

\_\_\_\_\_ 2024 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища.
2. **Установа-розробник:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, м. Тернопіль, вул. Словацького 2, 46001
3. **Розробник:** П'ятковський Тарас Іванович.
4. **Джерела інформації:** П'ятковський Т., Покришко О. Порівняння ергономічності методів інокуляції мікроорганізмів на щільні живильні середовища. *Анали Мечниковського Інституту.* 2023 Jun 16(2):45-8. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8048366>  
Патент України на корисну модель №155168 Україна, МПК C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/66 (2015.01) Спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища / П'ятковський Т., Покришко О.; володілець: Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського. – № u202302947, заявл. 16.06.2023, опубл. 27.03.2024, Бюл. № 13.
5. **Впроваджено:** у бактеріологічну лабораторію ТОВ «Медична лабораторія Панакея», 47740, Тернопільська обл., Тернопільський р-н, смт. Великі Бірки, вул. Наливайка, 24
6. **Термін впровадження:** з квітня 2024 року по серпень 2024 року.
7. **Форма впровадження:** впроваджено у роботу бактеріологічної лабораторії.
8. **Ефективність впровадження:** отримані результати досліджень використані у роботі бактеріологічної лабораторії при інокуляції мікроорганізмів на щільні живильні середовища.
9. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:  
Завідувач лабораторії  
ТОВ «Медична лабораторія Панакея»

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'S. V. Senko'.

С. В. Сенько

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Генеральний директор

ДУ «Тернопільський обласний центр контролю та профілактики хвороб Міністерства охорони здоров'я України»



О. Т. Чайчук

серпень 2024 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища.
2. **Установа-розробник:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, м. Тернопіль, вул. Словацького 2, 46001
3. **Розробник:** П'ятковський Тарас Іванович.
4. **Джерела інформації:** П'ятковський Т, Покришко О. Порівняння ергономічності методів інокуляції мікроорганізмів на щільні живильні середовища. *Анали Мечниковського Інституту*. 2023 Jun 16(2):45-8. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8048366>  
Патент України на корисну модель №155168 Україна, МПК C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/66 (2015.01) Спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища / П'ятковський Т., Покришко О.; володілець: Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського. – № u202302947, заявл. 16.06.2023, опубл. 27.03.2024, Бюл. № 13.
5. **Впроваджено:** у бактеріологічну лабораторію ДУ «Тернопільський обласний центр контролю та профілактики хвороб Міністерства охорони здоров'я України», Тернопіль, вул. Князя Острозького, 21а, 46001
6. **Термін впровадження:** з березня 2024 року по червень 2024 року.
7. **Форма впровадження:** впроваджено у роботу бактеріологічної лабораторії.
8. **Ефективність впровадження:** отримані результати досліджень використані у роботі бактеріологічної лабораторії при інокуляції мікроорганізмів на щільні живильні середовища.
9. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися.

**Відповідальний за впровадження:**

Завідувач бактеріологічної лабораторії  
ДУ «Тернопільський обласний центр контролю та профілактики хвороб  
Міністерства охорони здоров'я України»

А. М. Дубровська

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор  
КНП "Тернопільська комунальна міська



Р. Д. Левчук

\_\_\_\_\_ 2024 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища.
2. **Установа-розробник:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, м. Тернопіль, вул. Словацького 2, 46001
3. **Розробник:** П'ятковський Тарас Іванович.
4. **Джерела інформації:** П'ятковський Т., Покришко О. Порівняння ергономічності методів інокуляції мікроорганізмів на щільні живильні середовища. *Анали Мечниковського Інституту*. 2023 Jun 16(2):45-8. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8048366>  
Патент України на корисну модель №155168 Україна, МПК C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/66 (2015.01) Спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища / П'ятковський Т., Покришко О.; володілець: Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського. – № u202302947, заявл. 16.06.2023, опубл. 27.03.2024, Бюл. № 13.
5. **Впроваджено:** у бактеріологічну лабораторію КНП "Тернопільська комунальна міська лікарня №2", м.Тернопіль, вул. Романа Купчинського, 14, Україна, 46400
6. **Термін впровадження:** з січня 2024 року по червень 2024 року.
7. **Форма впровадження:** впроваджено у роботу бактеріологічної лабораторії.
8. **Ефективність впровадження:** отримані результати досліджень використані у роботі бактеріологічної лабораторії при інокуляції мікроорганізмів на щільні живильні середовища.
9. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися.

#### Відповідальний за впровадження:

ВО завідувача клініко-діагностичної лабораторії  
КНП "Тернопільська комунальна міська лікарня №2"

Н. М. Кухтяк

## Додаток Д

## Список публікацій здобувача

*Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:*

1. Климнюк СІ, Покришко ОВ, **П'ятковський ТІ**, Ткачук НІ. Персистенція *S.aureus* у студентів медичного університету та їх чутливість до антибіотиків. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2010;15:14-15 [**фахове видання України, 222-Медицина**] (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, участь у підготовці рукопису*)
2. Ковальчук АО, **П'ятковський ТІ**. Динаміка змін мікробіологічних показників експериментальних опікових ран при проведенні ранньої некректомії з використанням ліофілізованих ксенодермотрансплантатів вторинного зрізу. *Вісник наукових досліджень*. 2010(2):46-9. [**фахове видання України, 222-Медицина**] (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання мікробіологічних експериментів, написання частини рукопису, підготовка статті до друку*)
3. **П'ятковський ТІ**, Чорній НВ, Покришко ОВ. Застосування септофіту для лікування захворювань пародонта у хворих на хронічний панкреатит. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2011;2:108-110 [**фахове видання України, 222-Медицина**] (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання мікробіологічних експериментів, написання частини рукопису, підготовка статті до друку*)
4. Манащук НВ, Покришко ОВ, **П'ятковський ТІ**. Етіологічна структура захворювань пародонту у хворих на неспецифічний виразковий коліт. Клінічна та експериментальна патологія. 2012;1(39):110-3 [**фахове видання України, 222-Медицина**] (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання мікробіологічних експериментів, написання частини рукопису*)
5. **П'ятковський ТІ**, Чорній НВ, Покришко ОВ. Мікробіоценоз ясенних щілин та пародонтальних кишень при гінгівіті та пародонтиті І ст. на фоні хронічного панкреатиту. *Український медичний альманах*. 2012;15(5): 263-4 [**фахове**

- видання України, 222-Медицина]** *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання мікробіологічних експериментів, написання частини рукопису, підготовка статті до друку)*
6. Shynkaryk MV, **Pyatkovskyy T**, Mohamed HM, Yousef AE, Sastry SK. Physics of fresh produce safety: role of diffusion and tissue reaction in sanitization of leafy green vegetables with liquid and gaseous ozone-based sanitizers. Journal of food protection. 2015 Dec 1;78(12):2108-16. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-290>. **[SCOPUS (Q2), Medicine; SCOPUS (Q3) Microbiology]** *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання мікробіологічних експериментів, написання частини рукопису)*
  7. **П'ятковський Т**, Покришко О. Порівняння ергономічності методів інокуляції мікроорганізмів на щільні живильні середовища. Аналіз Мечниковського Інституту. 2023 Jun 16(2):45-8. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8048366>. **[фахове видання України, 222-Медицина]** *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку)*
  8. **Pyatkovskyy T**. Application of gaseous ozone and its aqueous solution for inactivation of pathogenic microorganisms: A literature review. Bulletin of Medical and Biological Research. 2023 17(3):47-57. <https://doi.org/10.61751/bmbr.2706-6290.2023.3.47>. **[фахове видання України, 222-Медицина]**
  9. **П'ятковський ТІ**, Покришко ОВ, Данилков СО. Оцінка ефективності використання озонування для знезараження прісної води. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 19, Грудень 2023;(4):113-8. <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2023.v.i4.14189> **[фахове видання України, 222-Медицина]** *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку)*
  10. **Pyatkovskyy T**. Inactivation of microorganisms by high hydrostatic pressure: A literature review. Bulletin of Medical and Biological Research. 2023 5(4), 53-61. <https://doi.org/10.61751/bmbr/4.2023.53>. **[фахове видання України, 222-Медицина]**

11. **Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Danylko S.** Exploring water disinfection through electrolytic ozonation for application in wartime conditions. *Bulletin of Medical and Biological Research.* 2024 6(1), 43-51. <https://doi.org/10.61751/bmbr/1.2024.43> [фахове видання України, 222-Медицина] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку)
12. **Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Bilyk O, Danylko S.** The use of aqueous ozone solution in the treatment of mine blast injury with extensive soft tissue defects: A case study. *Int J Med Med Res.* 2024;10(1):47–55. <https://doi.org/10.61751/ijmbr/1.2024.47> [фахове видання України, 222-Медицина] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання мікробіологічних експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку)
13. **Pyatkovskyy T, Pokryshko O.** Antimicrobial activity of ozonated oils and their applications in medicine – a narrative review. *Eur J Clin Exp Med* 2025;23 (2):512–7. <https://dx.doi.org/10.15584/ejcem.2025.2.28> [SCOPUS (Q4), Medicine] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, пошук та опрацювання літератури, написання рукопису, підготовка статті до друку)
14. **Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Markowski A, Chernyshova A, Danylko S.** Topical ozone application for severe acne with immunological evidence of Herpes zoster exposure after unsuccessful antibiotic and corticosteroid treatment: a case report. *J Med Case Rep.* 2025 Jul 12;19(1):337. <https://doi.org/10.1186/s13256-025-05386-w> [SCOPUS (Q2), Medicine] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання рукопису, підготовка статті до друку)
15. **Pokryshko O, Pyatkovskyy T.** Alcohol-based hand sanitizers in Ukraine: a comparative evaluation of their effectiveness. *Перспективи та інновації науки* 2025;6(52):1683-96 [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-6\(52\)-1683-1696](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-6(52)-1683-1696) [фахове видання України, 222-Медицина] (Особистий внесок здобувача: написання рукопису, підготовка статті до друку)

16. **Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Zahrychuk H, Danylkov S.** Kinetics of electrolytic ozone generation and decomposition in fresh water: influence of bacterial contamination and water source. *Medical and Clinical Chemistry*. 2025;(2):50–55. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2025.i2.15525> **[фахове видання України, 222-Медицина]** *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку)*
17. **Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Krasii N, Danylkov S.** Synergistic potential of aqueous ozone: Sublethal bacterial damage and enhanced antibiotic susceptibility. *Int J Med Med Res*. 2025;11(1):6–13. <https://doi.org/10.63341/ijmmr/1.2025.06> **[фахове видання України, 222-Медицина]** *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку)*
18. **Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Bilyk O, Danylkov S.** Ozonated water as an adjunct in the management of combat-induced wounds: a prospective study. *Шпитальна хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука*. 2025; (2):54-60. <https://doi.org/10.11603/2414-4533.2025.2.15271> **[фахове видання України, 222-Медицина]** *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання рукопису, підготовка статті до друку)*
19. **Volch I, Mykhailyshyn H, Kravets N, Pyatkovskyy T, Bukata V.** Biofilm formation and antibiotic resistance of clinical isolates from diabetic foot ulcers. *Bull Med Biol Res*. 2025;7(3):46–53. <https://doi.org/10.63341/bmbr/3.2025.46> **[фахове видання України, 222-Медицина]** *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання рукопису, підготовка статті до друку)*

#### *Патенти:*

1. Патент України на корисну модель №155668 Україна, МПК С12N 1/20 (2006.01) А61К 35/66 (2015.01) Спосіб інокуляції бактеріальної суспензії на щільні живильні середовища / П'ятковський Т., Покришко О.; володілець: Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського. – № u202302947, заявл. 16.06.2023, опубл. 27.03.2024, Бюл. № 13. **[патент**

**України на корисну модель]** *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту)*

*Публікації, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:*

1. **Pyatkovskyy T.**, Shynkaryk M., Yousef A. and Sastry S. Postharvest ozone gas and liquid sanitizer combinational treatment of baby spinach for inactivation of *E. coli* O157:H7. (2013) IFT Annual Meeting & Food Expo, July 13-16, Chicago, IL, USA *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка стенду, стендова доповідь)*
2. Shynkaryk, M., **Pyatkovskyy T.**, Yousef A., Sastry, S. Electrical conductivity: an indicator of high hydrostatic pressure-induced bacterial cell damage. (2014) Conference of Food Engineering (CoFE 2014), April 7-9, Omaha, NE, USA *(Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем)*
3. **Pyatkovskyy T.**, Shynkaryk, M., Yousef A., Sastry, S. Baby spinach combinational treatment with gaseous ozone and liquid sanitizers for inactivation of *E. coli* O157:H7. (2014) Conference of Food Engineering (CoFE 2014), April 7-9, Omaha, NE, USA *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка стенду, стендова доповідь)*
4. Shynkaryk, M., **Pyatkovskyy T.**, Yousef A., Sastry S. Pathogen Inactivation in Fresh Produce by Incorporation of Sanitizers into Existing Operations Within the Produce Chain. (2014) National Integrated Food Safety Initiative (NIFSI) Project Director Meeting, May 8, Washington, DC, USA *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка стенду, стендова доповідь)*
5. **Pyatkovskyy T.**, Shynkaryk M., Yousef A., Sastry S. Gaseous ozone treatment of baby spinach inoculated with *E. coli* O157:H7. (2014) IFT Annual Meeting & Food Expo, June 21-24, New Orleans, LA, USA *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка стенду, стендова доповідь)*

6. Shynkaryk, M., **Pyatkovskyy T.**, Yousef A., Sastry, S. Pilot scale combinational treatment of baby spinach with ozone gas and liquid sanitizer for inactivation of *E. coli* O157:H7. (2015) IFT Annual Meeting & Food Expo, July 11-14, Chicago, IL, USA (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем*)
7. Shynkaryk M. V., Mohamed H. M., **Pyatkovskyy T.**, Yousef A. E., Sastry S. K. Engineering Aspects of Fresh Produce Safety. (2016) Conference of Food Engineering (CoFE 2016), September 12-14, Columbus, OH, USA (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем*)
8. **Pyatkovskyy T.**, Shynkaryk M., Yousef A., Sastry S. Baby spinach sanitation by combination of gaseous ozone and liquid sanitizer. (2016) Conference of Food Engineering (CoFE 2016), September 12-14, Columbus, OH, USA (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка презентації, усна доповідь*)
9. Shynkaryk M., **Pyatkovskyy T.** and Sastry S. Diffusion of a sanitizer gas through leaf stomata with volumetric and surface breakdown reactions. (2017) The 28th International Symposium on Transport Phenomena, September 22-24, Peradeniya, Sri Lanka (*Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем*)
10. **Pyatkovskyy T.**, Heskitt B., Sastry S. Possible ways of fresh produce contamination during vacuum cooling. (2018) IFT Annual Meeting & Food Expo, July 15-18, Chicago, IL, USA (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка стенду, стендова доповідь*)
11. **Pyatkovskyy T.**, Heskitt B., Sastry S. Effect of vacuum cooling on *E. coli* K 12 infiltration in fresh baby spinach. (2018) Conference of Food Engineering (CoFE 2018), September 9-12, Minneapolis, MN, USA (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка презентації, усна доповідь*)

12. **П'ятковський, Т.**, Покришко, О., Данилков, С., Використання озонованої води для інактивації мікроорганізмів *in vitro*. Здобутки клінічної та експериментальної медицини: матеріали підсумкової LXV наук.-практ. конф., 9 червня 2022 р., м. Тернопіль: Терноп. нац. мед. ун-т ім. І. Горбачевського, 2022. С. 96–97. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез)*
13. **П'ятковський, Т.**, Покришко, О., Використання методу Копакабана для інокуляції суспензії мікроорганізмів на щільні живильні середовища. Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині: матеріали підсумкової III наук.-практ. міжнар. дистанц. конф., 24 березня 2023 р., м. Харків: Національний фармацевтичний університет, 2023. С. 52–53. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез)*
14. **П'ятковський ТІ**, Покришко ОВ, Данилков СО. Знезараження прісної води електrolітичним озонуванням. Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині: матеріали підсумкової IV наук.-практ. міжнар. дистанц. конф., 22 березня 2024 р., м. Харків: Національний фармацевтичний університет, 2024. С. 147-9. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез)*
15. Покришко ОВ, Красій НІ, **П'ятковський ТІ**. Скринінгове вивчення ефективності спиртовмісних антисептичних засобів для рук. Довкілля і здоров'я: матеріали XXIII Всеукраїнської наук.-практ. конф. з міжнародною участю., 25-27 квітня 2024 р., м. Тернопіль: Терноп. нац. мед. ун-т ім. І. Горбачевського, 2024. С. 98-100. *(Особистий внесок здобувача: участь у виконанні експериментів та написанні тез)*
16. **П'ятковський ТІ**, Покришко ОВ, Данилков СО. Озон як засіб дезінфекції харчових продуктів (на прикладі листя шпинату) і води. Здобутки клінічної та експериментальної медицини: матеріали підсумкової LXVII наук.-практ. конф., 13-14 червня 2024 р., м. Тернопіль: Терноп. нац. мед. ун-т ім. І. Горбачевського,

2024. С. 155-7. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез, підготовка презентації, усна доповідь)*
17. **Pyatkovskyy T., Pokryshko O., Krasii N., Danylkov S.** Activity of aqueous ozone against multiresistant isolates and its impact on antibiotic sensitivity in surgical patients. (2025) 20th Jubilee RECOOP Bridges in Life Sciences Conference, April 2-3, Prague, Czech Republic, ISBN 978-615-6006-06-6, P. 22. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання частини експериментів, написання тез, підготовка презентації, усна доповідь)*
18. **П'ятковський ТІ, Покришко ОВ, Загричук ГЯ, Данилков СО.** Динаміка концентрації озону у водному розчині в присутності бактерій. VII національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 180-річчю з дня народження Іллі Мечникова: матеріали наук.-практ. конф., 15-16 травня 2025 р., м. Харків: ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», 2025. С. 75-6. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез)*
19. **П'ятковський ТІ, Покришко ОВ, Красій НІ, Данилков СО.** Сублетальні пошкодження мікроорганізмів, спричинені водним розчином озону. Актуальні питання біології та медицини: матеріали XXI всеукраїнської наук. конф., 29-30 травня 2025 р., м. Лубни: ДЗ «Луганський національний університет імені Тараса Шевченка», 2025. С.43-45. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, написання тез)*
20. Покришко ОВ, Красій НІ, **П'ятковський ТІ.** Етіологія гнійно-запальних інфекцій м'яких тканин у учасників бойових дій та цивільних осіб. Матеріали XVI з'їзду Товариства мікробіологів України імені С. Виноградського, 2-6 червня 2025 р., м. Тернопіль: Терноп. нац. мед. ун-т ім. І. Горбачевського, 2025. С. 199. *(Особистий внесок здобувача: участь у виконанні експериментів та написанні тез)*
21. Волч ІР, Михайлишин ГІ, Кравець НЯ, **П'ятковський ТІ.** (2025). Оцінка антибіотикочутливості та здатності до формування біоплівки клінічних штамів, виділених з виразок діабетичної стопи. Практична медицина військового часу:

Матеріали науково-практичної конференції, 6 грудня 2025 р., м. Харків: ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», 2025. С. 12-13. (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання тез*)

*Додаткові публікації, що висвітлюють результати дисертації:*

1. Shynkaryk MV, **Pyatkovskyy TI**, Yousef AE, Sastry SK. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Engineering. 2016 Dec 1;191:10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.025>. [**SCOPUS (Q1) Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, статистичний аналіз результатів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку*)
2. **Pyatkovskyy T**, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Fresh produce sanitization by combination of gaseous ozone and liquid sanitizer. Journal of Food Engineering. 2017 Oct 1;210:19-26. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.031>. [**SCOPUS (Q1) Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку*)
3. **Pyatkovskyy T**, Shynkaryk M, Yousef A, Sastry SK. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 population on baby spinach leaves by liquid sanitizers. Journal of Food Process Engineering. 2017 Jun;40(3):e12479. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12479>. [**SCOPUS (Q2) Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку*)
4. **Pyatkovskyy TI**, Shynkaryk MV, Mohamed HM, Yousef AE, Sastry SK. Effects of combined high pressure (HPP), pulsed electric field (PEF) and sonication treatments on inactivation of *Listeria innocua*. Journal of Food Engineering. 2018 Sep 1;233:49-56. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.002>. [**SCOPUS (Q1) Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (*Особистий внесок здобувача:*

концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку)

5. Kasler DR, **Pyatkovskyy T**, Yousef AE, Sastry SK. Effect of moderate electric field pretreatment in combination with ozonation on inactivation of *Escherichia coli* K12 in intact shell eggs. *Lwt.* 2020 Jun 1;127:109338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109338> [SCOPUS (Q1) **Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (Особистий внесок здобувача: планування і виконання частини експериментів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку)
6. Wang LH, **Pyatkovskyy T**, Yousef A, Zeng XA, Sastry SK. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation induced by moderate electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies.* 2020 Jun 1;62:102349. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102349> [SCOPUS (Q1) **Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (Особистий внесок здобувача: планування експериментів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку)
7. Shynkaryk MV, **Pyatkovskyy T**, Yousef AE, Sastry SK. In-situ monitoring of inactivation of *Listeria innocua* under high hydrostatic pressure using electrical conductivity measurement. *Journal of Food Engineering.* 2020 Nov 1;285:110087. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110087>. [SCOPUS (Q1) **Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, статистичний аналіз результатів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку)
8. **Pyatkovskyy T**, Ranjbaran M, Datta AK, Sastry SK. Factors affecting contamination and infiltration of *Escherichia coli* K12 into spinach leaves during vacuum cooling. *Journal of Food Engineering.* 2021 Dec 1;311:110735. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110735>. [SCOPUS (Q1) **Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання частини експериментів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку)

9. Mok JH, Sun Y, **Pyatkovskyy T**, Hu X, Sastry SK. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore inactivation by single-and multi-pulse high hydrostatic pressure (MP-HHP). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2022 Oct 1;81:103147. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103147>. [**SCOPUS (Q1) Agricultural and Biological Sciences: Food Science**] (*Особистий внесок здобувача: планування експериментів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку*)