

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМ. М.І. ПИРОГОВА

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

П'ЯТКОВСЬКИЙ ТАРАС ІВАНОВИЧ

УДК 579.61:616-008.97:614.48

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

03.00.07 – мікробіологія

22 – охорона здоров'я

Реферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

доктора медичних наук

Вінниця – 2026

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Тернопільському національному медичному університеті імені І.Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України.

Офіційні опоненти:

Ковальчук Валентин Петрович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри мікробіології, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, МОЗ України;

Грузевський Олександр Анатолійович – доктор медичних наук, професор, професор кафедри загальної та клінічної епідеміології та біобезпеки з курсом мікробіології та вірусології, Одеський національний медичний університет;

Кондратюк Вячеслав Миколайович – доктор медичних наук, національний консультант з проведення навчання з адміністрування антимікробних препаратів в Україні, Бюро ВООЗ в Україні.

Захист відбудеться ____ _____ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 05.600.03 Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України за адресою: 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

**Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
Д 05.600.03,
д.мед.н., професор**

Марія ШИНКАРУК-ДИКОВИЦЬКА

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження та її актуальність. Спалахи гострих кишкових інфекцій, спричинені патогенними мікроорганізмами, створюють значні проблеми для системи охорони здоров'я та призводять до значних економічних втрат у всьому світі (AL-Mamun et al., 2018). 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 (Chakka et al., 2021; T. Pyatkovskyy et al., 2016). Такі збудники як *Salmonella spp.*, патогенні штами *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* і *Campylobacter spp.*, є одними з найпоширеніших причин гострих кишкових інфекцій (AL-Mamun et al., 2018). 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 безпечності 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 (Khouryieh, 2021; Zhang et al., 2019).

Чиста вода є необхідним ресурсом як для людської життєдіяльності, так і для різних галузей промисловості (Gomes et al., 2019; П'ятковський et al., 2023). 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 (Shumilova et al., 2023). Забезпечення чистою водою цивільних, військових, рятувальників та волонтерів, які знаходяться у зонах із зруйнованою цивільною інфраструктурою, є надзвичайно важливим (T. Pyatkovskyy et al., 2024).

Нетермічні методи з'явилися як багатообіцяюча альтернатива звичайним термічним обробкам для інактивації мікроорганізмів у харчових продуктах та воді (Ross et al., 2003; Sastry, 2016; Van Impe et al., 2018). Ці методи включають обробку під високим гідростатичним тиском (ВГТ) (Volumar et al., 2021; Gunther et al., 2019; Torres & Velazquez, 2005), обробку помірним чи імпульсним електричним полем (ПЕП, ІЕП) (Buckow et al., 2013; Knorr et al., 2002; Mok et al., 2022; Schottroff et al., 2019), опромінення ультрафіолетовим (УФ) світлом (Cebrián et al., 2016; Schottroff et al., 2018), обробку ультразвуком (УЗ) (Fan et al., 2019; Ko & Bai, 2022; Rastogi et al., 2007) та застосування газоподібного озону (Perry et al., 2019; Predmore et al., 2015; T. Pyatkovskyy et al., 2016) чи його водного

розчину (Epelle et al., 2022; Khadre et al., 2001; Melanie et al., 2024). Вони пропонують потенціал для ефективної інактивації мікроорганізмів, з одночасним збереженням смаку, текстури та поживної цінності харчових продуктів (Rastogi et al., 2007). 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 (Marino et al., 2018; M. Murakami et al., 2021; Shao et al., 2020).

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 дослідження: вдосконалення профілактики гострих кишкових та ранових інфекцій шляхом обґрунтування ефективності альтернативних методів інактивації мікроорганізмів на основі комбінування нетермічних і термічних факторів впливу.

Завдання дослідження:

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*.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше доведена можливість бактеріальної контамінації камер вакуумного охолодження та проникнення бактерій в товщу листків зелені під час процесу вакуумного охолодження. Були встановлені параметри проникнення бактерій та розроблені методи інактивації інтерналізованих бактерій.

Вперше встановлена оптимальна комбінація рідкого та газоподібного дезінфектантів, яка давала адитивний ефект інактивації *E. coli* O157:H7.

Була розроблена та успішно застосована нова комбінація застосування рідкого дезінфектанта з наступною довгостроковою обробкою газоподібним озоном, яка швидко зменшувала кількість ентерогеморагічної *E. coli* O157:H7, що знижує ризик виникнення харчових спалахів навіть при високому вихідному рівні забруднення харчової сировини зі збереженням біологічної цінності продуктів.

Доведений 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. Продемонстрована летальна та сублетальна дія озонованої води (концентрація озону до 4 мг/л) на клінічні штами *S. aureus* та *E. coli*.

Продемонстрована ефективність комбінації обробки суспензії спор *B. subtilis* помірним електричним полем при 300 В/см з помірною сублетальною термічною обробкою, яка призводила до помітного зменшення концентрації життєздатних спор. Також показано, що комбінація помірного електричного поля (15,7 В/см) та термічної обробки при температурі 55 °С, зменшує популяцію *E. coli* K12 всередині курячих яєць та спричиняє сублетальні пошкодження бактеріальних клітин.

Вперше встановлено, що вимірювання електропровідності при обробці суспензії *Listeria innocua* високим гідростатичним тиском можна використовувати для моніторингу ступеня пошкодження клітин. Доведено, що

одночасна обробка високим гідростатичним тиском та імпульсним електричним полем збільшувала електропровідність найбільше.

Вперше показано, що багаторазова обробка суспензії спор *B. subtilis* високим гідростатичним тиском була більш ефективною в їх інактивації, ніж одноразова обробка тиском протягом такого ж часу.

Практичне значення одержаних результатів полягає у розробці унікальних протоколів 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.

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».

Публікації. Наукові та практичні результати дисертації повністю викладені в опублікованих за темою дисертації працях. 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.

Обсяг та структура 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури висвітлено сучасний стан використання нетермічних методів інактивації мікроорганізмів у різних галузях. Показано механізми протибактеріальної дії рідких антисептичних засобів та дезінфектантів, озону (газоподібного, його водного розчину та озонованих олій),

високого гідростатичного тиску, помірного та імпульсного електричних полів, а також ультразвуку.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження виконувалися на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України та 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). 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 (протоколи № 77 від 18 квітня 2024 року і № 84 від 20 січня 2026 року).

Для експериментів з газоподібним озоном та рідкими дезінфектантами використовувався штам *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43889. 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. 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. Для експериментів з високим тиском було обрано непатогенний штам *Listeria innocua* ATCC 33090. Додатково використовували штам *Bacillus subtilis* 168.

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 підготовці до експериментів петлю замороженої (при -80°C) культури відновлювали на відповідному середовищі при 37°C . Вирощену культуру збирали центрифугуванням, а осад ресуспендували в 0,1% пептонній воді або стерильній деіонізованій воді, залежно від поставленого завдання.

При роботі із штамом *Bacillus subtilis* 168 спори акуратно змивали з поверхні агару стерильною деіонізованою водою та відмивали від залишків середовища шляхом кількох циклів центрифугування та ресуспендування у стерильній деіонізованій воді.

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

Зразки шпинату по 5 г (приблизно шість листків) були інокульовані 20 краплями по 2,5 мкл (50 мкл для одного зразка) суспензії клітин *E. coli*, для отримання початкової концентрації мікроорганізмів $\sim 10^7$ КУО/г.

Для інокуляції курячих яєць їх клали на бік, і в яєчній шкаралупі проколювали отвір після чого 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.

Використовувалися наступні дезінфікуючі засоби: а) 200 мг/л розчину гіпохлориту натрію; б) 200 мг/л розчину гіпохлориту натрію з 0,036 % додецилсульфату натрію; в) Pro-San L, комерційно приготовлений розчин, що містить 0,66 % лимонної кислоти, 0,036 % додецилсульфату натрію; та г) водний розчин 0,66 % левулінової кислоти з додаванням 0,036 % додецилсульфату натрію. Ці рідкі дезінфікуючі засоби окремо наносили на інокульовану сторону листя молодого шпинату при кімнатній температурі за допомогою каліброваної пляшки з розпилювачем. Для контролю інокульовані зразки обприскували стерильною деіонізованою водою та стерильною деіонізованою водою з додаванням 0,036 % додецилсульфату натрію.

У подальших експериментах для порівняння різних методів застосування рідких дезінфікуючих засобів використовувався Pro-San L. Методи нанесення передбачали розпилення, занурення та «сухе» вакуумне просочення при експозиції протягом 30 хвилин. Для обробки зануренням інокульований молодий шпинат *Spinacia oleracea* 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. Для обробки сухим вакуумним просоченням 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°C через поліуретанову трубку, вакуум повільно скидали і зразок витримували протягом попередньо визначеного часу (30 хвилин).

Для тривалого експерименту використовували листя молодого шпинату, вирощеного на місці. Pro-San L розпилювали 32 рази, оброблені зразки упаковували і зберігали охолодженими при 4°C протягом трьох днів. Проби для мікробіологічного аналізу відбирали щодня.

Усі експерименти, які включали обробку озоном, проводились у вищеописаному пілотному устаткуванні, яке дозволяє застосовувати газоподібний озон для зелених листових овочів під контрольованими тиском, температурою та подачею газоподібного озону. Це обладнання було оснащено генератором озону CSF-7, підключеним до балону типу К із 99,6 % киснем та пристроєм для термічного руйнування озону.

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, O₃ (під вакуумом)»; введення озону під вакуумом з негайним підвищенням тиску у ємності до 69 кПа: «Вакуум, O₃ + 69 кПа»; та застосування озону при атмосферному тиску з наступним підвищенням тиску до 69 кПа: «O₃ (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^3 . Як контроль замість озону використовувався кисень: «Вакуум, $\text{O}_2 + 69 \text{ кПа}$ ».

Для вивчення впливу кількості листя шпинату на розкладання озону було застосовано протокол обробки «Вакуум, $\text{O}_3 + 69 \text{ кПа}$ » при $1,5 \text{ г/м}^3$ озону та різних рівнях завантаження ємкості шпинатом, починаючи з 26600 г/м^3 (максимально можливе завантаження, що відповідає 7980 г шпинату в ємкості) 2600 г/м^3 (775 г шпинату у ємкості), 260 г/м^3 (78 г шпинату у ємкості) та 26 г/м^3 ($7,8 \text{ г}$ шпинату у ємкості). Інактивацію мікроорганізмів оцінювали шляхом інокуляції зразків масою $\sim 5 \text{ г}$, що відповідало шести листкам шпинату, які розміщали всередині поміж неінокульованого листя шпинату. Відразу після обробки, інокульовані зразки забиралися для мікробіологічного аналізу.

Для вивчення впливу застосування вакууму під час обробки листя шпинату на інтерналізацію мікроорганізмів у товщу листків інокульоване листя молодого шпинату обробляли лише вакуумним охолодженням (повернення тиску всередині установки до атмосферного відбувалося при $\sim 4^\circ \text{C}$), частину зразків також додатково обробляли газоподібним озоном при $1,5 \text{ г/м}^3$ з підвищенням тиску до 69 кПа та витримкою протягом 30 хвилин. Потім проводилася обробка поверхні листя $1,2\%$ гіпохлоритом натрію 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°C 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.

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^3) 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, $\text{O}_3 + 69 \text{ кПа}$ », в іншому озон застосовувався при атмосферному тиску з подальшим тиском до 69 кПа « O_3 (атм) + 69 кПа ». Відразу після обробки, інокульовані зразки забиралися для мікробіологічного аналізу.

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, $\text{O}_3 + 69 \text{ кПа}$ ». Для цього дослідження використовувалося те саме пілотне устаткування, ємкість було максимально завантажено продуктом (26000 г/м^3). Озон пропускали через ємкість при 2 л/хв , 4°C , а концентрація озону входу

підтримували при 0,032, 0,106, 0,211 та 0,528 г/м³. Концентрацію озону контролювали за допомогою озономіра IN-2000, а в середині ємкості для перевірки концентрації зразок газової суміші періодично відбирали за допомогою насосу Dia-Vac R101-FP-CA1. Два зразки інокульованих листків щодня забиралися для мікробіологічного моніторингу. Інокульовані листки молодого шпинату (контроль) зберігали в холодильнику (при 4 °С) і аналізували одночасно зі зразками, обробленими озоном.

Обробку води електролізом проводили за допомогою комерційних портативних приладів з електродами з діамантовим покриттям. Для перевірки ефективності приладу проводили вимірювання концентрації озону як одного з продуктів електрохімічних перетворень при електролізі.

Концентрацію озону у воді вимірювали фотометричним способом за допомогою фотометра PoolLab 1.0 за інтенсивністю зміни кольору у реакції з N,N-діетил-п-фенілендіаміну сульфатом. 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. Фактичний час між відбиранням зразка та отримання результату вимірювання становив ~ 6 хвилин, умовно приймався за 0 хвилин для відображення на графіках.

Мінералізацію зразків води вимірювали кондуктометром HI98301. Для цього електроди промивали дистильованою водою при кімнатній температурі (23 ± 1 °С) після чого занурювали у досліджуваний зразок води.

Для аналізу зміни кольору зразки фотографували камерами Sony NEX 5n з об'єктивом Sony 18-55 мм f/3.5-5.6 (листя шпинату) та Nikon D3200 з об'єктивом Nikon DX 18-55 мм 1:3.5-5.6 (зразки води у довготерміновому експерименті). Точна передача кольору досягалася шляхом калібрування до палітри X-Rite ColorChecker Passport за допомогою програмного забезпечення ColorChecker Passport. Зміни кольору зразків аналізували на вибраному квадраті 10 × 10 пікселів за допомогою безкоштовного онлайн-програмного забезпечення Image 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].

Для обробки високим гідростатичним тиском (ВГТ) бактеріальної суспензії *Listeria innocua* використовували систему гідростатичного тиску, розраховану на досягнення тиску до 1034 МПа. 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. 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.

Для вимірювання електропровідності у суспензії під час обробки ВГТ суспензію бактерій штаму *Listeria innocua* АТСС 33090 (~ 10¹⁰ КУО/мл) герметично запаювали без бульбашок повітря у обробну камеру, що складалася з керамічної трубки, на якій були встановлені два платинованих титанових електроди 5 × 8 мм, та з гнучкого поліетиленового мішечка, який забезпечував передачу тиску до зразка.

Інактивацію спор *B. subtilis* за допомогою помірною 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, а бажана форма сигналу генерувалася функціональним генератором, запускаючи перемикач біполярного транзистора з ізольованим затвором 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 Т, розміщений у центрі об'єму зразка та підключений до блоку збору даних Agilent, 34970А, що працює з HP BenchLink Data Logger. Під час обробки температура зразка підтримувалася на рівні нижче 30 °С, 55 °С, 65 °С і 75 °С шляхом занурення в охолоджену водяну баню з використанням мінеральної олії як охолоджувача.

Для обробки 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 °С. Рідину перекачували з більшої ванни в меншу за допомогою перистальтичного насоса 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, який подавав напругу від Powerstat типу

ЗРН116В, 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 ІЕП проводили одночасно зі звичайною термічною обробкою у водяній бані (контроль).

Обробку суспензії *Listeria innocua* АТСС 33090 імпульсним електричним полем проводили за допомогою генератора OSU-4A, 10 кВ, 100 А, 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. Прикладена напруга та струм контролювались на чотириканальному осцилографі Tektronix MSO4034.

Обробку ультразвуком (УЗ) проводили за допомогою ультразвукового процесора Q500 потужністю 500 Вт. 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 термопара типу К. Перед обробкою в камеру вносили 7 мл зразка і 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.

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 подальшою застосуванням ВГТ (ІЕП→ВГТ); ВГТ з подальшим використанням ІЕП (ВГТ→ІЕП); одночасні 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.

Аналіз білка з біцинхоніновою кислотою був використаний для визначення загальної концентрації білка в розчині інтактної та обробленої суспензії *Listeria innocua*. Зразки центрифугували при 13322 × g протягом 10 хв, а супернатанти піддавали аналізу. Розчини реагували з робочим реагентом ВСА із використанням стандартного протоколу (Walker, 1994). Зміну кольору зразків визначали за допомогою спектрофотометра Thermo Spectronic Genesys 5 при 562 нм.

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 ПЕП та необроблені спори фарбували флуоресцентними барвниками 15 мкМ йодиду пропідію і 0,5 мкМ SYTO 9 протягом 15 хвилин, а потім фотографували під конфокальним лазерним скануючим мікроскопом CLSM Olympus BX61. 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.

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., Цинцинаті, 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. Отриману рідину серійно розводили у пептонній воді і аліквоти об'ємом 0,1 мл засівали на поверхню чашок з MacConkey агар та Plate count агар.

Зразки суспензій *L. innocua* послідовно розводили і висівали на два середовища: неселективне середовище ТСАДЕ (триптичний соєвий агар з додаванням 0,6 % дріжджового екстракту) 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 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. Для цього по 1 мл розведень та нерозведених зразків вносили у стерильні чашки Петрі, додавали 10-12 мл розтопленого у водяній бані BiosanWB-4MS поживного агару та змішували їх похитуванням чашок. Після застигання агару чашки інкубували при 30 °С протягом 72 год з наступним підрахунком колонієутворюючих одиниць (КУО).

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. Після цього кульки переміщували у контейнер із дезінфікуючим розчином для повторного використання.

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. 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 підрахунку сублетально пошкоджених бактерій оброблені зразки послідовно розводили і висівали на триптичний соєвий агар з 0,6 % дріжджового екстракту (ТСАДЕ) (Difco, Becton Dickinson, Спаркс, Меріленд, США) та селективне середовище ТСАДЕ з додаванням 5 % NaCl. Сублетальне пошкодження бактерійних клітин оцінювалося за різницею між показниками на

двох середовищах. Чашки Петрі інкубували протягом 48 год при 35 ° С. Відсоток пошкодження розраховували, використовуючи наступне рівняння:

$$\% \text{ Пошкоджених клітин} = \frac{(\text{КУО}_{\text{TCADE}} - \text{КУО}_{\text{TCADE+NaCl}})}{\text{КУО}_{\text{TCADE}}} \times 100$$

Всі 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. Після цього був проведений пост-хок-аналіз Тьюкі для аналізу відмінності середніх значень. Відмінності при $p < 0,05$ вважалися значущими.

Результати дослідження та їх аналіз викладені у наступних 7 розділах відповідно до основних напрямків наукових розробок.

Розділ 3. Інактивація *Escherichia coli* O157:H7 рідкими дезінфектантами.

У розділі представлено результати порівняльного аналізу ефективності деконтамінації листя шпинату *Spinacia oleracea*, штучно інокульованого *E. coli* O157:H7, та впливу обробки на природну епіфітну мікрофлору. Досліджено дію дезінфікуючих засобів (гіпохлориту натрію, Pro-San L, леулінової кислоти з SDS) за різних методів нанесення: розпилення, занурення та сухого вакуумного просочування. Доведено, що всі досліджувані засоби при розпиленні демонструють схожу ефективність (зниження *E. coli* на 2,3-2,8 lg КУО/г), проте менш дієві проти природної флори через явище інтерналізації мікроорганізмів у структуру листа. Найвищий рівень інактивації мікроорганізмів (4,4 lg КУО/г) досягнуто методом занурення. Вакуумне просочування виявилось менш ефективним за занурення та спричинило пошкодження тканин. Також оцінено вплив тривалості експозиції на якість продукції: доведено, що короткочасна обробка (до 1 години) є безпечною для органолептичних властивостей шпинату, тоді як тривалий контакт із дезінфектантами викликає втрату тургору та зміну кольору листя.

Розділ 4. Інактивація *Escherichia coli* газоподібним озоном.

У цьому розділі наведено результати дослідження процесу інтерналізації бактерій *E. coli* K12 у тканини листя шпинату *Spinacia oleracea* під час вакуумного охолодження. Експерименти проводилися за двох рівнів тиску (0,6 кПа та 0,9 кПа) та з різною швидкістю відновлення атмосферного тиску (швидке – 2,19 л/хв та повільне – 0,35 л/хв). Встановлено критичний вплив параметрів процесу та анатомічної будови листка на ступінь бактеріальної інфільтрації. При тиску 0,6 кПа та швидкому відновленні тиску інтерналізація (2,35 lg КУО/г) спостерігалася лише на абаксіальній (нижній) стороні листка, що пояснюється більшою кількістю продихів. Підвищення тиску до 0,9 кПа при швидкому відновленні запобігало проникненню бактерій з обох сторін. Водночас повільне

відновлення тиску сприяло інтерналізації мікроорганізмів як з адаксіальної, так і з абаксіальної сторін незалежно від рівня вакууму (0,6 або 0,9 кПа).

Були показані результати порівняльного аналізу методів інактивації *E. coli* O157:H7 на листі шпинату *Spinacia oleracea* із застосуванням газоподібного озону. Оцінено вплив різних протоколів тиску, ступеня завантаження камери та наявності вологи на поверхні продукту. Показано, що найефективнішим методом (інактивація 2,9 lg КУО/г) є озонування при атмосферному тиску з подальшим його підвищенням до 69 кПа. Застосування вакууму знижує ефективність обробки сухих зразків через інтерналізацію бактерій у тканини листа, хоча санітарна обробка *перед* вакуумним охолодженням рекомендована як більш дієва. Суттєвий вплив має співвідношення маси продукції до об'єму озону: при високому завантаженні озон швидко розпадається, знижуючи рівень інактивації до 1-2 lg КУО/г. Також виявлено, що водяна плівка на листі створює бар'єр для озону, проте вакуумна обробка зволжених зразків підвищує ефективність за рахунок випаровування надлишку вологи.

Було досліджено динаміку інактивації *E. coli* O157:H7 на листі молодого шпинату *Spinacia oleracea* під дією газоподібного озону різних концентрацій в умовах імітованого транспортування (протягом 3 діб при 4 °С). Порівнювалися режими безперервної подачі озону низької концентрації та комбіновані методи обробки. Встановлено пряму залежність ефективності знезараження від концентрації озону та часу експозиції. Низькі дози (0,032-0,106 г/м³) забезпечували зниження популяції на ~1 lg КУО/г, тоді як підвищення концентрації до 0,211 г/м³ дозволило досягти інактивації 3,7 lg КУО/г на третю добу. Найвищу ефективність продемонструвала комбінована обробка (початкова «ударна» висока доза 1,5 г/м³ під вакуумом з подальшим утриманням при низькій концентрації 0,106 г/м³), яка виявила сильний синергічний ефект. Проте, тривалий вплив озону негативно позначився на органолептичних властивостях шпинату: зафіксовано втрату тургору та знебарвлення листа (зростання показника світлосили L*), що свідчить про високу чутливість молодого шпинату до окисників.

Розділ 5. Застосування рідких та газоподібних дезінфектантів у комбінації для інактивації *Escherichia coli* O157:H7

У розділі представлено результати дослідження ефективності комбінованого застосування рідкого дезінфектанту Pro-San L та газоподібного озону для інактивації *E. coli* O157:H7 на шпинаті. Порівнювалися різні послідовності обробки (спочатку газ, потім рідина, і навпаки) та тривалість експозиції. Встановлено критичну роль послідовності операцій: попереднє застосування вакууму з озоном знижує ефективність подальшої обробки рідким засобом (інактивація лише 2,7 lg КУО/г) через інтерналізацію бактерій у тканини. Натомість, зворотна послідовність, а саме нанесення Pro-San L перед озонуванням – забезпечує синергічний ефект, досягаючи зниження популяції на 3,9 lg КУО/г (при використанні вакууму).

У довготривалих експериментах (3 доби) найвищу ефективність продемонстрував багатоетапний протокол: спрей Pro-San L + 30 хв озонування

високої концентрації + безперервна подача озону низької концентрації. Цей метод дозволив знизити рівень *E. coli* O157:H7 нижче межі виявлення, перевіривши результати окремого використання Pro-San L (4,9 lg КУО/г) та ізольованих озонових обробок.

Крім того було представлено аналіз впливу різних методів деконтамінації на зовнішній вигляд та товарну якість листя шпинату *Spinacia oleracea*. Оцінювалися зміни тургору, кольору та світлосили після обробки озоном, дезінфектантом Pro-San L та їх комбінації. Доведено, що тривала дія озону викликає «відбілювання» листя (ріст показника світлосили) та втрату тургору, тоді як тривалий контакт з Pro-San L призводить до появи коричневих плям (некрозу) у місцях скупчення рідини. Водночас, короткочасна експозиція (30–60 хв) для обох агентів не викликає видимих змін. Важливим результатом є те, що комбінована обробка (Pro-San L + Озон) спричиняє менше пошкоджень, ніж кожен метод окремо. Це можна пояснити двома факторами: випаровуванням агресивної лимонної кислоти під час вакуумного етапу та утворенням захисної плівки з поверхнево-активних речовин (SDS), яка оберігає тканини від окислювальної дії озону.

Розділ 6. Застосування озону для знезараження води

У розділі представлено результати дослідження ефективності методу електролізу для деконтамінації води різного походження: водопровідної, джерельної та води з відкритої водойми (Тернопільський став). Оцінювався вплив тривалості електролізу (2 та 5 хв) та додаткової експозиції (5 та 10 хв) на загальне мікробне число (ЗМЧ). Встановлено, що ефективність методу обернено пропорційна вихідному рівню забруднення та вмісту органічних речовин. Водопровідна вода була знезаражена практично повністю. У джерельній воді (вихідне ЗМЧ ~2,7 lg КУО/мл) досягнуто зниження на 2,0 lg КУО/мл, а при додатковій експозиції – повну елімінацію бактерій. Для води з водойми (ЗМЧ ~3,8 lg КУО/мл) ефективність була найнижчою (зниження на 0,9-1,2 lg КУО/мл), що пояснюється швидким розпадом озону та активних продуктів електролізу при взаємодії з органічними домішками. Також зафіксовано утворення осаду та зниження рівня мінералізації оброблених зразків, яке було статистично значущим для джерельної води (зменшення з 421 до 388 мг/л).

Було досліджено кінетику спонтанного розпаду озону у воді та вплив озонування на мікробіологічну та органолептичну стабільність джерельної води при тривалому зберіганні (1 місяць). Показано, що генерований озон демонструє нетипово високу стійкість у розчині: при початкових концентраціях 0,74 мг/л (режим 2 хв) та 1,72 мг/л (режим 5 хв) його сліди виявлялися до 3-ї та 4-ї доби відповідно. Це суперечить даним про швидкий напіврозпад електролітичного озону (10-40 хв), проте узгоджується з дослідженнями озону, отриманого за нанобульбашковою технологією. Результати зберігання води протягом місяця показали достовірне зростання мікрофлори та поява жовтого осаду у необробленому контролі. При обробці протягом 2 хв було зафіксовано повторний ріст бактерій (з 0,61 до 1,92 lg КУО/мл), проте без видимих ознак

псування. При обробці протягом 5 та 10 хв зберігалася стерильність та прозорість води протягом усього терміну зберігання.

Було досліджено залежність концентрації електролітично генерованого озону від фізико-хімічних властивостей води та наявності біологічного забруднення. Порівнювали процес насичення озоном водопровідної та джерельної води, а також кінетику розпаду озону в присутності *S. aureus* ATCC 6538. Встановлено, що у водопровідній воді генерація озону відбувається ефективніше (2,98 мг/л проти 2,00 мг/л у джерельній) завдяки вищому рівню мінералізації, що покращує електропровідність, та меншому вмісту органічних домішок. Натомість у джерельній воді частина генерованого озону миттєво витрачається на окислення природної органіки та мікрофлори. Експериментально підтверджено, що бактеріальне забруднення значно прискорює розпад озону: за 60 хвилин у суспензії з *S. aureus* концентрація озону впала до 2,69 мг/л, тоді як у контрольній (чистій) воді вона залишалася на рівні 3,52 мг/л. Це свідчило про активне споживання окислювача бактеріальними клітинами.

Розділ 7. Медичне застосування озонованої води

У розділі проаналізовано вплив водного розчину озону на полірезистентні клінічні штами мікроорганізмів, виділених з ран військових. Дослідження показало, що попередня обробка бактерій озонованою водою викликає сублетальні пошкодження клітин, які проявляються у відновленні чутливості до антибіотиків (збільшення зон затримки росту в тесті Кірбі-Бауера). Кількісна оцінка сублетальних пошкоджень (зниження росту на селективному середовищі) штамів *S. aureus* виявила пошкодження 89,19 % бактеріальних клітин після 15 хв обробки. Для *E. coli* після 15 хв обробки частка сублетально пошкоджених клітин сягнула 98,57 %.

Крім того у розділі представлено результати клінічного застосування електролітично озонованої води у комплексному лікуванні 27 пацієнтів з бойовими травмами (мінно-вибухові рани, опіки, обмороження) на базі медичного центру «Angelholm» (м. Чернівці). У пацієнтів переважали моноінфекції (59 %), а основними збудниками були полірезистентні штами *Acinetobacter baumannii* (28,9 %) та *Staphylococcus aureus* (20,0 %).

Озонована вода використовувалася як ад'ювантна терапія для зрошення ран під час перев'язок та у поєднанні з терапією негативним тиском (NPWT), зокрема для профілактики анаеробної інфекції. Для складних глибоких ран застосовували імпульсне промивання під високим тиском. Результати лікування продемонстрували високу клінічну ефективність методу, а саме: стимуляцію росту здорової грануляційної тканини, зниження ризику вторинного інфікування, 100 % приживлюваність шкірних трансплантатів (відсутність відторгнення), а також шпільне загоєння без септичних ускладнень на тлі системної антибіотикотерапії.

Розділ 8. Знешкодження мікроорганізмів та бактеріальних спор помірним електричним полем самостійно та у комбінації з обробкою газоподібним озоном

У розділі досліджено вплив помірного електричного поля (ПЕП) напруженістю 300 В/см у поєднанні з помірною термічною обробкою (55, 65, 75 °С) на інактивацію та проростання спор *Bacillus subtilis*. Встановлено, що окреме застосування помірного нагрівання не викликає інактивації спор, а самостійна обробка ПЕП (при <30 °С) демонструє незначний ефект (зниження на 0,6 lg КУО/мл). Однак комбінована обробка виявила виражений синергічний ефект, який залежав від температури та часу експозиції. Максимальна інактивація (2,5 lg КУО/мл) досягнута при поєднанні ПЕП та температури 75 °С протягом 60 хвилин.

Для з'ясування механізму дії (інактивація чи індукція проростання) проведено тести з термічним шоком (80 °С) та конфокальну лазерну скануючу мікроскопію з барвниками SYTO 9 та йодид пропідію. Відсутність додаткової інактивації після термічного шоку та зміна флуоресценції спор із зеленої на червону свідчать про те, що ПЕП за помірних температур викликає пряме незворотне пошкодження кортексу та внутрішніх мембран, а не стимулює проростання спор.

Крім того у розділі досліджено ефективність інактивації *E. coli* K12 у сирих яйцях у шкаралупі за допомогою комбінації ПЕП та газоподібного озону при температурах до 55 °С. Показано, що застосування ПЕП дозволяє досягти значно вищого рівня інактивації (додатково 0,94 lg КУО/г) порівняно з традиційною термічною обробкою тієї ж температури при оцінці на селективному середовищі (MacConkey агар). Це відкриває перспективу зниження температури пастеризації яєць на ~3 °С, що є критичним для збереження функціональних властивостей білка. Попередня обробка газоподібним озоном у даній конфігурації не виявила очікуваного синергічного ефекту.

Важливим результатом є виявлення феномену сублетальних пошкоджень: на неселективному середовищі (Plate count agar) різниця між ПЕП та термічною обробкою була відсутня. Це свідчить про те, що бактерії після ПЕП зберігають здатність до відновлення в ідеальних умовах, проте втрачають життєздатність на селективних середовищах.

Розділ 9. Знешкодження мікроорганізмів та бактеріальних спор високим гідростатичним тиском, ультразвуком, імпульсним електричним полем та їх комбінацією

У розділі досліджено можливість використання вимірювання електропровідності суспензії *in situ* як методу реального часу для моніторингу інактивації *Listeria innocua* під дією високого гідростатичного тиску (ВГТ). Експерименти проводилися у діапазоні тисків 300, 400 та 500 МПа. Встановлено, що процес обробки ВГТ супроводжується зростанням електропровідності середовища. Виявлено ключову відмінність у динаміці процесу: у безклітинних розчинах провідність стабілізується після досягнення теплової рівноваги, тоді як у бактеріальних суспензіях вона продовжує зростати протягом усього періоду витримки під тиском. Це явище пояснюється безперервною ексудацією внутрішньоклітинних електролітів через пошкоджені мембрани бактерій.

Доведено прямий зв'язок між ступенем зростання електропровідності та рівнем летальних і сублетальних пошкоджень клітин. Це дозволяє оцінювати ефективність мікробної інактивації безпосередньо під час процесу обробки високим тиском, без необхідності чекати результатів мікробіологічного посіву.

Представлено порівняльний аналіз ефективності інактивації спор *Bacillus subtilis* під дією ВГТ у двох режимах: одноразовому (ОР-ВГТ, 10 хв безперервно) та багаторежимному/імпульсному (БР-ВГТ, 3 цикли із загальною витримкою 10 хв). Дослідження проводилися в діапазоні тисків 200-500 МПа при температурах 40 °С та 60 °С.

Встановлено, що імпульсний режим (БР-ВГТ) є значно ефективнішим за безперервний: максимальний рівень інактивації досягнуто при 500 МПа та 60 °С – $(5,8 \pm 0,3)$ lg КУО/мл, що на 1,2 lg вище, ніж при ОР-ВГТ. Тести з додатковим термічним шоком (80 °С) виявили, що в обох випадках відбувається інтенсивне проростання спор (тиск стимулює перехід спор у вегетативний стан), що робить їх чутливими до тепла. Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія підтвердила, що обробка ВГТ призводить до втрати цілісності мембран: спори, оброблені в імпульсному режимі при 60 °С, масово забарвлювалися йодидом пропідію в червоний (інактивовані) або оранжевий (нежиттєздатні/пермеабілізовані) колір.

Було досліджено ефективність інактивації *Listeria innocua* шляхом комбінування високого гідростатичного тиску з імпульсним електричним полем (ІЕП) та ультразвуком (УЗ). Встановлено, що ефективність комбінованих методів критично залежить від способу поєднання (одночасно чи послідовно) та порядку застосування факторів:

1. ВГТ та ІЕП: Послідовна обробка (незалежно від черговості) дає лише адитивний ефект (~ 2 lg КУО/мл), оскільки час перенесення зразків дозволяє клітинам відновитися. Натомість одночасна дія обох факторів забезпечує синергічний ефект (>3 lg КУО/мл) завдяки сумісній дії механічного та електричного стресу на мембрани.
2. ВГТ та УЗ: Порядок має вирішальне значення. Обробка «УЗ→ВГТ» дає лише адитивний результат, оскільки УЗ діє локально (кавітація) і залишає частину популяції неушкодженою. Найефективнішою є послідовність «ВГТ→УЗ» (синергія, ~ 3 lg КУО/мл): тиск сублетально пошкоджує всю популяцію клітин, роблячи їх вразливими до подальшої дії ультразвуку.

Аналіз супернатанту показав відсутність витоку білків, попри зростання електропровідності. Це свідчить про те, що утворені пори в мембранах є достатніми для виходу електролітів, але замалими для дифузії великих макромолекул.

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 ± 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 листя *Spinacia oleracea*.

3. Доведено, що ефективність застосування газоподібного озону залежала від співвідношення маси продукту до газоподібного озону. Більша маса продукції (26,6 кг/м³) спричиняла його швидшу декомпозицію (до 5 хвилин від 1,5 г/м³ до 0 г/м³). 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 породи 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 ($1,5 \text{ г/м}^3$) з подальшою тривалою обробкою (до трьох діб) низькою концентрацією озону ($0,106 \text{ г/м}^3$) мала синергічний ефект на інактивацію *E. coli* O157:H7 (інактивація на $3,8 \text{ lg КУО/г}$ 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 $3,9 \text{ lg КУО/г}$). Підвищення тиску у ємності для обробки до $68,9 \text{ кПа}$ 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 $4,9 \text{ lg КУО/г}$ та $4,7 \text{ lg КУО/г}$ 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 $1,72 \text{ мг/л}$ 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 $1,5 \text{ lg КУО/мл}$) водопровідна вода була повністю очищена. Джерельну воду, що містила в середньому $2,7 \text{ lg КУО/мл}$, було ефективно дезінфіковано за допомогою 5-хвилинної обробки з додатковою 5-хвилинною експозицією. У воді, отриманій з відкритої водойми, із $3,8 \text{ lg КУО/мл}$, не вдалося нейтралізувати всі наявні в ній бактерії. Після 5-хвилинної обробки та додаткової 10-хвилинної експозиції було знешкоджено $1,9 \text{ lg КУО/мл}$. 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 аутотрансплантатів.

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

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

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] (Україна) *(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] (Україна) *(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] (Україна) *(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] (Україна) *(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] (Україна) *(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] (Нідерланди) *(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. *Анали Мечниковського Інституту*. 2023 Jun 16(2):45-8. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8048366>. [фахове видання України, 222-Медицина] (Україна) *(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] (Україна)
 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] (Україна) *(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] (Україна)
 11. 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> [фахове видання України, 222-Медицина] (Україна) *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису, підготовка статті до друку)*
 12. 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;10(1):47–55. <https://doi.org/10.61751/ijmmr/1.2024.47> [фахове видання України, 222-Медицина] (Україна) *(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] (Польща) *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, пошук та опрацювання літератури, написання рукопису, підготовка статті до друку)*
 14. Pyatkovskyy T, Pokryshko O, Markowski A, Chernyshova A, Danylkov 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] (Велика Британія) *(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] (Україна) *(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] (Україна) *(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] (Україна) *(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] (Україна) *(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] (Україна) *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, написання рукопису, підготовка статті до друку)*

Патенти:

1. Патент України на корисну модель №155668 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. [патент України на корисну модель] *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту)*

Наукові праці, які засвідчують апробацію результатів 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 ХХІІІ 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)*

Праці, які додатково відображують наукові 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] (Велика Британія) *(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] (Велика Британія)

- (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] (США) *(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] (Велика Британія) *(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] (США) *(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] (Нідерланди) *(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] (Велика Британія) *(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] (Велика Британія) *(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] (Нідерланди) *(Особистий внесок здобувача: планування експериментів, написання частини рукопису, участь у підготовці статті до друку)*

NATIONAL PIROGOV MEMORIAL MEDICAL UNIVERSITY,
VINNYTSYA
MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE

PYATKOVSKYY TARAS IVANOVYCH

UDC 579.61:616-008.97:614.48

**MICROBIOLOGICAL VALIDATION OF THE EFFECTIVENESS OF
ALTERNATIVE METHODS FOR INACTIVATING MICROORGANISMS
USING A COMBINATION OF NON-THERMAL AND THERMAL FACTORS**

03.00.07 – microbiology

22 – Healthcare

Abstract

dissertation for the degree of
Doctor of Medical Sciences

Vinnytsya – 2026

The dissertation is a manuscript.

The work was carried out at the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine.

Official opponents:

Kovalchuk Valentin Petrovich, Doctor of Medical Sciences, Professor, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya of the Ministry of Health of Ukraine, Chair of the Department of Microbiology;

Hruzevskyi Oleksandr Anatoliyovych, Doctor of Medical Sciences, Professor, Odessa National Medical University, Professor in the Department of General and Clinical Epidemiology and Biosafety with a Course in Microbiology and Virology;

Kondratyuk Vyacheslav Mykolayovych, Doctor of Medical Sciences, National consultant on training in antimicrobial stewardship in Ukraine, WHO Country Office in Ukraine.

The dissertation defense will take place at a meeting of the specialized academic council D 05.600.03 at National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya the Ministry of Health of Ukraine (21018, Vinnytsia, Pirogov St., 56).

The dissertation can be viewed in the scientific library. at National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya the Ministry of Health of Ukraine (21018, Vinnytsya, Pirogov St., 56).

**Scientific Secretary
of the Specialized Scientific Council D 05.600.03,
Doctor of Medical Sciences,
Professor**

Mariia SHINKARUK-DYKOVYTSKA

GENERAL CHARACTERISTICS OF THE WORK

Substantiation of the choice of research topic and relevance. Outbreaks of acute intestinal infections caused by pathogenic microorganisms pose significant challenges to healthcare systems and result in substantial economic losses worldwide (AL-Mamun et al., 2018). These outbreaks are caused by various microorganisms, including bacteria, viruses, pathogenic protozoa, and fungi, which contaminate drinking water or food products at various stages of production, processing, and distribution (Chakka et al., 2021; T. Pyatkovskyy et al., 2016). Pathogens such as *Salmonella* spp., pathogenic strains of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Campylobacter* spp. are among the most common causes of acute intestinal infections (AL-Mamun et al., 2018). These microorganisms can multiply in a variety of environments and often exhibit resistance to many stress factors, which complicates their inactivation. Understanding the nature of the spread of these pathogens is crucial for developing effective inactivation measures to enhance the safety of food products and drinking water.

Traditional thermal methods, such as pasteurization and sterilization, have long been the cornerstone of food safety protocols due to their effectiveness in inactivating a wide range of harmful microorganisms. However, these methods often have a negative impact on the organoleptic and nutritional qualities of food products. As consumer demand for fresh, minimally processed foods continues to grow, so does the need for alternative processing methods that can ensure microbiological safety without compromising food quality (Khouryieh, 2021; Zhang et al., 2019).

Clean water is an essential resource for both human life and various industrial sectors (Gomes et al., 2019; Pyatkovsky et al., 2023). Natural disasters, man-made accidents, and military operations can have a significant and devastating impact on water quality for residents in such areas due to the destruction of water supply and wastewater infrastructure, including water treatment facilities, distribution systems, and sewage facilities (Shumilova et al., 2023). Providing clean water to civilians, military personnel, rescue workers, and volunteers in areas with destroyed civilian infrastructure is of utmost importance (T. Pyatkovskyy et al., 2024).

Non-thermal methods have emerged as a promising alternative to conventional thermal treatments for the inactivation of microorganisms in food products and water (Ross et al., 2003; Sastry, 2016; Van Impe et al., 2018). These methods include high hydrostatic pressure (HHP) treatment (Bolumar et al., 2021; Gunther et al., 2019; Torres & Velazquez, 2005), treatment with moderate or pulsed electric fields (MEF, PEF) (Buckow et al., 2013; Knorr et al., 2002; Mok et al., 2022; Schottroff et al., 2019), ultraviolet (UV) light irradiation (Cebrián et al., 2016; Schottroff et al., 2018), ultrasound (US) treatment (Fan et al., 2019; Ko & Bai, 2022; Rastogi et al., 2007), and the application of gaseous ozone (Perry et al., 2019; Predmore et al., 2015; T. Pyatkovskyy et al., 2016) or its aqueous solution (Epelle et al., 2022; Khadre et al., 2001; Melanie et al., 2024). These methods offer the potential for effective inactivation of microorganisms while preserving the taste, texture, and nutritional value of food products (Rastogi et al., 2007). Furthermore, non-thermal methods can be applied to a

variety of food and pharmaceutical matrices, ranging from liquids to solids, making them versatile tools in the arsenal of medicine, pharmacy, and the food industry against bacterial contaminants. Some of these methods can effectively inactivate microorganisms and the biofilms they form on the surfaces of medical instruments and equipment (Marino et al., 2018; M. Murakami et al., 2021; Shao et al., 2020).

As the medical, pharmaceutical, and food industries continue to innovate, understanding and utilizing these non-thermal technologies will be crucial for microbiological safety in these sectors.

The connection of work with scientific programs, plans, topics. This dissertation was completed in accordance with the research plan of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology at I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine. In addition, research was conducted at the Department of Food Science and Technology at The Ohio State University, USA, and the Department of Food, Agricultural, and Biological Engineering at The Ohio State University, USA.

Most of the research was conducted during a research internship (USA, 2012–2020) funded by grants from the 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) and individual commercial grants. At the Department of Microbiology, Virology, and Immunology of the I. Horbachevsky of the Ministry of Health of Ukraine, the research was conducted as part of the independent research project “Features of Resistance Formation in Representatives of Conditionally Pathogenic Flora under Conditions of Health and Pathology” (State Registration No. 0122U000035). The dissertation author is a co-investigator on this project.

Aim of the study: the improvement of preventive measures against acute intestinal and wound infections by demonstrating the effectiveness of alternative methods for inactivating microorganisms through the combination of non-thermal and thermal factors.

Research objectives:

1. To identify the factors influencing the penetration of *Escherichia coli* into spinach leaf tissue.
2. To investigate the potential for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of spinach leaves using liquid disinfectants.
3. Investigate the use of gaseous ozone to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on the surface and within the thickness of spinach leaves.
4. Justify the feasibility of the combined use of liquid and gaseous disinfectants to inactivate *Escherichia coli* O157:H7.
5. Evaluate the effectiveness of electrolytic treatment for water disinfection and investigate the antimicrobial properties of the resulting ozonated water.
6. Investigate the effectiveness of inactivating Gram-negative bacteria and bacterial spores using a moderate electric field.

7. Demonstrate the feasibility of monitoring bacterial inactivation during high hydrostatic pressure treatment using *Listeria innocua* as an example.

8. Investigate the effectiveness of a combination of high hydrostatic pressure, ultrasound, and a pulsed electric field for the inactivation of *Listeria innocua*.

9. Evaluate the effectiveness of high hydrostatic pressure treatment for the inactivation of *Bacillus subtilis* spores.

Scientific novelty of the results obtained. This dissertation is the first to demonstrate the possibility of bacterial contamination of vacuum cooling chambers and the penetration of bacteria into the thickness of leafy greens during the vacuum cooling process. The parameters of bacterial penetration were established, and methods for inactivating internalized bacteria were developed.

For the first time, an optimal combination of liquid and gaseous disinfectants was established, which produced an additive inactivation effect against *E. coli* O157:H7.

A new combination of liquid disinfectant application followed by long-term treatment with gaseous ozone was developed and successfully applied, which rapidly reduced the number of enterohemorrhagic *E. coli* O157: H7, thereby reducing the risk of foodborne outbreaks even at high initial contamination levels of food raw materials while preserving the biological value of the products.

The long-term effect of electrolytic treatment of spring water was demonstrated, with no bacterial growth or change in water color for one month after treatment, thereby preventing the risk of intestinal infection outbreaks during long-term storage of drinking water. The lethal and sublethal effects of ozonated water (ozone concentration up to 4 mg/L) on clinical strains of *S. aureus* and *E. coli* have been demonstrated.

The effectiveness of combining treatment of a *B. subtilis* spore suspension with a moderate electric field at 300 V/cm and moderate sublethal heat treatment was demonstrated, resulting in a significant reduction in the concentration of viable spores. It was also shown that the combination of a moderate electric field (15.7 V/cm) and heat treatment at 55 °C reduces the population of *E. coli* K12 inside chicken eggs and causes sublethal damage to bacterial cells.

It was established for the first time that measuring electrical conductivity during the treatment of a *Listeria innocua* suspension with high hydrostatic pressure can be used to monitor the degree of cell damage. It was demonstrated that simultaneous treatment with high hydrostatic pressure and a pulsed electric field increased electrical conductivity the most.

It has been shown for the first time that repeated treatment of a *B. subtilis* spore suspension with high hydrostatic pressure was more effective in inactivating the spores than a single treatment with pressure for the same duration.

The practical significance of the results obtained lies in the development of unique protocols for the combined use of liquid and gaseous disinfectants, high hydrostatic pressure, and a pulsed electric field. The results of laboratory and microbiological studies provide scientific justification for the practical application of non-thermal methods for inactivating bacteria or bacterial spores on food products and in liquids.

While conducting microbiological studies, the author experimentally substantiated for the first time the application of a new technique for inoculating microorganisms—for these results, the author received a Ukrainian Utility Model Patent (Pat. No. 155668).

The main materials and provisions of the dissertation have been implemented into the educational process of the relevant departments: the Department of Microbiology, Virology, and Immunology and the Department of General Hygiene and Ecology of the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine), as well as in the work of the bacteriological laboratories of Panakeya Medical Laboratory LLC, Ternopil Municipal Hospital No. 2, and the State Institution “Ternopil Regional Center for Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Ukraine”.

Publications. The scientific and practical findings of the dissertation are fully presented in the works published on the dissertation topic. Based on the dissertation, 50 scientific papers have been published, including 16 in Ukrainian scientific journals, 12 in foreign scientific journals indexed in the international scientometric databases Scopus and Web of Science, 21 abstracts of reports at domestic (9) and international (12) scientific conferences, and 1 Ukrainian patent for a utility model.

Scope and structure of the dissertation. The dissertation is a qualifying scientific work in the form of a manuscript, comprising 260 pages of printed text. The dissertation consists of the following structural elements: an abstract, an introduction, a literature review, a section on research materials and methods, 7 chapters of original research, conclusions, a list of references, and appendices. The list of references includes 336 items. The work contains 55 figures and 9 tables.

MAIN CONTENT OF THE DISSERTATION

Literature review. The literature review examines the current state of the use of non-thermal methods for inactivating microorganisms in various fields. It describes the mechanisms of antibacterial action of liquid antiseptics and disinfectants, ozone (gaseous, its aqueous solution, and ozonated oils), high hydrostatic pressure, moderate and pulsed electric fields, as well as ultrasound.

Materials and Methods. The study was conducted at the Department of Microbiology, Virology, and Immunology of the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, the Department of Food Science and Technology at The Ohio State University, and the Department of Food, Agricultural, and Biological Engineering at The Ohio State University. The Bioethics Committee of the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine found no violations of moral and ethical standards during the conduct of the research (Minutes No. 77 of April 18, 2024, and No. 84 dated January 20, 2026).

The *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43889 strain was used for experiments with gaseous ozone and liquid disinfectants. For some of the experiments with gaseous ozone and experiments on the internalization of bacteria into spinach leaves under vacuum, the same strain was used, as well as *E. coli* K12. The *E. coli* K12 strain was

also used for experiments involving the treatment of raw chicken eggs with a moderate electric field. For experiments on ozone decomposition in an aqueous solution, the strains *E. coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, obtained from the culture collection of the Laboratory of Microbiological and Parasitological Research at Ternopil National Medical University, were used. For high-pressure experiments, the non-pathogenic strain *Listeria innocua* ATCC 33090 was selected. Additionally, the strain *Bacillus subtilis* 168 was used.

To verify the effectiveness of water disinfection with ozone, samples were taken of tap water (Ternopil city, “Center” neighborhood), spring water (the village of Hai-Hrechynski, Ternopil district), and water from open bodies of water (Ternopil Pond). Water samples were collected in sterile vials on the day of the experiment and delivered to the laboratory.

In preparation for the experiments, a loop of frozen (at -80 °C) culture was revived on the appropriate medium at 37 °C. The grown culture was harvested by centrifugation, and the pellet was resuspended in 0.1% peptone water or sterile deionized water, depending on the task.

When working with *Bacillus subtilis* strain 168, the spores were gently washed off the agar surface with sterile deionized water and rinsed to remove any remaining medium through several cycles of centrifugation and resuspension in sterile deionized water.

The number of microorganisms in all suspensions was determined by serial dilution followed by plating onto appropriate culture media.

Spinach samples weighing 5 g each (approximately six leaves) were inoculated with 20 drops of 2.5 µL each (50 µL per sample) of *E. coli* cell suspension to achieve an initial microorganism concentration of $\sim 10^7$ CFU/g.

To inoculate chicken eggs, they were placed on their sides, and a hole was pierced in the eggshell; then, 10 µL of a 9.5–10 log CFU/g *E. coli* K12 cell suspension was introduced into the egg white to a depth of 4 mm from the outer side of the shell, resulting in an initial bacterial concentration of 5.5 to 6 log CFU/g.

The following disinfectants were used: a) a 200 mg/L solution of sodium hypochlorite; b) a 200 mg/L solution of sodium hypochlorite containing 0.036% sodium dodecyl sulfate; c) Pro-San L, a commercially prepared solution containing 0.66% citric acid and 0.036% sodium dodecyl sulfate; and d) an aqueous solution of 0.66% levulinic acid with the addition of 0.036% sodium dodecyl sulfate. These liquid disinfectants were applied separately to the inoculated side of young spinach leaves at room temperature using a calibrated spray bottle. For control, inoculated samples were sprayed with sterile deionized water and sterile deionized water with the addition of 0.036% sodium dodecyl sulfate.

In subsequent experiments, Pro-San L was used to compare different methods of applying liquid disinfectants. The application methods included spraying, immersion, and “dry” vacuum impregnation, with an exposure time of 30 minutes. For immersion treatment, inoculated young spinach (*Spinacia oleracea*) was immersed in Pro-San L and held for 30 minutes without agitation. For control purposes, samples of inoculated spinach were sprayed with sterile deionized water and immersed in it. For dry vacuum

impregnation treatment, samples of inoculated young spinach leaves were placed in an empty container and vacuumed. Once the target pressure (~800 Pa) was reached, the container with spinach was filled with the disinfectant at 4°C through a polyurethane tube, the vacuum was slowly released, and the sample was held for a predetermined time (30 minutes).

For the long-term experiment, leaves of young spinach grown on-site were used. Pro-San L was sprayed 32 times; the treated samples were packaged and stored refrigerated at 4°C for three days. Samples for microbiological analysis were collected daily.

All experiments involving ozone treatment were conducted using the pilot-scale equipment described above, which allows for the application of gaseous ozone to leafy green vegetables under controlled conditions of pressure, temperature, and gaseous ozone flow. This equipment was equipped with a CSF-7 ozone generator connected to a Type K cylinder containing 99.6% oxygen and a device for the thermal destruction of ozone.

The efficacy of *E. coli* O157:H7 inactivation following ozone treatment was studied using three different protocols: introducing ozone under vacuum and maintaining it at a pressure below atmospheric pressure: “Vacuum, O₃ (under vacuum)”; ozone introduction under vacuum with an immediate increase in pressure in the chamber to 69 kPa: “Vacuum, O₃ + 69 kPa”; and ozone application at atmospheric pressure followed by an increase in pressure to 69 kPa: “O₃ (atm) + 69 kPa”. In all cases, the duration of ozone exposure on spinach leaves was set at 30 min, and the spinach loading in the chamber was 26 g/m³. Oxygen was used as a control instead of ozone: “Vacuum, O₂ + 69 kPa.”

To study the effect of the amount of spinach leaves on ozone decomposition, the “Vacuum, O₃ + 69 kPa” treatment protocol was used at 1.5 g/m³ of ozone and various spinach loading levels, starting from 26,600 g/m³ (maximum possible loading, corresponding to 7,980 g of spinach in the vessel) to 2,600 g/m³ (775 g of spinach in the vessel), 260 g/m³ (78 g of spinach in the container), and 26 g/m³ (7.8 g of spinach in the container). Microorganism inactivation was assessed by inoculating samples weighing ~5 g, corresponding to six spinach leaves, which were placed inside among uninoculated spinach leaves. Immediately after treatment, the inoculated samples were collected for microbiological analysis.

To study the effect of vacuum treatment during spinach leaf processing on the internalization of microorganisms into the leaf tissue, inoculated young spinach leaves were treated only with vacuum cooling (the pressure inside the chamber was returned to atmospheric levels at ~4 °C); some of the samples were also additionally treated with gaseous ozone at 1.5 g/m³ with the pressure increased to 69 kPa and held for 30 minutes. The leaf surfaces were then treated with 1.2% sodium hypochlorite for 30 seconds. Afterward, the samples were rinsed with sterile deionized water to remove residual sodium hypochlorite and exposed to UV light (260 nm) for 10 minutes on each side. Surface disinfection was verified by gently pressing the treated young spinach leaves against the surface of LB agar, which was later incubated at 37 °C for 48 hours. Surface disinfection was considered effective when no bacterial growth was observed

on the incubated plates. As a control, the total number of bacteria inoculated onto the spinach leaf surfaces was assessed by counting the CFU of homogenized young spinach leaves without prior surface treatment with 1.2% sodium hypochlorite and UV light.

Experiments were conducted to study the effect of watering spinach leaves on the efficacy of ozone against *E. coli* O157:H7. Dry and irrigated (sprayed with water from a household spray bottle to create a water film on the surface) samples of inoculated young spinach leaves (26 g/m³) were placed side by side in a chamber and treated with ozone according to two different protocols. In one case, the samples were subjected to vacuum cooling, and ozone was introduced under vacuum with immediate pressurization of the system to 69 kPa (“Vacuum, O₃ + 69 kPa”); in the other, ozone was applied at atmospheric pressure followed by a pressure of up to 69 kPa (“O₃ (atm) + 69 kPa”). Immediately after treatment, the inoculated samples were collected for microbiological analysis.

The effectiveness of treatment using low-concentration ozone over an extended period (up to three days) was evaluated both on its own and as a follow-up treatment after ozonation during the “Vacuum, O₃ + 69 kPa” vacuum cooling process. The same pilot equipment was used for this study, and the vessel was loaded to maximum capacity with the product (26,000 g/m³). Ozone was passed through the vessel at a flow rate of 2 L/min at 4 °C, and the inlet ozone concentration was maintained at 0.032, 0.106, 0.211, and 0.528 g/m³. Ozone concentration was monitored using an IN-2000 ozonometer, and inside the vessel, a sample of the gas mixture was periodically collected using a Dia-Vac R101-FP-CA1 pump to verify the concentration. Two samples of inoculated leaves were collected daily for microbiological monitoring. Inoculated young spinach leaves (control) were stored in a refrigerator (at 4 °C) and analyzed simultaneously with the ozone-treated samples.

Water treatment by electrolysis was performed using commercial portable devices with diamond-coated electrodes. To verify the device’s effectiveness, measurements of ozone concentration (one of the products of electrochemical reactions during electrolysis) were conducted.

The ozone concentration in water was measured photometrically using a PoolLab 1.0 photometer based on the intensity of the color change in a reaction with N,N-diethyl-p-phenylenediamine sulfate. To assess ozone decomposition in the presence of bacteria, 9 mL of freshly treated water was mixed with 1 mL of a suspension of *S. aureus* ATCC 6538 (~8 log CFU/mL). After mixing, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 3 minutes to separate the bacterial cells, and the ozone concentration in the resulting supernatant was measured. Identical measurements were performed in parallel, adding sterile distilled water to the electrolytically treated water instead of the bacterial suspension as a control. The actual time between sample collection and obtaining the measurement result was ~6 minutes; this was conventionally taken as 0 minutes for plotting on graphs.

The mineralization of the water samples was measured using a HI98301 conductivity meter. To do this, the electrodes were rinsed with distilled water at room temperature (23 ± 1 °C) and then immersed in the water sample under study.

To analyze color changes, samples were photographed using a Sony NEX 5n camera with a Sony 18-55 mm f/3.5-5.6 lens (spinach leaves) and a Nikon D3200 camera with a Nikon DX 18-55 mm 1:3.5-5.6 lens (water samples in the long-term experiment). Accurate color reproduction was achieved by calibrating to the X-Rite ColorChecker Passport palette using ColorChecker Passport software. Color changes in the samples were analyzed in a selected 10×10 pixel square using the free online software Image Color Extract, and the resulting dominant color values were expressed in the Lab color space. Where the “L*” parameter denotes lightness, “a*” and “b*” denote color, with “a*” indicating the ratio of the green and red color components [(-) – green, (+) – red], and “b*” denotes the ratio of the blue and yellow components [(-) – blue, (+) – yellow].

To treat a bacterial suspension of *Listeria innocua* with high hydrostatic pressure (HHP), a hydrostatic pressure system capable of reaching pressures up to 1034 MPa was used. HHP treatment was applied at 200 and 400 MPa. In experiments involving conductivity measurements during HHP treatment, the treatment was conducted at 300, 400, and 500 MPa for 0 and 60 minutes.

For experiments with *Bacillus subtilis* spores, 3 mL of spore suspension was placed into polyethylene bags, which were sealed without leaving any air bubbles. To monitor the temperature, a Type K thermocouple was attached to one of the bags, after which the two bags were placed in a high-pressure chamber for treatment. The temperature of the samples was regulated by passing propylene glycol of the appropriate temperature through the high-pressure chamber jacket. Treatment was performed at 200 and 500 MPa, 40 and 60 °C, in a single 10-minute cycle or three cycles of 3 minutes each.

To measure electrical conductivity in the suspension during HHP treatment, a suspension of *Listeria innocua* ATCC 33090 ($\sim 10^{10}$ CFU/mL) was hermetically sealed without air bubbles into a treatment chamber consisting of a ceramic tube equipped with two 5×8 mm platinum-coated titanium electrodes and a flexible polyethylene bag that ensured pressure transmission to the sample.

Inactivation of *B. subtilis* spores using a moderate electric field (MEF) was performed in a specially fabricated glass treatment chamber (length 1.0 cm, outer diameter 1.1 cm, and inner diameter 0.9 cm) equipped with two electrodes, each 0.9 cm in diameter. The electric field had a continuous waveform with an intensity of 300 V/cm and a frequency of 60.0 Hz, respectively. The current was supplied by a 20-kW ohmic heating generator, and the desired signal shape was generated by a function generator, triggering an insulated-gate bipolar transistor switch in the generator to discharge the capacitor. For each treatment, the chamber was flushed with 70% ethanol and rinsed with sterile distilled water, and the temperature change during EIP treatment was measured using a Type T thermocouple placed at the center of the sample volume and connected to an Agilent 34970A data acquisition unit operating with HP BenchLink Data Logger. During treatment, the sample temperature was maintained below 30 °C, 55 °C, 65 °C, and 75 °C by immersion in a chilled water bath using mineral oil as a coolant.

A system capable of simultaneous conventional heat treatment and PEF treatment was used to treat inoculated chicken eggs with a moderate electric field. A large water bath with a capacity of 19.3 L was used for conventional heat treatment. A specially designed flow-through chamber with a water drain was used for PEF treatment. Electrodes measuring 8.9×9.3 cm were placed parallel to the liquid flow at a distance of 7.6 cm from each other. Four large eggs were placed in this chamber between the electrodes. The liquid was supplied from a larger 19.3-liter water bath. Tap water with an electrical conductivity of approximately 0.049 S/m was used, and the temperature was maintained at approximately 55.5 °C. The liquid was pumped from the larger bath to the smaller one using a peristaltic pump at a flow rate of 11.7 mL/min. After entering the PEF chamber, the water filled the cavity until it reached the overflow level, and then returned to the larger water bath under the action of gravity. An electric current was applied to the electrodes at a voltage of 120 V using a model 7-2-53011-S transformer, which supplied voltage from a Powerstat type 3PN116B, creating an electric field of 15.7 V/cm and a current of approximately 0.5 A. The eggs were treated for 28 minutes, and data were recorded at 1-minute intervals. PEF treatment was performed simultaneously with conventional thermal treatment in a water bath (control).

The *Listeria innocua* ATCC 33090 suspension was treated with a pulsed electric field using an OSU-4A generator (10 kV, 100 A), which generates bipolar rectangular pulses. The effect of the pulsed electric field (PEF) was studied in the range of 10–30 kV/cm, using a series of two bipolar rectangular pulses, each lasting 10 μ s. To cool the samples to their initial temperature after each treatment series (temperature increase to 5 °C), there were pauses between pulses lasting 0.1–10 s.

Two different chambers were developed for PEF treatment, one for use under high-temperature and high-pressure (HT-HP) conditions, and the other for treatment at atmospheric pressure. Both were equipped with platinum-coated titanium electrodes with a diameter of 8 mm. The gap between the electrodes varied between 3 and 10 mm depending on the desired electric field strength. The temperature of the samples was measured using a Type K thermocouple and an Agilent 34970A data acquisition unit. The applied voltage and current were monitored on a Tektronix MSO4034 four-channel oscilloscope.

Ultrasonic treatment (UT) was performed using a 500-watt Q500 ultrasonic processor. A 0.5-inch transducer was used in all experiments. A plastic tube 100 mm long and 11 mm in diameter was used as the treatment chamber. A Type K thermocouple was inserted into the tube to measure the temperature. Before treatment, 7 mL of the sample was added to the chamber and placed in ice water to cool. When the temperature reached 5 °C, the probe was immersed in the suspension, and ultrasonic treatment was performed at a frequency of 20 kHz with 100% amplitude. Ultrasound was applied in pulse mode to maintain the sample temperature below 35 °C. The on and off cycles were set to 1 s and 10 s, respectively. After treatment, the samples were transferred to sterile vials and stored at 4 °C until microbiological analysis. Each experiment was conducted at least three times.

The inactivation of *Listeria innocua* was evaluated using HHP, PEF, and US, as well as combinations thereof. To determine whether the combinations had synergistic effects, each individual treatment was adjusted so that, when applied, it resulted in a one-order-of-magnitude reduction in bacterial concentration (inactivation of 1 log CFU of microorganisms). Synergy was considered to be present when the total inactivation after two different treatments exceeded two logarithms of CFU. The following treatments were used: ultrasonic treatment followed by HHP (US→HHP); HHP followed by ultrasonic treatment (HHP→US); PEF followed by HHP (PEF→HHP); HHP followed by PEF (HHP→PEF); simultaneous PEF and HHP (PEF+HHP). Since each sequential treatment required different equipment, transferring the sample from one treatment chamber to another took 5-10 minutes. In the case of simultaneous application of PEF and VGT, it was necessary to suspend the application of PEF for 20 s after each pair of bipolar pulses to allow the sample to cool to its initial temperature (maximum temperature increase of 5 °C). Each experiment was performed at least three times.

Protein analysis using bicinchoninic acid was used to determine the total protein concentration in solutions of intact and treated *Listeria innocua* suspensions. Samples were centrifuged at $13,322 \times g$ for 10 minutes, and the supernatants were analyzed. The solutions were reacted with BCA working reagent using a standard protocol (Walker, 1994). The color change of the samples was determined using a Thermo Spectronic Genesys 5 spectrophotometer at 562 nm.

To assess cytoplasmic membrane damage, staining with SYTO 9 and propidium iodide was used, followed by evaluation of the coloration of treated and untreated spores. SYTO 9 penetrates the membrane regardless of whether the organism is viable or not. By comparison, propidium iodide does not penetrate intact membranes and can therefore be used as an indicator of inner membrane damage during spore inactivation. Treated PEP and untreated spores were stained with 15 μM propidium iodide and 0.5 μM SYTO 9 for 15 minutes, then imaged using an Olympus BX61 confocal laser scanning microscope (CLSM). A 488 nm laser was used for excitation, and emission was observed at 528 nm for SYTO 9 and 645 nm for propidium iodide. Olympus DP Control software was used to acquire images and analyze signal intensity.

To count microorganisms on/in spinach leaves, treated and untreated (control) samples (~5 g) were placed in plastic homogenization bags and 45 mL of peptone water was added. The contents of the bags were homogenized for 2 min in an STO-400 homogenizer (Tekmar Inc., Cincinnati, Ohio, USA). The contents of the homogenization bags were serially diluted in peptone water, and aliquots of 0.1 mL were inoculated onto MacConkey agar (Difco, Becton-Dickinson, Sparks, Maryland, USA). Uninoculated samples were inoculated onto TSA (Difco, Becton-Dickinson, Sparks, Maryland, USA) to determine the total microbial count. The inoculated Petri dishes were incubated at 37 °C for 24 hours.

To count microorganisms in chicken eggs, the eggs were broken, and their contents were placed in plastic homogenization bags and homogenized for 2 minutes in an STO-400 homogenizer. The resulting liquid was serially diluted in peptone water,

and aliquots of 0.1 mL were inoculated onto the surface of plates containing MacConkey agar and Plate Count Agar.

Samples of *L. innocua* suspensions were serially diluted and inoculated onto two media: non-selective TSAYE (tryptic soy agar with 0.6% yeast extract) and selective TSAYE with 5% NaCl. Petri dishes were incubated for 48 hours at 35 °C.

The number of spores in treated and untreated samples was determined by inoculating them onto nutrient agar and incubating at 37 °C for 48 hours, followed by colony counting. To determine the effect of PEF and/or moderate heating on *B. subtilis* spores, the number of intact spores was determined by counting colonies on plates before and after treatment. To determine the number of germinated spores, samples were subjected to heat treatment (80 °C for 30 min), inoculated onto nutrient agar, and after incubation, compared with samples that were not subjected to heat treatment. The number of germinated spores was determined as the difference in the number of colonies with and without heat treatment.

To count the number of microorganisms in water, samples of treated and untreated (control) water were serially diluted in sterile saline, after which aliquots were mixed with nutrient agar that had been melted and cooled to 50 °C. To do this, 1 mL of the dilutions and undiluted samples were added to sterile Petri dishes, 10–12 mL of BiosanWB-4MS nutrient agar melted in a water bath was added, and the mixtures were combined by gently shaking the dishes. After the agar solidified, the dishes were incubated at 30 °C for 72 hours, followed by a count of colony-forming units (CFU).

Glass beads with a diameter of approximately 3.7 mm were used to inoculate the microbial suspension. Twenty beads were placed in test tubes prior to autoclave sterilization. Serial dilutions of the suspensions were performed by inoculating aliquots of 100 µL into appropriate solid media in plastic Petri dishes. Afterward, the sterile beads were poured into the Petri dishes, which were then covered with lids and gently shaken from side to side while rotating to ensure even distribution of the inoculum across the agar surface. The beads were subsequently transferred to a container with a disinfectant solution for reuse.

Clinical samples were collected from wounded military personnel and patients at the Swedish-Ukrainian Medical Center “Angelholm” in Chernivtsi, Ukraine (n = 27), and at the Ternopil Regional Clinical Hospital in Ternopil, Ukraine (n = 284). Samples of secretions from wounds and injuries were collected on sterile cotton swabs and transported to the laboratory in tubes containing Amies transport medium (Jiangsu Huida Medical Instruments Co., Ltd, Yancheng, China). Upon delivery, the samples were inoculated onto plates containing blood agar, egg yolk-saline agar (Sanimed-M LLC, Kharkiv, Ukraine), and MacConkey agar (bioMérieux, Marsey-l'Étoile, France), followed by incubation at 37 °C for 24–48 hours. The antibiotic susceptibility of the isolated strains was determined using the Vitek-2 Compact automated analyzer (bioMérieux, Marsey-l'Étoile, France) and the Kirby-Bauer disk diffusion method.

To count sublethally damaged bacteria, the processed samples were serially diluted and inoculated onto tryptic soy agar with 0.6% yeast extract (TSAYE) (Difco, Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) and selective TSAYE medium supplemented with 5% NaCl. Sublethal damage to bacterial cells was assessed by the

difference in counts between the two media. Petri dishes were incubated for 48 hours at 35 °C. The percentage of damage was calculated using the following equation:

$$\% \text{ Damaged cells} = \frac{(\text{CFU}_{\text{TSAYE}} - \text{CFU}_{\text{TSAYE+NaCl}})}{\text{CFU}_{\text{TSAYE}}} \times 100$$

All experiments were conducted at least three times. The number of standard deviations was expressed in logarithmic values (decimal logarithm lg). When calculating mean values, the standard deviation ($M \pm \text{sd}$) was used as the margin of error. The Shapiro-Wilk test was used to check the sample for normality of distribution. The equality of means between two samples was tested using Student's t-test. Comparisons between several groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Statistica 8.0 software. This was followed by a post-hoc Tukey test to analyze differences in means. Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

The results of the study and their analysis are presented in the following 7 sections in accordance with the main areas of scientific development.

Chapter 3. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by Liquid Disinfectants.

This chapter presents the results of a comparative analysis of the decontamination efficacy of *Spinacia oleracea* spinach leaves artificially inoculated with *E. coli* O157:H7, as well as the effect of treatment on the natural epiphytic microflora. The action of disinfectants (sodium hypochlorite, Pro-San L, levulinic acid with SDS) was studied using various application methods: spraying, immersion, and dry vacuum impregnation. It was demonstrated that all tested agents exhibit similar efficacy when sprayed (reduction of *E. coli* by 2.3–2.8 log CFU/g); however, they are less effective against the natural flora due to the internalization of microorganisms into the leaf structure. The highest level of microorganism inactivation (4.4 log CFU/g) was achieved by the immersion method. Vacuum impregnation proved less effective than immersion and caused tissue damage. The effect of exposure duration on product quality was also evaluated: it was demonstrated that short-term treatment (up to 1 hour) is safe for the organoleptic properties of spinach, whereas prolonged contact with disinfectants causes loss of turgor and discoloration of the leaves.

Chapter 4. Inactivation of *Escherichia coli* by gaseous ozone.

This section presents the results of a study on the internalization of *E. coli* K12 bacteria into the leaf tissue of *Spinacia oleracea* spinach during vacuum cooling. Experiments were conducted at two pressure levels (0.6 kPa and 0.9 kPa) and with different rates of atmospheric pressure recovery (rapid - 2.19 L/min and slow - 0.35 L/min). A critical influence of process parameters and leaf anatomy on the degree of bacterial infiltration was established. At a pressure of 0.6 kPa and rapid pressure recovery, internalization (2.35 log CFU/g) was observed only on the abaxial (lower) side of the leaf, which is explained by the greater number of stomata. Increasing the pressure to 0.9 kPa with rapid recovery prevented bacterial penetration from both sides. At the same time, slow pressure recovery facilitated the internalization of

microorganisms from both the adaxial and abaxial sides, regardless of the vacuum level (0.6 or 0.9 kPa).

The results of a comparative analysis of methods for inactivating *E. coli* O157:H7 on *Spinacia oleracea* spinach leaves using gaseous ozone were presented. The effects of different pressure protocols, chamber loading levels, and the presence of moisture on the product surface were evaluated. It was shown that the most effective method (inactivation of 2.9 log CFU/g) is ozonation at atmospheric pressure followed by an increase to 69 kPa. The use of vacuum reduces the effectiveness of treating dry samples due to the internalization of bacteria into leaf tissues, although sanitization prior to vacuum cooling is recommended as more effective. The ratio of product mass to ozone volume has a significant effect: at high loading, ozone rapidly decomposes, reducing the inactivation level to 1-2 log CFU/g. It was also found that a water film on the leaves creates a barrier to ozone; however, vacuum treatment of moistened samples increases efficiency by evaporating excess moisture.

The dynamics of *E. coli* O157:H7 inactivation on the leaves of young spinach (*Spinacia oleracea*) were studied under the influence of gaseous ozone at various concentrations under simulated transport conditions (for 3 days at 4 °C). Continuous low-concentration ozone supply regimes were compared with combined treatment methods. A direct dependence of disinfection efficiency on ozone concentration and exposure time was established. Low doses (0.032-0.106 g/m³) resulted in a reduction in population of ~1 log CFU/g, whereas increasing the concentration to 0.211 g/m³ allowed for inactivation of 3.7 log CFU/g by the third day. The highest efficacy was demonstrated by combined treatment (an initial “shock” high dose of 1.5 g/m³ under vacuum followed by maintenance at a low concentration of 0.106 g/m³), which exhibited a strong synergistic effect. However, prolonged exposure to ozone negatively affected the organoleptic properties of spinach: a loss of turgor and discoloration of the leaves (increase in the L* lightness value) were observed, indicating the high sensitivity of young spinach to oxidizing agents.

Chapter 5. Combined Use of Liquid and Gaseous Disinfectants for the Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7

This section presents the results of a study on the effectiveness of the combined use of the liquid disinfectant Pro-San L and gaseous ozone for the inactivation of *E. coli* O157:H7 on spinach. Different treatment sequences (gas first, then liquid, and vice versa) and exposure durations were compared. The critical role of the sequence of operations was established: prior application of vacuum with ozone reduces the effectiveness of subsequent treatment with the liquid agent (inactivation of only 2.7 log CFU/g) due to the internalization of bacteria into the tissue. In contrast, the reverse sequence—namely, applying Pro-San L before ozonation—provides a synergistic effect, achieving a population reduction of 3.9 log CFU/g (when using vacuum).

In long-term experiments (3 days), the multi-step protocol demonstrated the highest efficacy: Pro-San L spray + 30 min of high-concentration ozonation + continuous low-concentration ozone supply. This method reduced *E. coli* O157:H7 levels below the limit of detection, outperforming the results of using Pro-San L alone (4.9 log CFU/g) and isolated ozone treatments.

In addition, an analysis was presented of the effects of various decontamination methods on the appearance and market quality of *Spinacia oleracea* spinach leaves. Changes in turgor, color, and light reflectance were evaluated following treatment with ozone, the disinfectant Pro-San L, and a combination of the two. It was demonstrated that prolonged exposure to ozone causes “bleaching” of the leaves (increased light reflectance) and loss of turgor, whereas prolonged contact with Pro-San L leads to the appearance of brown spots (necrosis) in areas of fluid accumulation. At the same time, short-term exposure (30-60 min) to both agents does not cause visible changes. An important finding is that combined treatment (Pro-San L + Ozone) causes less damage than each method alone. This can be explained by two factors: the evaporation of aggressive citric acid during the vacuum stage and the formation of a protective film of surfactants (SDS), which shielded the tissues from the oxidative action of ozone.

Chapter 6. Application of Ozone for Water Disinfection

This section presents the results of a study on the effectiveness of electrolysis for decontaminating water from various sources: tap water, spring water, and water from an open reservoir (Ternopil Pond). The effect of electrolysis duration (2 and 5 min) and additional exposure (5 and 10 min) on the total microbial count (TMC) was evaluated. It was found that the method’s effectiveness is inversely proportional to the initial contamination level and organic matter content. Tap water was disinfected almost completely. In spring water (initial TMC ~2.7 log CFU/mL), a reduction of 2.0 log CFU/mL was achieved, and with additional exposure, complete elimination of bacteria was achieved. For water from a reservoir (initial COD ~3.8 log CFU/mL), the efficiency was the lowest (a reduction of 0.9-1.2 log CFU/mL), which is explained by the rapid decomposition of ozone and active electrolysis products upon interaction with organic impurities. Sediment formation and a decrease in the mineralization level of the treated samples were also observed, which was statistically significant for spring water (a decrease from 421 to 388 mg/L).

The kinetics of spontaneous ozone decomposition in water and the effect of ozonation on the microbiological and organoleptic stability of spring water during long-term storage (1 month) were investigated. It was shown that the generated ozone exhibits unusually high stability in solution: at initial concentrations of 0.74 mg/L (2-minute mode) and 1.72 mg/L (5-minute mode), traces of it were detected up to the 3rd and 4th days, respectively. This contradicts data on the rapid half-life of electrolytic ozone (10-40 min), but is consistent with studies of ozone produced using nanobubble technology. Results from storing water for one month showed a significant increase in microflora and the appearance of a yellow precipitate in the untreated control. During 2-minute treatment, a recurrence of bacterial growth was observed (from 0.61 to 1.92 log CFU/mL), but without visible signs of spoilage. During 5- and 10-minute treatments, the water remained sterile and clear throughout the entire storage period.

The dependence of the concentration of electrolytically generated ozone on the physicochemical properties of water and the presence of biological contamination was investigated. The ozone saturation process of tap water and spring water was compared, as well as the kinetics of ozone decomposition in the presence of *S. aureus* ATCC 6538. It was found that ozone generation is more efficient in tap water (2.98 mg/L vs.

2.00 mg/L in spring water) due to a higher level of mineralization, which improves electrical conductivity, and a lower content of organic impurities. In contrast, in spring water, part of the generated ozone is instantly consumed by the oxidation of natural organic matter and microflora. It has been experimentally confirmed that bacterial contamination significantly accelerates ozone decomposition: within 60 minutes in a suspension with *S. aureus*, the ozone concentration dropped to 2.69 mg/L, whereas in the control (clean) water it remained at 3.52 mg/L. This indicated active consumption of the oxidizing agent by bacterial cells.

Chapter 7. Medical Applications of Ozonated Water

This section analyzes the effect of an aqueous ozone solution on multidrug-resistant clinical strains of microorganisms isolated from military personnel's wounds. The study showed that pretreatment of bacteria with ozonated water causes sublethal damage to cells, which manifests as restored sensitivity to antibiotics (increased zones of growth inhibition in the Kirby-Bauer test). A quantitative assessment of sublethal damage (reduced growth on selective media) in *S. aureus* strains revealed damage to 89.19% of bacterial cells after 15 minutes of treatment. For *E. coli*, the proportion of sublethally damaged cells reached 98.57% after 15 minutes of treatment.

In addition, this section presents the results of the clinical application of electrolytically ozonated water in the comprehensive treatment of 27 patients with combat injuries (mine-blast wounds, burns, frostbite) at the Angelholm Medical Center (Chernivtsi). Monoinfections predominated among patients (59%), and the main pathogens were multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* (28.9%) and *Staphylococcus aureus* (20.0%).

Ozonated water was used as an adjunctive therapy for wound irrigation during dressing changes and in combination with negative pressure wound therapy (NPWT), particularly for the prevention of anaerobic infection. For complex deep wounds, high-pressure pulsed irrigation was employed. The treatment results demonstrated the method's high clinical efficacy, namely: stimulation of healthy granulation tissue growth, reduced risk of secondary infection, 100% survival rate of skin grafts (no rejection), as well as rapid healing without septic complications against the background of systemic antibiotic therapy.

Chapter 8. Inactivation of microorganisms and bacterial spores by a moderate electric field alone and in combination with gaseous ozone treatment

This chapter investigates the effect of a moderate electric field (MEF) with an intensity of 300 V/cm in combination with moderate heat treatment (55, 65, 75 °C) on the inactivation and germination of *Bacillus subtilis* spores. It was found that moderate heating alone does not inactivate spores, and MEF treatment alone (at <30 °C) has a negligible effect (a reduction of 0.6 log CFU/mL). However, combined treatment revealed a pronounced synergistic effect that depended on temperature and exposure time. Maximum inactivation (2.5 log CFU/mL) was achieved by combining MEF with a temperature of 75 °C for 60 minutes.

To elucidate the mechanism of action (inactivation or induction of germination), thermal shock tests (80 °C) and confocal laser scanning microscopy using SYTO 9 and propidium iodide dyes were performed. The absence of additional inactivation after

thermal shock and the change in spore fluorescence from green to red indicate that MEF at moderate temperatures causes direct irreversible damage to the cortex and internal membranes, rather than stimulating spore germination.

In addition, this section investigates the effectiveness of inactivating *E. coli* K12 in raw eggs in the shell using a combination of MEF and gaseous ozone at temperatures up to 55 °C. It was shown that the use of MEF allows for a significantly higher level of inactivation (an additional 0.94 log CFU/g) compared to traditional heat treatment at the same temperature when evaluated on a selective medium (MacConkey agar). This opens up the possibility of reducing the pasteurization temperature of eggs by ~3 °C, which is critical for preserving the functional properties of the protein. Pretreatment with gaseous ozone in this configuration did not reveal the expected synergistic effect.

An important result is the detection of the phenomenon of sublethal damage: on a non-selective medium (Plate Count Agar), there was no difference between MEF and heat treatment. This indicates that bacteria retain the ability to recover under ideal conditions after MEF, but lose viability on selective media.

Chapter 9. Inactivation of microorganisms and bacterial spores using high hydrostatic pressure, ultrasound, pulsed electric fields, and combinations thereof

This chapter investigates the possibility of using in situ measurement of suspension electrical conductivity as a real-time method for monitoring the inactivation of *Listeria innocua* under high hydrostatic pressure (HHP). Experiments were conducted at pressures of 300, 400, and 500 MPa. It was found that the HHP treatment process is accompanied by an increase in the electrical conductivity of the medium. A key difference in the dynamics of the process was identified: in cell-free solutions, conductivity stabilizes after thermal equilibrium is reached, whereas in bacterial suspensions, it continues to increase throughout the entire period of exposure to pressure. This phenomenon is explained by the continuous exudation of intracellular electrolytes through damaged bacterial membranes.

A direct correlation has been demonstrated between the degree of increase in electrical conductivity and the level of lethal and sublethal cell damage. This allows for the assessment of microbial inactivation efficiency directly during the high-pressure treatment process, without the need to wait for microbiological culture results.

A comparative analysis of the inactivation efficiency of *Bacillus subtilis* spores under HHP in two modes is presented: single-pass (SP-HHP, 10 min continuously) and multi-pass/pulsed (MP-HHP, 3 cycles with a total exposure time of 10 min). The studies were conducted in the pressure range of 200-500 MPa at temperatures of 40 °C and 60 °C.

It has been established that the pulsed mode (MP-HHP) is significantly more effective than the continuous mode: the maximum inactivation level was achieved at 500 MPa and 60 °C – (5.8 ± 0.3) log CFU/mL, which is 1.2 log higher than with the continuous HHP. Tests with additional thermal shock (80 °C) revealed that in both cases, intense spore germination occurs (pressure stimulates the transition of spores to the vegetative state), making them sensitive to heat. Confocal laser scanning microscopy confirmed that HHP treatment leads to loss of membrane integrity: spores

treated in pulse mode at 60 °C were extensively stained by propidium iodide in red (inactivated) or orange (non-viable/permeabilized) color.

The efficacy of *Listeria innocua* inactivation was investigated by combining high hydrostatic pressure with a pulsed electric field (PEF) and ultrasound (US). It was found that the efficacy of the combined methods critically depends on the mode of combination (simultaneous or sequential) and the order of application of the factors:

1. HHP and PEF: Sequential treatment (regardless of order) yields only an additive effect (~2 log CFU/mL), as the time required to transfer samples allows the cells to recover. In contrast, the simultaneous action of both factors provides a synergistic effect (>3 lg CFU/ml) due to the combined action of mechanical and electrical stress on the membranes.
2. HHP and US: The order is critical. Treating with “US→HHP” yields only an additive effect, since US acts locally (cavitation) and leaves part of the population unharmed. The most effective sequence is “HHP→US” (synergy, ~3 lg CFU/mL): the pressure subletally damages the entire cell population, making them vulnerable to subsequent ultrasound treatment.

Analysis of the supernatant showed no protein leakage, despite an increase in electrical conductivity. This indicates that the pores formed in the membranes are large enough for electrolytes to escape but too small for the diffusion of large macromolecules.

CONCLUSIONS

The dissertation presents a theoretical synthesis and a novel solution to a pressing scientific problem concerning the application of non-thermal methods for the inactivation of vegetative and spore-forming microorganisms, based on the results of the research conducted.

1. It is shown that bacterial contamination of vacuum cooling chambers and the penetration of bacteria into the thickness of leafy greens are possible during the vacuum cooling process. Bacteria located outside the vacuum cooling chamber, in a dry state, can be carried into the vacuum chamber and spread inside it during the stage of pressure restoration to atmospheric levels. It has been proven that within the chamber, the boiling of moist organic matter caused by the vacuum can spread contamination to other parts of the chamber. It has been established that in a vacuum cooling chamber, the internalization of bacteria up to 3 log CFU/g into the thickness of the green leaves occurs more intensively at lower pressure (0.6 kPa compared to 0.9 kPa) and a slower (0.35 L/min compared to 2.19 L/min) return to atmospheric pressure.

2. It was found that, for a liquid disinfectant to be effective, it must be applied in an amount of at least 23% of the weight of the *Spinacia oleracea* spinach leaves and left to act for at least 30 minutes. It was found that disinfectants were less effective against the epiphytic flora of *Spinacia oleracea* spinach leaves compared to inoculated microorganisms, showing a reduction in the number of epiphytic bacteria from 1.4 to 1.7 log CFU/g from an initial count of 5.2 to 7.5 log CFU/g due to the presence of an internalized microorganism population ((4.9 ± 0.5) log CFU/g), as confirmed by

experiments involving leaf surface disinfection. The type of disinfectant did not affect the efficacy of *E. coli* O157:H7 inactivation on *Spinacia oleracea* leaves via spraying, yielding approximately the same result (inactivation of 2.3-2.8 log CFU/g). It was determined that the use of the disinfectant Pro-San L, containing 0.66% citric acid and 0.036% sodium dodecyl sulfate, for the inactivation of *E. coli* O157:H7 by the immersion method was the most effective compared to the vacuum impregnation method, in which bacterial internalization was enhanced and the leaf tissue of *Spinacia oleracea* was damaged: (inactivation of 4.4 log CFU/g and 3.3 log CFU/g, respectively). Extending the exposure time of the Pro-San L disinfectant, which contained organic acid, to 3 days did not increase disinfection efficacy (inactivation ~ 4 log CFU/g), but led to progressive damage to *Spinacia oleracea* leaves.

3. It was demonstrated that the effectiveness of gaseous ozone depended on the mass ratio of the product to gaseous ozone. A higher product mass (26.6 kg/m³) resulted in its faster decomposition (within 5 minutes from 1.5 g/m³ to 0 g/m³). The effectiveness of gaseous ozone against *E. coli* O157:H7 increased after vacuum cooling (inactivation of 2.5 log CFU/g versus 1.9 log CFU/g), which removes liquid from the product's surface and allows the gaseous disinfectant to penetrate deeper into the stomata and crevices on the leaves of *Spinacia oleracea*. At the same time, it was shown that the use of liquid disinfectants after vacuum cooling is less effective (inactivation of 2.7 log CFU/g) than the use of a liquid disinfectant alone (inactivation of 2.8 log CFU/g) due to the internalization of inoculated bacteria into the product tissue, which occurred during the vacuum cooling process. It was found that short-term treatment (30 min) with a high concentration of ozone (1.5 g/m³) followed by prolonged treatment (up to three days) with a low concentration of ozone (0.106 g/m³) had a synergistic effect on the inactivation of *E. coli* O157:H7 (inactivation by 3.8 log CFU/g more than with prolonged treatment without booster treatment).

4. When liquid and gaseous disinfectants were combined, the effect observed was weaker than the additive effect in almost all cases. An additive effect of both disinfectants (gaseous ozone and liquid Pro-San L) was observed only when treatment with the liquid disinfectant was followed by the application of gaseous ozone during vacuum cooling of the product (inactivation of 3.9 log CFU/g). Increasing the pressure in the treatment chamber to 68.9 kPa improved efficacy by facilitating gas penetration to the pathogen. It was shown that the combination of liquid disinfectant spraying followed by long-term treatment with gaseous ozone reduced the number of *E. coli* O157:H7 below the detection limit (inactivation of over 6 log CFU/mL) after the first day of application and resulted in better-looking spinach leaves than the long-term use of liquid and gaseous disinfectants separately (inactivation of 4.9 log CFU/g and 4.7 log CFU/g, respectively).

5. It was found that treating 500 mL of spring water by electrolysis for two and five minutes produced aqueous ozone solutions with concentrations of 0.74 and 1.72 mg/L, respectively. It was established that the effectiveness of water disinfection by electrolysis depended on the initial concentration of microorganisms in the water and the duration of their contact with ozone and active oxygen species. Tap water with the lowest microbial contamination (up to 1.5 log CFU/ml) was completely purified.

Spring water, containing an average of 2.7 log CFU/mL, was effectively disinfected using a 5-minute treatment with an additional 5-minute exposure. In water obtained from an open reservoir, with 3.8 log CFU/mL, it was not possible to neutralize all the bacteria present in it. After a 5-minute treatment and an additional 10-minute exposure, 1.9 log CFU/mL were inactivated. After treatment with electrolytically ozonated water (up to 4 mg/L) for 15 minutes, sublethal damage to bacterial cells was observed in clinical strains of *S. aureus* and *E. coli*. Up to 89.2% of the *S. aureus* population and up to 98.6% of *E. coli* were sublethally damaged. The use of such water in the treatment of surgical wounds promoted their healing without rejection of autografts.

6. It has been shown that treating a suspension of *B. subtilis* spores with a moderate electric field (300 V/cm) in combination with moderate sublethal heat treatment (55, 65, and 75 °C) can lead to a significant reduction in their concentration. Treatment with a moderate electric field for 60 minutes neutralized 0.6 log CFU/mL at an initial suspension concentration of ~7 log CFU/mL. Using the same treatment in combination with heat treatment at 55, 65, and 75 °C, 1.8 log CFU/mL, 2.0 log CFU/mL, and 2.5 log CFU/mL were inactivated, respectively. It was found that treatment with a moderate electric field (15.7 V/cm) at 55 °C of raw chicken eggs inoculated with *E. coli* K12 reduced the microbial population inside the eggs and caused sublethal damage to bacterial cells. At an initial population concentration of 5.5-6 log CFU/g, such treatment inactivated ~4.4 log CFU/g, which is 0.9 log CFU/g more compared to thermal treatment at 55 °C in a water bath.

7. It has been demonstrated for the first time that measuring electrical conductivity during the treatment of a *Listeria innocua* suspension with high hydrostatic pressure (300, 400, 500 MPa) can be used to monitor the extent of cell damage. The results of the study showed that the electrical conductivity of the bacterial suspension increases with an increase in the number of fatally damaged cells. No increase in electrical conductivity was observed during the pressure release cycle, indicating that damage to *Listeria innocua* cells occurred mainly during periods of pressure increase and maintenance.

8. It was found that the effectiveness of treating a *Listeria innocua* suspension with a pulsed electric field depended on the field strength, with higher inactivation rates observed at higher voltages. Sequential treatments with high hydrostatic pressure (200 and 400 MPa) and a pulsed electric field (10–30 kV/cm) demonstrated predominantly additive effects (inactivation of ~2 log CFU/mL). However, a synergistic effect was observed with the simultaneous application of high hydrostatic pressure and a pulsed electric field (inactivation exceeding 3 log CFU/mL). Simultaneous treatment with high hydrostatic pressure and a pulsed electric field increased electrical conductivity the most, indicating the greatest leakage of intracellular non-protein components. Combinations of high hydrostatic pressure and ultrasound treatments demonstrated a synergistic effect (inactivation of ~3 log CFU/mL) when ultrasound treatment followed high hydrostatic pressure treatment, but an additive effect (inactivation of ~2 log CFU/mL) when ultrasonic treatment preceded high-pressure treatment.

9. It was confirmed that repeated treatment of the spore suspension with high hydrostatic pressure was more effective in inactivating *B. subtilis* spores than a single treatment of the same duration. The greatest inactivation, at 5.8 log CFU/mL (from an initial ~7 log CFU/mL), was achieved at 500 MPa and 60 °C over three cycles of 3 minutes each. A single treatment at 500 MPa and 60 °C for 10 minutes resulted in 1.2 log CFU/mL less inactivation. It has been demonstrated that the more intense inactivation of *B. subtilis* spores during repeated treatment with high hydrostatic pressure is not associated with the inactivation of lytic enzymes in the cortex or the degradation of small acid-soluble proteins, but is caused by 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.