



Ministero della Salute

**DIPARTIMENTO DELLA SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA DELLA SICUREZZA
ALIMENTARE E DELLA NUTRIZIONE
SEGRETARIATO NAZIONALE DELLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO
UFFICIO IV**

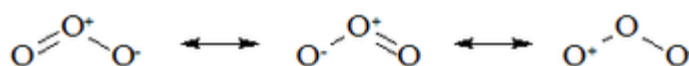
**PARERE DEL CNSA
SUL TRATTAMENTO CON
OZONO DELL'ARIA NEGLI
AMBIENTI DI STAGIONATURA
DEI FORMAGGI**

Trattamento con ozono dell'aria negli ambienti di stagionatura dei formaggi

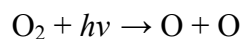
1. Generalità
 2. Proprietà chimico-fisiche
 3. Ozono come agente disinfettante e disinfestante
 4. Normativa
 5. Applicazioni
 6. Utilizzo dell'ozono nella stagionatura dei formaggi
 7. Parere espresso dalla Commissione
- Riferimenti bibliografici

1. GENERALITÀ

L'ozono (dal greco *ozein*, odore) è una molecola costituita da 3 atomi di ossigeno (O₃). La sua struttura chimica è un ibrido di risonanza tra tre formule limite possibili:

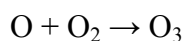


L'ozono è presente in natura come un gas blu dall'odore acre pungente e la sua concentrazione nell'atmosfera è di circa 0,04 ppm (1 ppm ~ 2 mg/m³). Tale gas si forma naturalmente nella stratosfera e in particolare nell'ozonosfera, concentrandosi a circa 25 km al di sopra del livello del mare. La quantità di ozono è mantenuta costante mediante un equilibrio dinamico fra la reazione di formazione e quella di fotolisi. Potenti scariche elettriche e radiazioni UV ($h\nu$) aventi lunghezza d'onda (λ) inferiore ai 242 nm dissociano l'ossigeno molecolare, in ossigeno atomico mediante *la reazione di Chapman*:

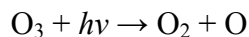


L'ossigeno atomico si combina rapidamente con un'altra molecola di ossigeno formando la molecola triatomica dell'ozono (O₃). L'effetto netto della reazione è la conversione di tre molecole di ossigeno in due molecole di O₃. Le molecole di O₃ assorbono a loro volta la radiazione solare di lunghezza d'onda compresa fra 240 e 320 nm, subendo fotolisi e rilasciando ossigeno molecolare O₂ ed ossigeno atomico.

La grande reattività dell'ossigeno atomico fa sì che esso reagisca con altre molecole di O₂ secondo la seguente reazione:

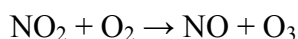


La reazione di dissociazione a sua volta è causata dalle medesime radiazioni elettromagnetiche secondo la seguente reazione:



Di conseguenza, le reazioni di formazione e fotolisi dell'O₃ hanno come effetto quello di schermare la terra da più del 90% delle radiazioni UV dannose per la vita sul nostro pianeta.

Tuttavia, in vicinanza della superficie terrestre, nella troposfera, i raggi UV con energia necessaria a formare l'O₃ sono totalmente schermati, pertanto la reazione di formazione di O₃ non avviene. I minimi livelli di O₃ rilevabili a livello troposferico derivano dallo scambio tra ozonosfera e troposfera e dalla minima quantità prodotta dalle reazioni fotochimiche che coinvolgono direttamente l'ossigeno atmosferico. In particolare, il processo di formazione e dissociazione dell'ozono troposferico avviene principalmente mediante il ciclo fotolitico dell'azoto, secondo cui



Tale reazione è amplificata dagli inquinanti immessi in atmosfera dall'uomo (veicoli a motore, centrali termoelettriche, solventi chimici,...).

I livelli basali di ozono corrispondono a circa 40-70 µg/m³ (0,02–0,035 ppm), ma nelle aree più inquinate possono raggiungere livelli più alti fino a 120–140 µg/m³ (0,06–0,07 ppm) [Fonti: ARPA (Agenzia Regionale Prevenzione ed Ambiente ed EEA (Agenzia Europea Ambientale)].

La formazione d'ozono può avvenire anche industrialmente attraverso gli **ozonizzatori**, particolari strumenti che lo generano da una corrente gassosa ricca di ossigeno, cui viene apportata energia in forma elettrica, elettrochimica o fotochimica.

2. PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE

L'ozono è un gas solubile in soluzione acquosa (~ 13 volte più dell'O₂ a 0-30°C) con una solubilità inversamente proporzionale alla temperatura ed al pH. Ad esempio, a pH 7,0, aumentando la temperatura da 15 °C a 30 °C, si osserva una riduzione dell'emivita dell'ozono da 30 a 12 minuti; a 21°C, a pH 6,0, l'emivita è di circa 20 minuti, riducendosi a 5 minuti a pH 8,0. Allo stato gassoso, la decomposizione è meno influenzata dalla temperatura; a 20°C, l'ozono possiede un'emivita di circa 20 minuti (Kim et al., 1999).

L'ozono è una molecola caratterizzata da un alto potenziale ossidativo (potenziale redox di +2.07 V) inferiore solo ad alcune sostanze, ma nettamente superiore a quello del cloro (tabella 1)

Il forte potere ossidante dell'ozono consente al gas di ossidare ed inattivare numerosi composti organici (fenoli, benzene, triometani, pesticidi) ed inorganici (cianuri, solfiti, nitriti). L'ozono, inoltre, è in grado di ossidare il ferro, il manganese ed altri minerali, che soprattutto se complessati, possono essere molto difficili da rimuovere. A livello cellulare, anche i principali effetti tossici dell'ozono sono riconducibili al suo potere ossidativo e quindi alla capacità di ossidare e perossidare le biomolecole, sia direttamente che indirettamente (*Khadre et al., 2001*).

Tabella 1. Potenziale di ossidazione degli agenti ossidanti

Sostanza	Potenziale redox (V)
Fluoro	2,87
Idrossiradicale (OH \cdot)	2,86
Ione persolfato (S ₂ O ₈ ²⁻)	2,60
Ossigeno atomico (O)	2,42
Ozono (O₃)	2,07
Perossido di idrogeno (H ₂ O ₂)	1,78
Cloro (Cl)	1,36
Diossido di cloro (ClO ₂)	1,27
Molecola di ossigeno (O ₂)	1,23

L'ozono, infatti, decomponendosi rapidamente in fase acquosa può dare origine ad una serie di specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali l'anione radicale superossido (O₂⁻), il radicale idrossilico (HO \cdot) ed il perossido di idrogeno (H₂O₂), che causano alterazioni della struttura e funzione delle macromolecole biologiche (*Laisk et al. 1989; Sarti et al., 2002*).

Il principale meccanismo di azione dell'ozono, e più in particolare dei ROS, è la perossidazione lipidica, che genera composti biologicamente attivi che a livello cellulare causano danni ai fosfolipidi di membrana.

La tossicità dell'ozono dipende, inoltre, dalla sua capacità di ossidare gli amminoacidi alterando irreversibilmente la struttura e la funzione delle proteine. Gli amminoacidi più sensibili all'azione dei radicali liberi sono prolina, istidina, quelli contenenti gruppi tiolici (cisteina e metionina) e gruppi aromatici (fenilalanina, tirosina, triptofano) (*Menzel et al., 1971*).

Infine, una delle conseguenze più gravi legate all'attività dei radicali liberi derivanti dall'ozono è quella che si esplica a livello del DNA. I radicali liberi producono una serie di lesioni al DNA, causando rotture, distorsioni della doppia elica e legami crociati fra le basi azotate (*Roy et al 1981*).

3. OZONO COME AGENTE DISINFETTANTE E DISINFESTANTE

L'azione ossidante esplicita dall'ozono ha fatto sì che sin dalla sua scoperta fosse utilizzato come agente battericida, fungicida e inattivante dei virus (Tabella 2). Esso è stato utilizzato inizialmente come agente disinfettante nella produzione di acqua potabile, in Francia dal 1906 ed in Germania dal 1972. La scelta dell'ozono fu basata sul fatto che esso è più efficace di altri disinfettanti verso un più ampio spettro di microorganismi.

I diversi batteri mostrano una sensibilità variabile all'ozono: i Gram-negativi sono meno sensibili dei Gram-positivi, i batteri sporigeni si dimostrano più resistenti dei non sporigeni (*Kim et al., 1999*). Poiché il meccanismo con cui agisce l'ozono è la perossidazione lipidica, la causa della differente sensibilità sarebbe imputabile alla differente composizione lipidica della parete batterica (*Khadre et al., 2001; Khadre and Yousef, 2001; Hoff, 1986*).

L'inattivazione dei virus è stata finora meno studiata di quella dei batteri; è comunque noto che anch'essa avviene rapidamente in seguito ad ozonizzazione, anche se richiede una somministrazione di gas a concentrazioni superiori rispetto a quella necessaria per i batteri (*Kim et al., 1999*). Si è osservato, infatti, che le curve di inattivazione mostrano un rapido abbattimento delle colture fino al 99%; il restante 1% richiede un tempo maggiore per la totale inattivazione. Vari studi effettuati sulla sensibilità dei virus all'ozono hanno dimostrato che i virus provvisti di membrana sono nettamente più sensibili di quelli che ne sono sprovvisti.

Il meccanismo di azione dell'ozono sui virus non è sicuramente quello di una distruzione, come nel caso dei batteri, ma di un'inattivazione; l'azione dell'ozono consisterebbe in un'ossidazione, e conseguente inattivazione, dei recettori virali specifici utilizzati per la creazione del legame con la parete della cellula da invadere. Verrebbe così bloccato il meccanismo di riproduzione virale a livello della sua prima fase: l'invasione cellulare.

Nella Tabella 2 sono riportati i tempi indicativi per l'eliminazione di alcuni agenti patogeni.

Tabella 2. Inattivazione di batteri, virus, funghi, muffe ed insetti in seguito ad ozonizzazione

(**Fonti:** Edelstein et al., 1982; Joret et al., 1982; Farooq and Akhlaque, 1983; Harakeh and Butle, 1985; Kawamuram et al. 1986)

TEST EFFETTUATI IN PROVETTA LA QUANTIFICAZIONE CORRETTA SI BASA CON CALCOLO COMPLESSO, M3 APPARECCHIATURA, FLUSSO ARIA, CON CUI VIENE TRATTATO IL TIPO DI BATTERE O VIRUS.

ORGANISMO	CONCENTRAZIONE	TEMPO DI ESPOSIZIONE
BATTERI (<i>E. Coli, Legionella, Mycobacterium, Fecal Streptococcus</i>)	0,23 ppm - 2,2 ppm	< 20 minuti
VIRUS (<i>Poliovirus type-1, Human Rotavirus, Enteric virus</i>)	0,2 ppm - 4,1 ppm	< 20 minuti
MUFFE (<i>Aspergillus Niger, vari ceppi di Penicillum, Cladosporium</i>)	2ppm	60 minuti
FUNGHI (<i>Candida Parapsilosis, Candida Tropicalis</i>)	0,02 ppm - 0,26 ppm	< 1,67 minuti
INSETTI (<i>Acarus Siro, Tyrophagus Casei, Tyrophagus Putrescentiae</i>)	1,5 - 2 ppm	30 minuti?

Numerosi studi condotti sin dall'inizio del XX secolo hanno riportato che l'azione antimicrobica dell'ozono, sia in fase acquosa che gassosa, poteva essere sfruttata nella lavorazione e nella conservazione degli alimenti (*Broadwater et al., 1973; Kuprianoff 1953*). Ad esempio nel 1929, il trattamento con acqua ozonizzata estendeva la durata dei prodotti ittici di ulteriori 5 giorni (*Violle, H., 1929*).

Successivi esperimenti dimostrarono che né l'aspetto, né il sapore degli alimenti veniva alterato dall'ozonizzazione (*Violle et al 1929; Kuorianoff 1953; Kim et al., 1999*). Si consideri che già nel 1910, le industrie alimentari tedesche utilizzavano l'ozono per la conservazione della carne e delle uova, dimostrando che l'uso di ozono in fase gassosa nella conservazione refrigerata preveniva la crescita dei funghi e delle muffe.

4. NORMATIVA

USA – In seguito alla documentazione fornita dall'**EPRI** (Electric Power Research Institute) e da un gruppo di esperti che hanno valutato l'efficacia e la sicurezza dell'ozono nella lavorazione e conservazione degli alimenti, il 26 Giugno 2001 la **FDA**, organismo della United States Department of Health and Human Services, ammette, a convalida della compatibilità dell'ozono con le attività umane, l'impiego di ozono come agente antimicrobico in fase gassosa o in soluzione acquosa nei processi produttivi (trattamento, lavorazione, conservazione) di alimenti come carne, uova, pesci, formaggi, frutta e verdura. In particolare il documento 21 CFR parte 173.368 (registro n°00F-1482) ha etichettato l'ozono come elemento GRAS (generally recognized as safe) ossia un additivo alimentare secondario sicuro per la salute umana.

Canada – Nell'acqua di lavaggio (e nel ghiaccio) la quantità di ozono non può superare i livelli minimi necessari per ridurre la carica batterica; se usato per acqua potabile deve essere indicato sull'etichetta. L'ozono non può essere usato per aumentare i tempi di conservazione dei prodotti.

Comunità Europea - In Europa l'utilizzo di ozono ai fini alimentari è stato introdotto nel 2003, per la disinfezione e sterilizzazione durante i processi d'imbottigliamento dell'acqua. Infatti, la Direttiva 2003/40/CE della commissione **EFSA** del 16 maggio 2003 ha determinato l'elenco, i limiti di concentrazione e le indicazioni di etichettatura per i componenti delle acque minerali naturali, nonché le condizioni d'utilizzazione dell'aria arricchita di ozono per il trattamento delle acque minerali naturali e delle acque sorgive. In particolare, come si evince dalla direttiva 80/777/CEE modificata, secondo l'articolo 4, paragrafo 1, lettera b), è prevista *“la possibilità di separare il ferro, il manganese, lo zolfo e l'arsenico di alcune acque minerali naturali mediante un trattamento all'aria arricchita di ozono, con riserva di valutazione di questo trattamento da parte del comitato scientifico per l'alimentazione umana e dell'adozione delle condizioni di utilizzazione da parte del comitato permanente della catena alimentare e della salute animale”*.

Italia - Il Ministero della Sanità con protocollo del 31 Luglio 1996 n°24482, ha riconosciuto l'utilizzo dell'ozono nel trattamento dell'aria e dell'acqua, come presidio naturale per la sterilizzazione di ambienti contaminati da batteri, virus, spore, muffe ed acari.

5. APPLICAZIONI

La caratteristica predominante dell'ozono è che in condizioni atmosferiche standard è in fase gassosa, favorendo numerose applicazioni in campo igienico-alimentare. A differenza dei disinfettanti

classici, (es. il cloro) che rilasciano residui inquinanti, l'ozono si decompone ad ossigeno; ciò potrebbe rappresentare un vantaggio per l'ambiente e per la salute evitando gli effetti collaterali.

Ulteriori informazioni sono disponibili nel seguente sito web:

<http://www.mpcleaning.net/Immagini%20mpc/ozono/OZONO%20DOCUMENTAZIONE.pdf>

Grandi città (tra cui Mosca, Parigi, Bologna, Firenze) possiedono impianti che forniscono acqua potabile prelevata da fiumi e trattata con ozono.

Vista la sua breve emivita, l'ozono non può essere prodotto e conservato, ma è necessario che venga generato *in situ* al momento dell'utilizzo attraverso gli ozonizzatori. Tuttavia, sebbene a basse concentrazioni non sia particolarmente tossico, ad alte concentrazioni può avere effetti gravi. I principali danni sono a carico delle vie respiratorie per alterazione della permeabilità degli epiteli, con conseguente riduzione della funzionalità polmonare (fino ad edema); può inoltre determinare un peggioramento in soggetti con bronchite od asma.

L'ozono è anche causa di altri disturbi quali bruciore agli occhi, mal di testa, debolezza. Pertanto, la tossicità dell'ozono richiede che gli addetti al suo utilizzo siano continuamente monitorati e protetti. In conformità alle norme H.A.C.C.P e D.Lgs. 626/94, chi ne fa utilizzo non deve essere esposto a più di 0,1 ppm di ozono in 8 ore o più di 0,3 ppm due volte/die per 15 minuti (si noti che la soglia di percettibilità olfattiva per l'uomo è a concentrazioni tra 0,02 e 0,05 ppm, pari a circa 1/20 della soglia di concentrazione definita sicura per un tempo di esposizione di 15 minuti ed a circa ¼ della soglia di esposizione definita sicura negli ambienti di lavoro).

Disinfestazione ambientale

In soluzione acquosa è usato per la sanificazione dell'acqua per uso alimentare, per piscine, docce, sistemi d'irrigazione ed impianti di depurazione idrica. In fase gassosa è utilizzato per la distruzione di tossine disperse nell'aria e la deodorizzazione delle fogne.

Settore alimentare

Attualmente, le applicazioni dell'ozono sono numerose.

Avicoltura - In linea generale, i benefici che l'ozono gassoso apporta in avicoltura, nella fase di accrescimento degli animali sono:

- sanificazione dell'ambiente mantenuto esente da microrganismi patogeni
- distruzione delle emanazioni ammoniacali
- deodorazione dell'ambiente

- maggiore ossigenazione del microclima ambientale
- miglioramento del mangime con conseguente miglioramento della digestione ed incremento del peso dell'animale
- minori rischi di contagio incrociato.

Prodotti ittici - Ghiaccio ozonizzato o combinazione di refrigerazione e ozono vengono utilizzati per la conservazione di prodotti ittici con i seguenti vantaggi:

- diminuzione della carica batterica sul prodotto, nel microclima e sulle pareti della cella
- prolungamento dei tempi di conservazione del prodotto
- riduzione dei costi per l'eliminazione di prodotti non più conformi alle norme igieniche.

Carne - L'ozono controlla efficacemente la formazione di muffe e batteri nelle celle frigorifere destinate alla conservazione delle carni; in particolare, il tasso di umidità può essere mantenuto ad una gradazione più elevata, attenuando il calo di peso e la perdita di aroma; inoltre, distruggendo gli odori, evita il passaggio di aromi non graditi da un prodotto all'altro. Tuttavia si è visto che il trattamento con ozono può aumentare significativamente la perossidazione lipidica, come quantificato dal TBA (thiobarbituric acid) test che misura i livelli di malondialdeide; tale perossidazione è una delle cause principali del deterioramento della carne. Non è ancora chiaro se concentrazioni di ozono sufficienti per l'effetto battericida, portino anche ad aumento significativo dell'ossidazione dei grassi (Smith et al, 2001). E' pertanto importante evitare un sovra-uso d'ozono che può portare danno al prodotto alimentare.

Cereali – L'ozono in fase gassosa viene utilizzato per la conservazione nei silos di riso, mais, soia e grano. In particolare, riduce la crescita di *Tribolium confusum* e *Sitophilus granarius*, insetti che infestano i cereali immagazzinati. Inoltre, permette l'abbattimento delle muffe appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, che generano l'aflatossina B1, una micotossina cancerogena a livello epatico.

6. UTILIZZO DELL'OZONO NELLA STAGIONATURA DEI FORMAGGI

Numerosi funghi e batteri trovano nel formaggio un eccellente mezzo di crescita. Soprattutto nei casi dei formaggi stagionati l'ambiente areato determina un incremento della proliferazione dei microorganismi, causando danni al prodotto. Durante la conservazione refrigerata, sui formaggi si sviluppano principalmente batteri appartenenti alla specie *Penicillium* che rilasciano nei formaggi micotossine, quali patulina, acido micofenolico, ocratossina A e citrinina (Scott, 1989; Taniwaki et al., 2001).

I metodi tradizionali atti a controllare la crescita di lieviti, muffe e batteri tuttavia risultano costosi e poco efficaci, pertanto è sorta la necessità di trovare metodiche alternative. Già nel 1951, si dimostrò che la crescita di muffe sui formaggi durante la stagionatura poteva essere prevenuta utilizzando 1 ppm di ozono. Nel 1960, in Canada, venne condotto uno studio sul “*Cheddar cheese*” dimostrando che a concentrazioni di ozono tra 3-10 ppm la crescita delle muffe sulla superficie orizzontale del formaggio assumevano una colorazione scura; il numero delle spore rilevate nell’ambiente era ridotto del 96% rispetto alle camere non trattate. E’ importante notare che anche a concentrazioni più basse (0,2-0,3 ppm) si osservava una significativa riduzione delle muffe senza alcuna alterazione delle proprietà organolettiche del prodotto (*Gibson et al., 1960*). Negli anni 70, si confermarono tali scoperte dichiarando che l’ozono a 10 ppm inattivava totalmente le spore http://www.ozoneindustries.co.uk/Technical_Bulletin_21_The_Use_of_Ozone_to_control_yeast.pdf.

Più recentemente, un lavoro condotto su *Saccharomyces cerevisiae*, *E.Coli* e *Candida albicans* ha dimostrato che, dopo un’esposizione di 4 ore a 5 ppm di ozono, si otteneva una netta riduzione della crescita dei microorganismi

http://www.ozoneindustries.co.uk/Technical_Bulletin_21_The_Use_of_Ozone_to_control_yeast.pdf

E’ stato anche valutato l’effetto dell’ozono su insetti. I prodotti immagazzinati possono essere principalmente attaccati da *Acarus siro*, *Tyrophagus casei* (cosiddetto “*acaro del formaggio*”), *Tyrophagus putrescentiae*. E’ stato osservato che il trattamento regolare con ozono porta alla loro eliminazione, anche se il meccanismo non è ancora noto. Tuttavia, è stato anche riportato che gli insetti cercano rifugio dove l’ozono non penetra, occupando gli interstizi e scavando buche nel formaggio.

Nel 2003, Serra et al. hanno dimostrato che l’impiego di ozono gassoso nelle camere di stagionatura dei formaggi favorisce l’eliminazione delle muffe presenti nell’ambiente di stagionatura e non quelli già presenti nel formaggio, non alterando così i normali processi di fermentazione e stagionatura.

Nel 1990, l’*Ozone* (U.K.), industria leader nel settore, ha introdotto un tipo di ozonizzatore in grado di fornire un metodo sicuro e rapido per la lavorazione dei formaggi e per la disinfestazione delle aree di conservazione. Inizialmente, l’ozono veniva somministrato durante la notte e nei fine settimana, evitando che gli addetti fossero sottoposti a quantità elevate di ozono. Attualmente, la stessa ditta ha sviluppato un metodo più accurato e sicuro che si basa sulla continua areazione degli ambienti di stagionatura con un livello di ozono compatibile con la soglia massima consentita, ma sufficiente a ridurre la crescita dei microorganismi presenti.

Quando l'ozono è disciolto nella salamoia, cioè nell'acqua salata usata nella lavorazione del formaggio, esso è in grado di risanarla completamente, anche in presenza di alta carica batterica.

Gli Usa stanno valutando tale procedura e si stanno orientando verso un suo uso industriale.

7. PARERE ESPRESSO DALLA COMMISSIONE

Per quanto sopra espresso in riferimento alle richieste di parere pervenute dalla Direzione Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione, si esprime parere favorevole alla ozonizzazione delle camere di stagionatura e/o degli ambienti di stoccaggio, purché in assenza di alimenti.

Tale trattamento, comunque, non dovrà essere in contrasto con specifici disciplinari di produzione.

Riferimenti bibliografici

- Broadwater WT, Hoehn RC, King PH. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. *Appl Microbiol.* 1973 Sep;26(3):391-3.
- Edelstein, P.H., Whittacker, R.E., Kreiling, R.I., and Howell, C.I. 1982. Efficacy of Ozone in eradication of *Legionella Pneumophila* from hospital plumbing fixtures. *App. Environ Microbiol.* , 44, 1330-1331.
- Farooq, S., Akhlaque, S., 1983. Comparative response of mixed cultures of bacteria and virus to ozonation. *Water Res.* 17,309.
- Gane R. 1936 The respiration of Bananas in the presence of ethylene. *New Phytol.* 36:170-178.
- Gibson, C.A., Elliot, J.A. and Beckett, D.C., 1960. Ozone for controlling mold on Cheddar cheese. *Canadian Dairy and Ice Cream Journal* 14, pp. 24–28.
- Harakeh, M.S., and Butler, M. 1983. Factors influencing the ozone inactivation.
- Hoff, J.C., 1986. Inactivation of microbial agents by chemical disinfectants. EPA 600 S2-86 067. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC;
- Joret, J.C., Block, J.C., Hartemann and Richards, Y. 1982. Wastewater disinfection; Elimination of fecal bacteria and enteric viruses by Ozone. *Ozone: Sci. Eng.* 4, 91-99.
- Kawamuram K. , Kanckom M., Hiratam T. and Taguchim K. 1986. Microbial indicators for the efficiency of disinfection processes. *Water Sci. Technol.* 18, 175-184.
- Khadre, M.A., Yousef, A.E Kim, J.-G.,2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *J. Food Sci.* 66, 1242-1252
- Khadre, Yousef AE. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *Int J Food Microbiol.* 2001
- Kim JG, Yousef AE, Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J Food Prot.* 1999 Sep;62(9):1071-87.
- Kovacic P, Somanathan R. Pulmonary toxicity and environmental contamination: radicals, electron transfer, and protection by antioxidants. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2009;201:41-69
- Kuprianoff F. 1953. The use of ozone for the cold storage of fruit. *Z. Kaltentech.* 10:1-4
- Laisk A, Kull O, Moldau H. Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiology* 90: 1163-1167
- Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2009 Sep 12. [Epub ahead of print];

- Menzel DB. Oxidation of biologically active reducing substances by ozone. *Arch Environ Health*. 1971 Aug;23(2):149-53.
- Mirzoev EB, Kobialko VO. [Rate of free radical peroxidation of lipids, activity of adenylate cyclase and permeability of plasma membrane for Ca²⁺ ions in cells of peripheral blood of sheep exposed to low-level radiation] *Radiats Biol Radioecol*. 2009 May-Jun;49(3):261-7.
- Roy D, Wong PK, Engelbrecht RS, Chian ES. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl Environ Microbiol*. 1981 Mar;41(3):718-23.
- Sarti P, Avigliano L, Görlach A, Brüne B. Superoxide and nitric oxide--participation in cell communication. *Cell Death Differ*. 2002 Oct;9(10):1160-2;
- Scott PM. 1989. Mycotoxigenic fungal contamination of cheese and other dairy products, p 193-259. In H. P. van Egmond (ed.). *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science, London.
- Serra R, Abrunhosa L, Kozakiewicz Z, Venâncio A, Lima N. Use of ozone to reduce molds in a cheese ripening room. *J Food Prot*. 2003 Dec;66(12):2355-8.
- Taniwaki MH, Hocking AD, Pitt JI, Fleet GH. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *Int J Food Microbiol*. 2001 Aug 15;68(1-2):125-33.
- Violle, H., 1929. De la sterilization de l'eau de mer par ozone: applications de cette methode pour le perufucation des coquillages contamines. *Rev. Hyg. Med. Prev.* 51, pp. 42-46