

Linee guida per l'utilizzo dell'ozono gassoso nella sanificazione degli ambienti di lavorazione di prodotti a base di carne

Fortini, G.; Cardoso, C.C.

SSICA - Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari, V.le Tanara, 31/A - 43100 Parma (Italia)

Introduzione

L'utilizzo dell'ozono a livello mondiale come sanificante "green" nell'agroalimentare è in crescita. Alla luce di questo, e supportato dal parere del CSNA del 27 ottobre del 2010, con queste linee guida si intende aggiornare – sia dal punto di vista scientifico che tecnico – le conoscenze sulle sue applicazioni nel campo della sanificazione degli ambienti di lavorazione.

Negli stabilimenti di produzione alimentare, la sanificazione delle superfici e la purificazione batterica dell'aria sono molto importanti, in particolar modo nella lavorazioni di prodotti stagionati nelle fasi di disosso e affettamento.

Il processo di sanificazione deve essere in grado di raggiungere tutte le superfici e i punti critici, distribuendo il sanificante in forma omogenea, costante e sicura per esplicare la sua attività. La forma gassosa è anche quella che si propaga meglio negli ambienti raggiungendo zone a volte inaccessibili agli operatori. Queste linee guida cercano di fornire informazioni fondamentali per l'implementazione di un sistema di sanificazione ambientale nell'industria alimentare.

Proprietà chimico fisiche dell'Ozono, principali utilizzi, tossicità

L'ozono (dal greco, *ozein*, odore), è una molecola naturale e instabile. L'ozono è presente in natura come un gas che ha un pallido colore azzurro cielo e un odore pungente. La molecola è composta da tre atomi di ossigeno (O₃) e il suo peso molecolare, confrontato con la molecola diossigeno (32,00) è 48,00. La struttura dell'ozono è ciclica, con una distanza di 1.26 Å tra gli atomi, posti in diversi stati mesomerici in equilibrio dinamico.

Tra gli agenti ossidanti, l'ozono è il terzo più potente dopo fluorina e persolfato, fatto che spiega la sua alta reattività.

L'ozono è prodotto artificialmente con ossigeno tramite appositi generatori a scarica a corona con un processo endotermico (3O₂ ↔ 2O₃ – 68,400 cal) che richiede alti gradienti di voltaggio tra gli elettrodi, oppure mediante radiazioni UV.

La reazione è reversibile e, pertanto, l'ozono si scompone spontaneamente, motivo per il quale non può essere immagazzinato ma prodotto in loco. Inoltre, l'emivita della molecola di ozono dipende dalla temperatura, infatti a 20° C la concentrazione di ozono si dimezza in 40 minuti, a 30° C in 25 minuti, a -50° C dopo 3 mesi.

Le concentrazioni di ozono possono essere indicate come segue:

467 ppmv = 1.0 µg/ml or 1.0 mg/l or 1.0 g/m³

1000 ppmv = 2.1 µg/ml or 2.1 mg/l or 2.1 g/m³

1 ppmv = 0.0021 µg/ml or 0.0021 mg/l or 0.0021 g/m³

L'ozono possiede proprietà altamente biocida e mondialmente utilizzato nella potabilizzazione dell'acqua e nel trattamento degli effluenti (CHO et al, 2003). Confrontato ad altri disinfettanti è 1,5 volte più ossidante del cloro e 3000 volte l'acido ipocloroso (Suslow, 1998). Risulta essere molto efficace anche a basse concentrazioni nei confronti di un'ampia gamma di microrganismi (Khadre and Yousef, 2001) compreso i virus (Kekez and Sattar, 1997) e non lascia residui o sottoprodotti tossici come altri disinfettanti (Fan et al, 2007).

Diversi studi hanno evidenziato l'efficacia antibatterica ed antimicotica dell'ozono gassoso come agente di disinfezione negli ambienti di lavorazione degli alimenti (Moore, Griffith and Peters 2000; Robbins, Fisher, Moltz and Martin 2004, Tapp and Sopher, 2002; Campos et al, 2005).

L'utilizzo dell'ozono può essere economicamente vantaggioso, i costi per l'acquisto e la manutenzione delle unità di erogazione di ozono risultano più bassi se confrontati al costo di approvvigionamento dei prodotti disinfettanti (Greene, Few and Serafini 1993).

Nel 2001 la FDA (Food and Drug Administration) modificando le norme riguardanti gli additivi ha reso possibile l'uso dell'ozono, quale agente antimicrobico sia in fase acquosa che gassosa, nel trattamento, conservazione e trasformazione degli alimenti, comprese carni bovine e avicole (Muthukumar and Muthuchamy, 2013).

In Italia il parere del CSNA del 27 ottobre del 2010 è favorevole al trattamento con ozono dell'aria negli ambienti di stagionatura dei formaggi e/o negli ambienti di stoccaggio, purché in assenza di alimenti.

L'ozono in fase gassosa non è selettivo. Attacca e ossida sia i componenti del biofilm che le strutture dei microrganismi.

Gli impieghi per i quali è suggerito nell'industria alimentare sono molteplici: dalla disinfezione delle attrezzature e dell'imballaggio al recupero dell'acqua di processo (Majchrowicz 1998). Come fumigante, evita il deterioramento degli alimenti freschi, elimina insetti e altre parassiti nei cereali immagazzinati e sanifica gli alveari (James, 2011).

Va sottolineato che l'impiego di prodotti chimici per la disinfezione nell'industria alimentare pone un problema di inquinamento dovuto al crescente accumulo ambientale.

L'ozono è instabile e si decompone spontaneamente a O₂ minimizzando i rischi per la salute umana, legati al residuo chimico negli "alimenti e negli effluenti" in quanto, dopo aver reagito, si decompone, non producendo composti indesiderabili e non lasciando odori spiacevoli.

Il contatto con l'ozono nell'uomo avviene per via inalatoria, quindi per rispettare i parametri di sicurezza, l'utilizzo di questo gas deve essere gestito in modo da evitare irritazioni all'apparato respiratorio.

Pertanto, l'ozono residuo ambientale deve essere eliminato posizionando appositi aspiratori nei locali di utilizzo muniti di strumenti "distruttori o catalizzatori" (Rice, Farquhar and Bollyky 1982). La disinfezione con l'ozono deve avvenire in ambienti non occupati e debitamente confinati. Per ridurre il rischio devono essere predisposti dispositivi sonori e/o acustici in ogni punto di accesso degli ambienti in fase di trattamento, allo stesso modo devono essere predisposti segnalatori di libero accesso.

I valori limiti di esposizione inalatoria ad agenti chimici sono regolati in Italia dal D.Lgs. 81/2008 che è la normativa sulla sicurezza sul lavoro. L'individuazione dei valori riferiti alla esposizione inalatoria per quanto riguarda l'ozono devono essere ricercate in prima istanza nelle disposizioni normative del D.Lgs. 81/2008, negli allegati XXXVIII e XLII, qualora non presenti in questi Allegati si fa riferimento ai valori indicati dall'ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists.

Per la valutazione delle condizioni medico-ambientali è pratica comune, infatti, riferirsi ai valori limiti di soglia (TRESHOLD LIMIT VALUES-TLV) della ACGIH.

Il limite di sicurezza per i lavoratori esposti all'ozono, come TLV-TWA, è relazionata all'attività fisica svolta (in quanto cambiano i volumi di aria aspirata).

I valori indicati dall'ACGIH, sono:

- **Per il lavoro pesante, moderato o leggero, ma svolto in un arco temporale minore di 2 ore**
 - il TLV-TWA è posto a 0,2 ppm, pari a 0,39 mg/m³.
- **Per il lavoro svolto oltre le due ore:**
 - lavoro leggero il TLV-TWA è posto a 0,1 ppm, pari a 0,2 mg/m³
 - lavoro moderato il TLV-TWA è posto a 0,08 ppm, pari a 0,16 mg/m³
 - lavoro pesante il TLV-TWA è posto a 0,05 ppm, pari a 0,1 mg/m³.

Ciclo del trattamento di sanificazione

E' doveroso sottolineare che per la sanificazione con l'ozono gassoso, tutti i parametri di trattamento devono essere, necessariamente, adattati alle diverse condizioni ambientali delle realtà produttive considerate. Perciò devono essere eseguite prove tecniche di distribuzione, di concentrazione, di omogeneità e di sicurezza per poter trasferire l'impiego nella realtà operativa

Per poter sviluppare il ciclo di trattamento è determinante conoscere:

- Caratteristiche dell'ambiente da trattare (aperto, chiuso, con o senza personale, cubatura, temperatura)
- Sistema di distribuzione/ventilazione o condizionamento della aria del locale (se esistente);
- Sistema di aspirazione per un eventuale espulsione/distruzione di ozono residuo

Le fasi tipiche di un ciclo di trattamento sono:

- **Fase di condizionamento:**

Coincide esattamente con la fase in cui si inizia ad iniettare ozono nel locale da sanificare. Tale iniezione è effettuata in modo da consentire in breve tempo il raggiungimento della concentrazione di ozono programmata.

- **Fase di trattamento:**

Questa fase ha lo scopo di garantire l'efficacia del ciclo protraendosi per il tempo necessario per la sanificazione

- **Fase di aerazione:**

Fase che garantisce l'eliminazione dell'ozono dall'aria nel locale trattato e si protrae sino al raggiungimento delle concentrazioni di ozono richieste per la sicurezza del lavoratore.

Prove tecniche effettuate in un locale adibito a disosso

Le prove tecniche del funzionamento dell'ozonizzatore e della distribuzione dell'ozono nell'ambiente sono state condotte nel reparto di disossatura dei prosciutti.

Le caratteristiche del locale erano (Fig.1):

Dimensioni del locale: m 16,68 x 16,94 x 3,8 h

Volume del locale: m³ 1.073

Temperatura nel locale: °C +12/+14 con controllo UR%

Il sistema proposto prevedeva l'immissione di ozono nell'ambiente di lavorazione attraverso il sistema UTA (Unità di Trattamento di Aria).

Le caratteristiche del sistema di diffusione aria erano:

- Due canali di distribuzione dell'aria in tessuto di fibra poliammide a sezione circolare, smontabili, lavabili, di colore bianco, completi di accessori di montaggio.

- Presa aria (FASE LAVAGGIO / rinnovo per personale): con ventilatore a "parete" e serranda motorizzata

- Espulsione aria (FASE LAVAGGIO/ rinnovo per personale): con ventilatore a "parete" e serranda motorizzata

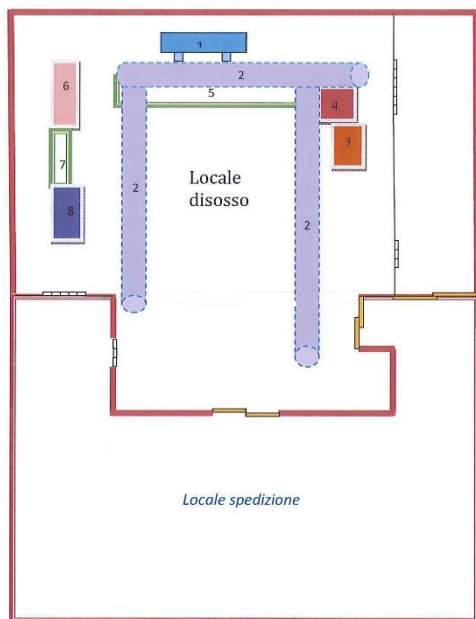
Durante il normale funzionamento un ventilatore con una portata di circa 450 mc/h provvedeva all'immissione di aria esterna per il personale.

Durante la fase di lavaggio, due ventilatori con una portata di circa 3.000 mc/h cad., provvedevano al rinnovo dell'aria per evacuare il vapore acqueo che si formava all'interno del locale.

In entrambe le situazioni l'aria che veniva immessa nel locale passa da un filtro Classe EN779 G4, EUROVENT EU4.

La stessa serie di filtri era montata sulla bocca di aspirazione dell'aero scambiatore in modo da avere un filtraggio dell'aria durante tutte le fasi di funzionamento.

Figura 1



1. Unità trattamento aria UTA
2. Canali di distribuzione aria
3. Disossatrice
4. Sgorbiatrice
5. Nastro
6. Stampo
7. Nastro
8. Macchina sottovuoto

Validazione del ciclo di produzione

Generatore di ozono e impianto diffusore

È stato utilizzato un generatore di ozono (Fig.2) modello WATER PROOF da 16g/h della ditta MET. Per produrre l'ozono si serviva di aria ambientale che veniva purificata e concentrata tramite un concentratore di ossigeno. L'ozono prodotto veniva erogato con un flusso di 7 litri/min. Il funzionamento della macchina WATER PROOF veniva gestito da un PLC industriale al fine di controllare la produzione di ozono, la concentrazione e le tempistiche del trattamento. Il PLC in uso interagiva con le informazioni inviate dal sensore che rilevava il livello di ozono presente e in base al programma impostato accendeva o spegneva il generatore di ozono.

Figura 2



Figura 3

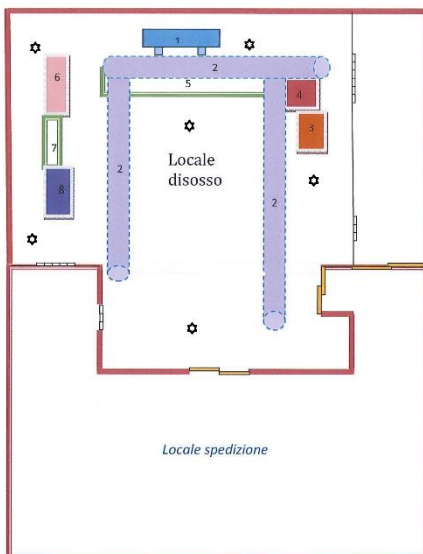


La potenzialità di produzione del generatore di ozono è stata misurata con lo strumento: Ozomat GM della ditta Anseros con lettura UV a 253,7 nm (fig.3).

Prove di mantenimento delle concentrazione e diffusione dell'ozono

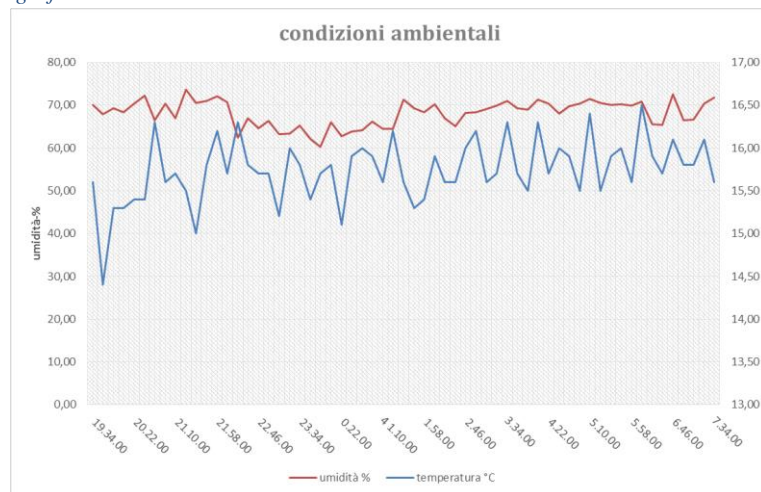
In figura 4 si possono individuare i punti di campionamento all'interno della cella, questi sono serviti a monitorare la concentrazione e la diffusione dell'ozono e nel Grafico 1 si possono vedere le condizioni ambientali del locale trattato.

Figura 4



Punto di campionamento/monitoraggio dell'ozono

grafico 1

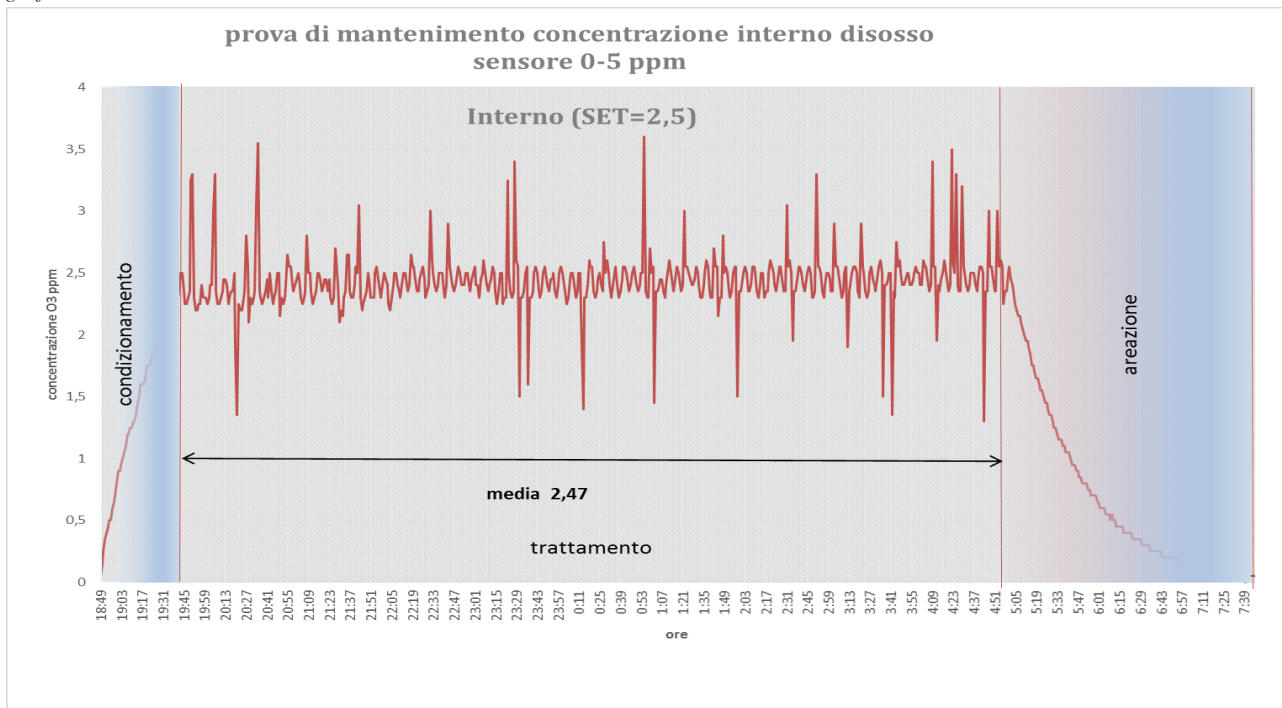


L'impianto è stato impostato al fine di ottenere all'interno della camera il flusso e la concentrazione di 2,5 ppm di O₃ per un periodo di 5 ore.

Per avere una maggior certezza delle concentrazioni misurate è stato monitorato all'interno del locale trattato con una sonda collegata ad un data logger per poter scaricare i dati durante le ore di funzionamento.

Nel Grafico 2 si possono vedere i valori riscontrati nelle tre fasi di trattamento: fase di condizionamento, di trattamento e di aerazione.

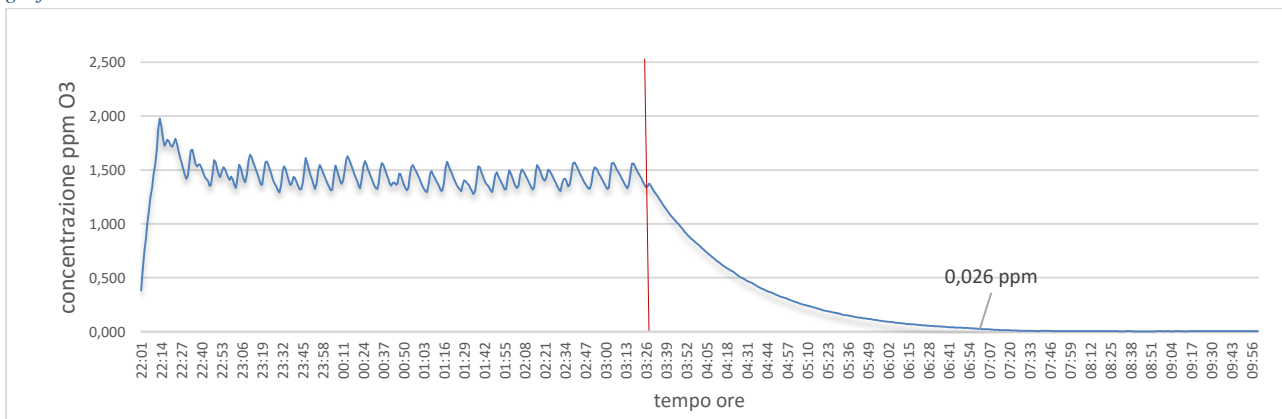
grafico 2



Prova di misura del tempo di decadimento/eliminazione dell'ozono

Nel Grafico 3 si può osservare il tempo necessario per il decadimento dell'ozono per riportarlo alla concentrazione ideale per la sicurezza dell'operatore, questo tempo sarà sempre condizionato in funzione delle concentrazioni di ozono utilizzate nel trattamento.

grafico 3



Prove di misura delle concentrazioni di Ozono all'esterno del locale trattato

Figura 5

Durante le prove all'interno del disosso sono stati monitorati i locali adiacenti, in quanto i due locali presentavano collegamenti non completamente chiusi. Le misure sono state realizzate tramite l'apparecchio fotometrico a UV, Modello 49i della Thermo Scientific (Fig.5) il limite di rilevabilità dello strumento è 1 ppb di O₃.



Nel grafico Grafico 4 si possono vedere le concentrazioni utilizzate all'interno del disosso, mentre nel Grafico 5 si possono vedere le concentrazioni di ozono raggiunte nel reparto adibito a spedizione attiguo al locale trattato.

grafico 4

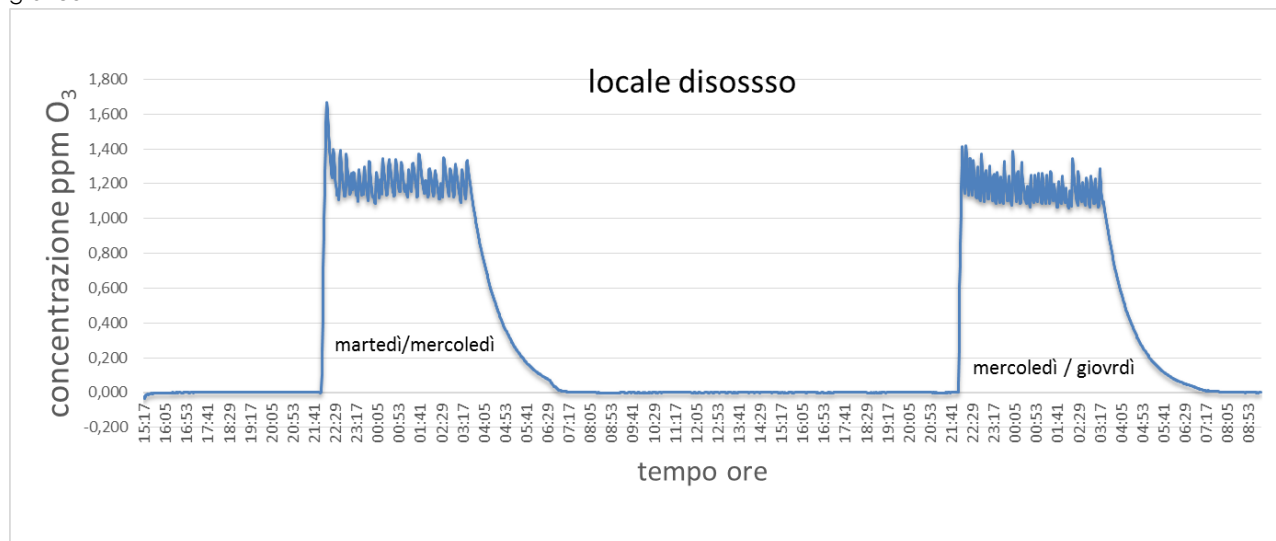
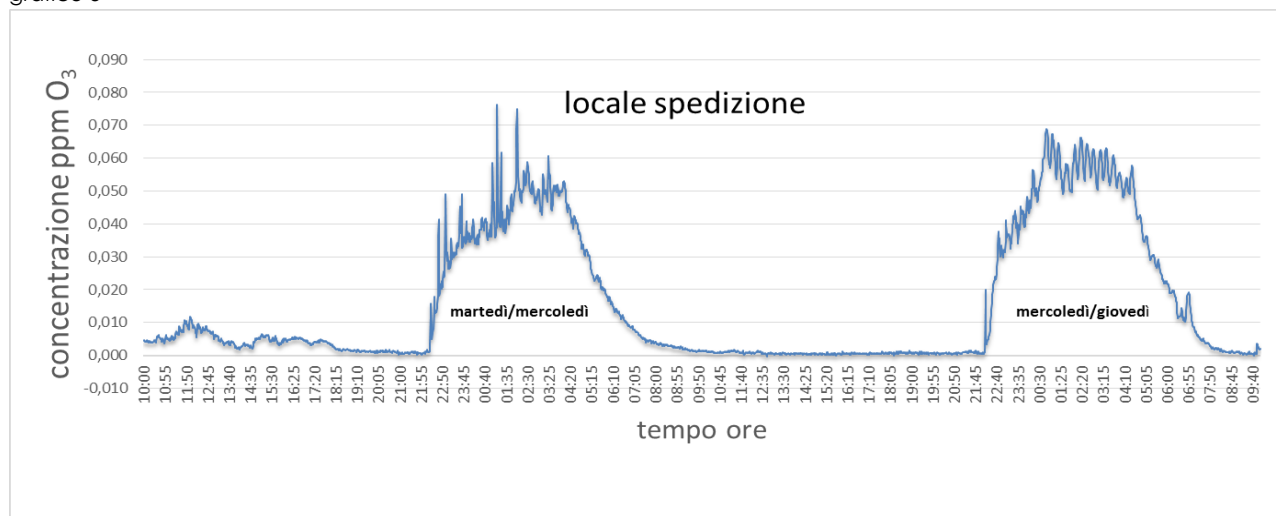


grafico 5



Campionamenti e analisi ambientali

Si è voluto procedere, dopo avere individuato la metodica migliore per il trattamento di sanificazione con ozono, ad esperienze dirette in alcune aziende per valutare l'efficacia dell'ozono in sostituzione dei sanificanti chimici normalmente utilizzati.

Queste esperienze hanno permesso di testare in modo reale le vere condizioni ambientali che possono verificarsi nelle diverse aziende, individuando le varie problematiche.

Utilizzando sempre un trattamento notturno si è voluto seguire il processo di sanificazione attraverso analisi specifiche della **Carica Microbica Aerobia a 30°C** e la presenza/assenza della **Listeria**.

Lo scopo è stato quello di valutare le performance del trattamento di sanificazione.

Metodo:

-A fine lavorazione si sono seguite le normali procedure di detersione/risciacquo e di sanifica con ozono, eseguendo ad ogni fase, campionamenti per le analisi microbiologiche.

Sono stati effettuati tamponi ambientali sulle superfici delle normali attrezzature utilizzate e sui diversi substrati tipici (acciaio inox, teflon, superfici vetrate, pavimenti).

-Sono state effettuate prove a diverse concentrazioni di ozono, mantenendo invariato il tempo di trattamento.

Le prove sono state condotte con concentrazioni di 2,0- 1,3-1,2 ppm per tre giornate lavorative non continue.

Sono state effettuate appositamente delle prove ad una concentrazione di 4.5 ppm di ozono senza effettuare la fase di detersione, questo per verificare il comportamento dell'ozono in presenza di residui di sostanza organica derivante dalla normale lavorazione.

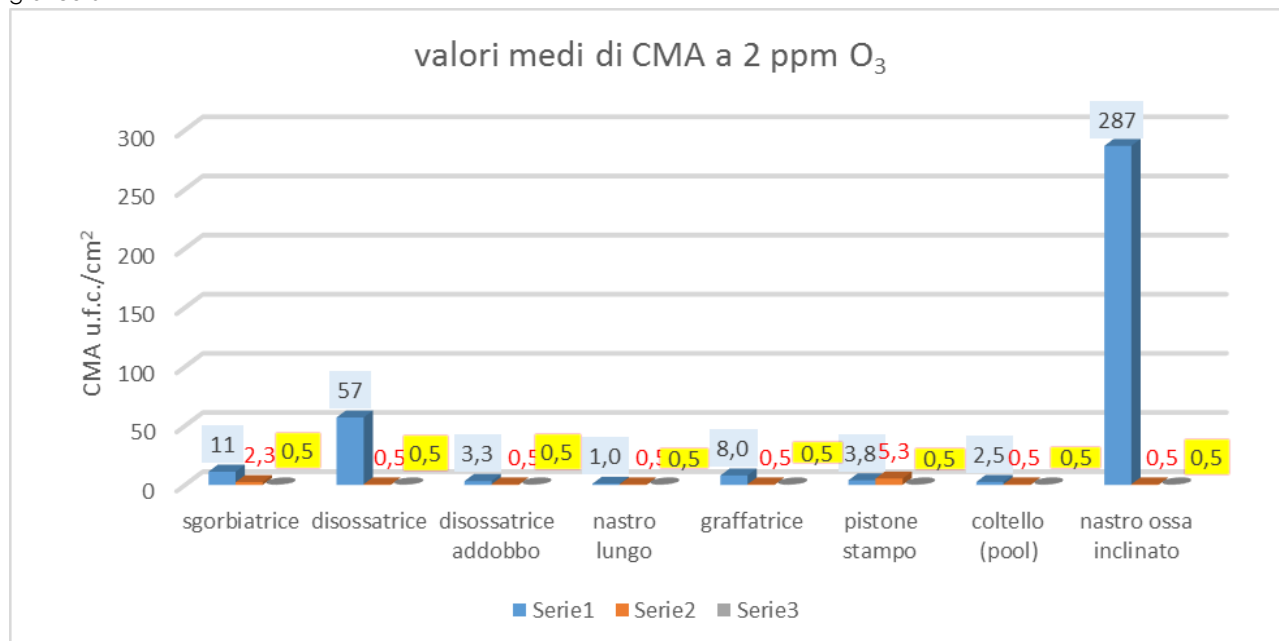
Nelle rappresentazioni delle analisi effettuate (Carica Microbica Aerobia a 30°C), secondo la ISO 18593:2004+ISO 4833:2003, nei casi in cui i risultati sono stati inferiori al limite di rilevabilità (< 1 u.f.c./cm²) è stato considerato nei grafici il valore di (0,5 u.f.c./cm²).

Tutte le determinazioni analitiche sono state commissionate dalla ditta ad un laboratorio certificato Accredia.

1° prova

La concentrazione di ozono utilizzata è stata di 2,0 ppm per un tempo di trattamento di 5 ore. Nel Grafico 6 si possono vedere i risultati dei valori medi della Carica Microbica Aerobia a 30° C (CMA) rilevata a fine lavorazione, dopo detersione e post trattamento con ozono (fase pre-operativa).

grafico 6



II° prova

La concentrazione di ozono utilizzata è stata di 1,3 ppm per un tempo di trattamento di 5 ore. Nel Grafico 7e 8 si possono vedere i risultati medi dei valori della Carica Microbica Aerobia a 30° C effettuati a fine lavorazione dopo avere effettuato la detergenza e dopo trattamento con ozono (fase pre-operativa).

grafico 7

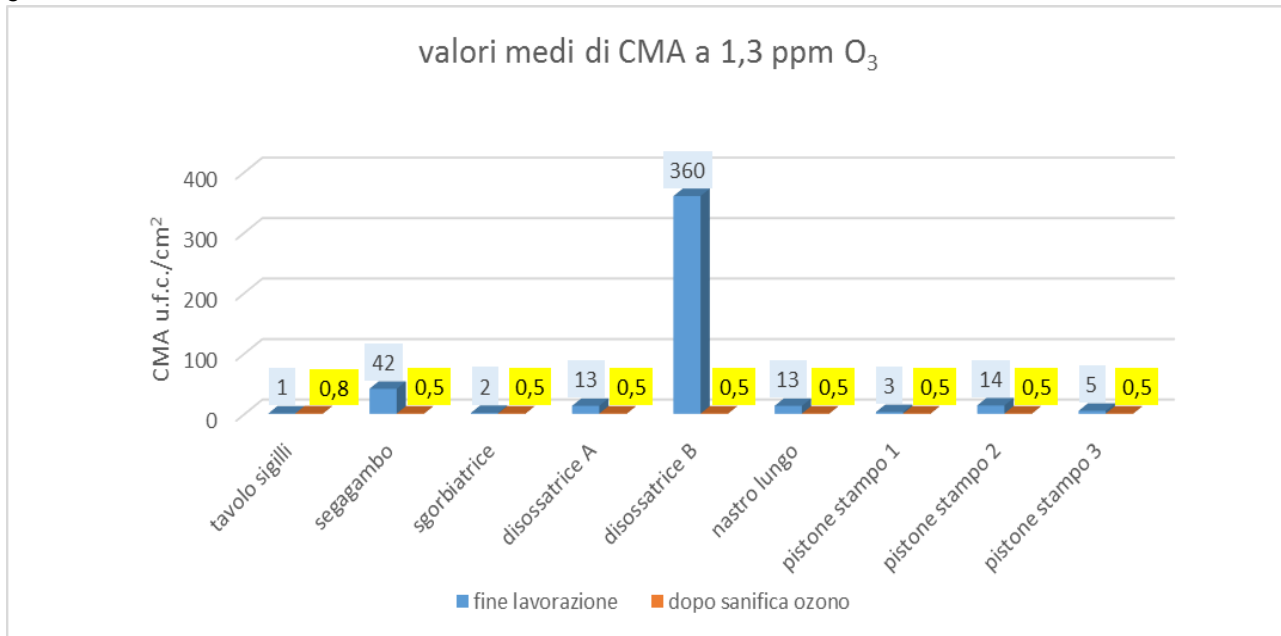
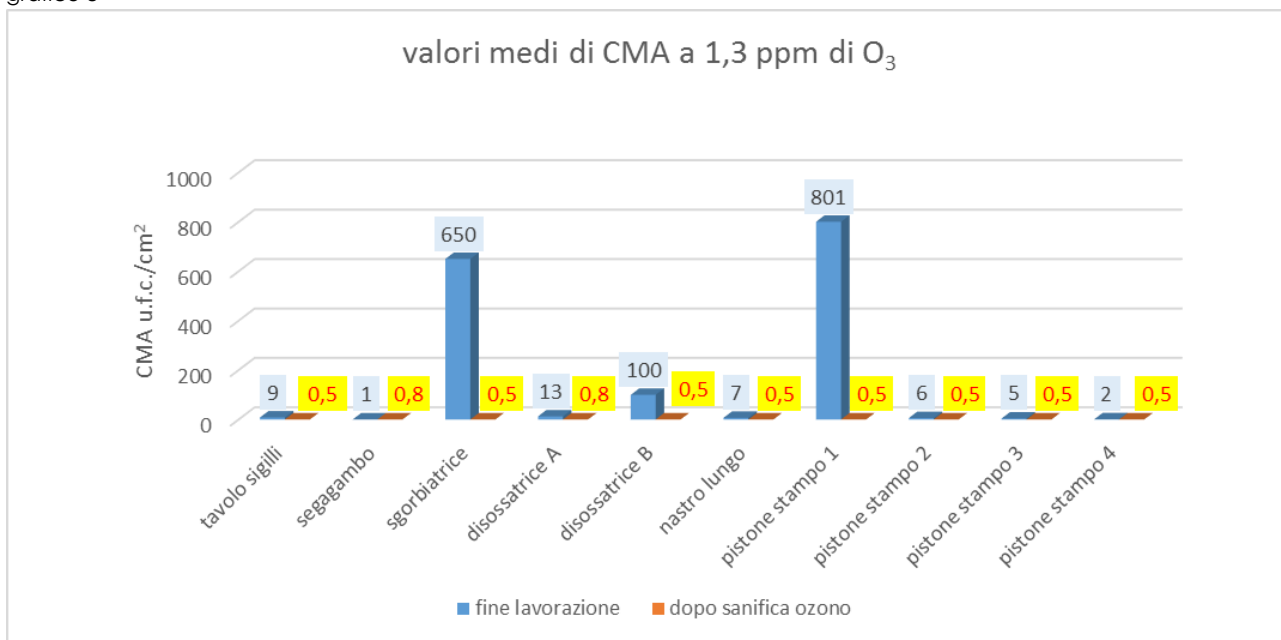


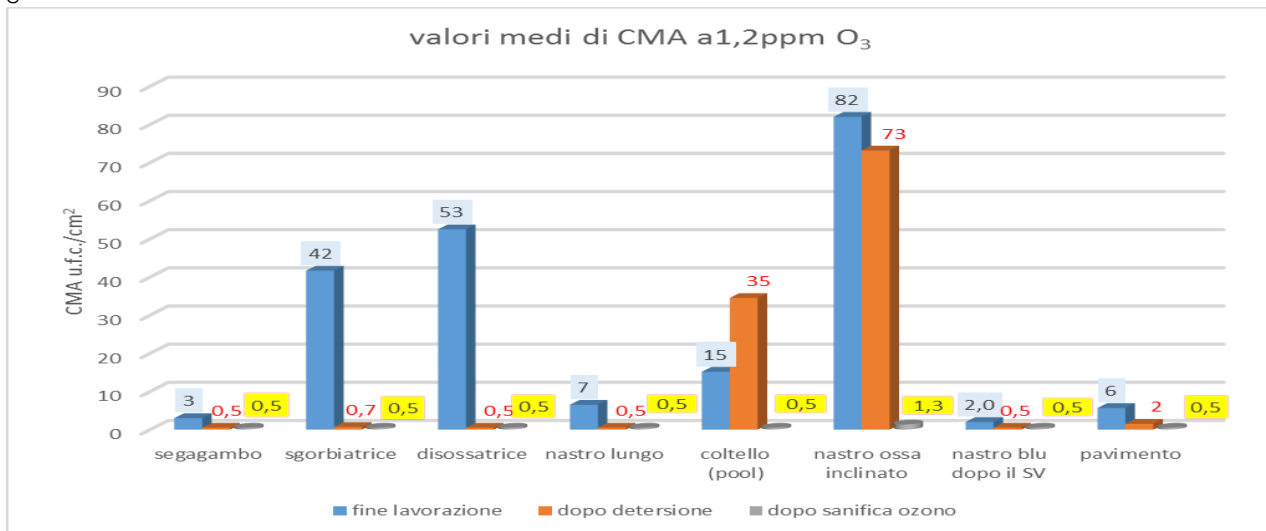
grafico 8



III° prova

La concentrazione di ozono utilizzata è stata di 1,2 ppm per un tempo di trattamento di 5 ore. Nel Grafico 9 si possono vedere i risultati medi della Carica Microbica Aerobia a 30° C effettuati a fine lavorazione, dopo detersione e post trattamento con ozono (fase pre-operativa).

grafico 9

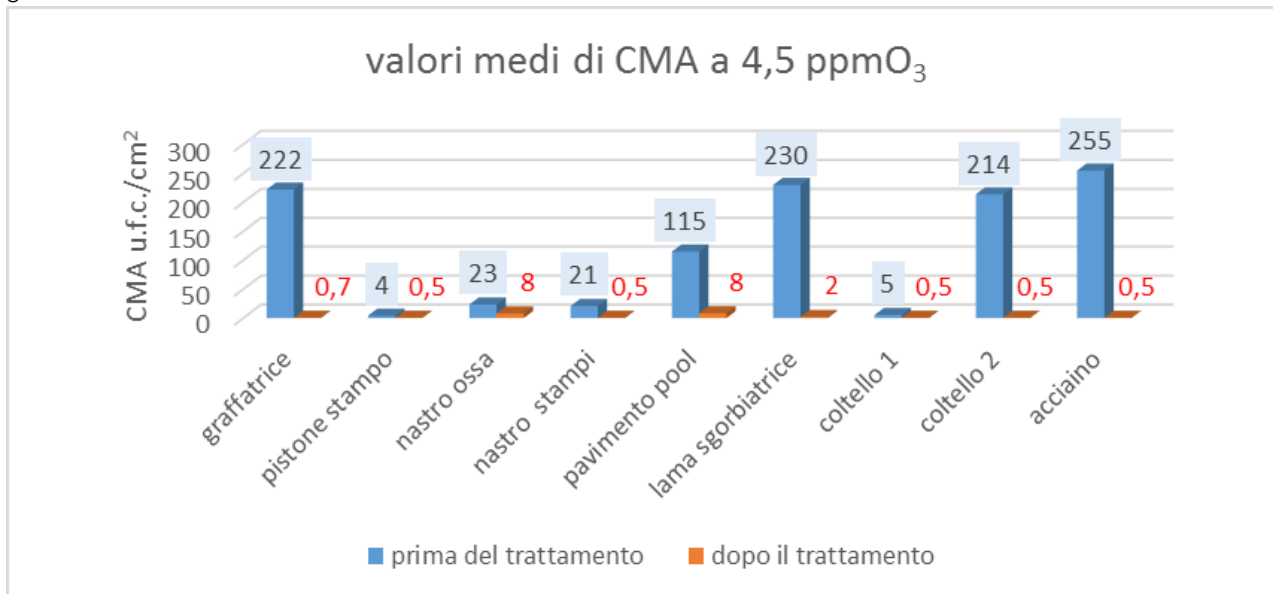


IV° prova

La concentrazione di ozono utilizzata è stata di 4,5 ppm per un tempo di trattamento di 5 ore. Nel Grafico 10 si possono vedere i risultati della Carica Microbica Aerobia a 30° C effettuati a fine lavorazione e dopo trattamento con ozono (fase pre-operativa).

Queste prove sono state effettuate in tre fine settimana diversi, con lo scopo di individuare le potenzialità sanificanti dell'ozono in presenza di sostanza organica lasciata durante un'intera giornata lavorativa.

grafico 10



Durante queste esperienze sono state monitorate oltre che la Carica Microbica Aerobia la presenza /assenza di *Listeria*. Nelle prove che sono state effettuate si è notato che la normale prassi di detersione e risciacquo è capace di rimuovere efficacemente la *Listeria*. Si è però verificato che, in alcune situazioni, il trattamento con ozono ha eliminato la *Listeria* non rimossa dalla detersione oltre ad aver portato la CMA a valori u.f.c./cm² <1.

E' da rilevare che dopo opere di manutenzione effettuate nel locale, si è osservata una presenza importante di listeria (n.10 "presenza") la quale è risultata assente dopo aver effettuato la detersione e la sanifica con ozono alla concentrazione di 1,3 ppm per cinque ore.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Questo studio ha evidenziato le problematiche inerenti all'uso dell'ozono gassoso in ambienti confinati, allo stesso tempo ha permesso di definire i parametri d'impiego dell'ozono in un ambiente lavorativo sostituendolo "in tutti casi monitorati" al comune sanificante chimico.

Partendo dai risultati microbiologici internazionali che hanno dimostrato che, l'esposizione in vitro di *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* O157:H7, *L. mesenteroides*, and *Listeria monocytogenes* all' ozono (2.5 ppm per 40 s) ha portato alla riduzione media da 5 a 6 log Kim e Yousef (2000). Già Di Ciccio et al (2014) hanno dimostrato la sua capacità in inibire lo sviluppo di biofilm di *L. monocytogenes* con 2 ppm per 40 secondi sostenendo l'attività battericida in vitro.

Nonostante i risultati in vitro siano sempre superiori, Pirani(2008), ha trovato nelle prove realizzate in contesti produttivi (1,1 ppm per 3 ore) riduzioni interessanti su *S. aureus*, *Linnocua*, *E.coli* e *S. cerevisae* (rispettivamente 3,4;2,1;3,1;3,1log).

Holah et al. (1995) hanno valutato diversi sistemi di trattamento dell'aria provando l'efficacia battericida dell'ozono e il suo effetto costante sui microrganismi. Altri ricercatori hanno decontaminato gli ambienti di lavorazione di diversi tipi di industrie distribuendo 0,082 ppm a 25°C e 0,06 ppm a 3°C (Decupper, 1992; Chun e coll.,1993). Risultati analoghi ottenuti da altri ricercatori sono stati segnalati da Kim et al. (1999).

Le prove eseguite da 1,2 ppm hanno garantito una sanificazione soddisfacente (Graf.9). Considerando la notevole influenza che le condizioni ambientali (temperatura/umidità) rivestono sulla suscettibilità dei microrganismi all'ozono si è scelto di prolungare il trattamento nel disosso fino a 5 ore. I trattamenti sono stati condotti nelle ore notturne poiché alla ripresa del lavoro la quantità di ozono ambientale doveva trovarsi entro i limiti di sicurezza. Questo ha influenzato la scelta del tempo massimo di erogazione possibile.

In base ai risultati ottenuti, l'uso dell'ozono si è dimostrato una valida alternativa ai sanificanti chimici negli ambienti di lavorazione delle carni.

In Italia il suo utilizzo è confermato dal parere favorevole del CNSA "sul trattamento con ozono dell'aria negli ambienti di stagionatura dei formaggi", tanto da proporre il suo impiego per la sanitizzazione degli ambienti di lavorazione. In Giappone l'utilizzo dell'ozono è stato approvato nell'industria alimentare già nella decade '90-2000 e nel 2006 esistevano più di 100.000 installazioni di ozono in gas o acqua per sanificare i più svariati alimenti (Naito and Takahara, 2006).

In America dopo il suo riconoscimento come GRAS (*Generally Recognised as Safe*) nel '97 e come additivo antimicrobico ammesso per il contatto con qualsiasi tipo di alimento (FDA 2001), l'utilizzo dell'ozono è stato impiegato in diversi altri processi alimentari nel mondo.

I risultati ottenuti nelle prove effettuate dimostrano la necessità di adattare i parametri del trattamento con l'ozono alle diverse condizioni ambientali presenti nella realtà produttiva; inoltre nella definizione dei dosaggi sarà necessario considerare ulteriori variabili quali la presenza di *biofilm* sulle superfici di lavoro che, come già evidenziato in precedenti ricerche (Robbins et al, 2004), contribuisce ad aumentare notevolmente la resistenza microbica all'ozono richiedendone dosaggi maggiori. Le reazioni del processo di ozonizzazione nell'acqua sono basate sulle reazioni dirette e indirette (nelle quali la decomposizione tramite reazioni radicaliche a catena con altre molecole organiche produce radicali idrossile) (Cho et al, 2003). La U.R. nell' ambiente trattato era in media del 70% quindi si potrebbe ipotizzare che l'effetto combinato dell'ozono e degli OH lo renderebbero non soltanto più efficace di altri disinfettanti ma giustificerebbero i risultati sorprendenti come quelli ottenuti nella situazione estrema (simulata) senza detersione. In futuro, queste reazioni potrebbero anche permettere il controllo della crescita del *biofilm*, ma servono altri studi per trarre queste conclusioni.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Greene A.K., Few B.K. and Serafini J.C. (1993) A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. *J. Dairy Sci.*; 76, 3617-3620.
- 2) Horvath M., Bilitzky L. and Huttner J. (1985) Fields of utilization of ozone. R.J.H. Clark (ed.) *Ozone*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., NY. p 257-316.
- 3) Khadre M.A. and Yousef A.E. (2001) Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *Int. J. Food Microbiol.*; 71, 131-138.
- 4) Kim J.G., Yousef A.E. and Dave S. (1999) Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *J. Food Protect.*; 62, 1071-1087.
- 5) Majchrowicz A. (1998) Food safety technology: a potential role for ozone? *Agricultural Outlook*, Economic research Service/USDA; pp. 13-15.
- 6) Moore G., Griffith C. and Peters A. (2000) Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. *J. Food Protect.*; 63, 1100-1106.
- 7) Restaino L., Frampton E.W., Hemphill J.B. and Palnikar P. (1995) Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*; 61, 3471-3475.
- 8) Rice R.G., Farquhar J.W. and Bollyky L.J. (1982) Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods. *Ozone Sci. Eng.*; 4, 147-163.
- 9) Robbins J.B., Fisher C.W., Moltz A.G. and Martin S.E. (2004) Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *J. Food Protect.*; 68, 494-498.
- 10) Cho, M., Chuang, H. And Yoon, J. Disinfection of water containing Natural organic matter by using ozone-initiated radical reactions. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 2003, 2284-2291.
- 11) Suslow, T. *Perishables Handling Quarterly Issue No. 94 May 1998*, 9-11.
- 12) Robbins J.R.; Fisher C.W.; Moltz A.G. & Martin S.E. (2005), 68, 494-498.
- 13) Decupper J. (1992). Equipment for cold storage chambers for food, French patent application no. FR 2666742 A1.
- 14) Chun J.K.; Lee Y.J.; Kim M.; Lee H.W. & Jang Y. (1993), *Korean J. Food Sci.Technol.* 25, 174-177.
- 15) Kim J.G.; Yousef A.E.(2000). Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. *J. Food Protection* 65, n.3.
- 16) Campos, C. A. et al. (2005), Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *Int J Food Microbiol.*, Aug 25, 103 (2), 121-30.
- 17) Tapp, C. and Sopher, C. D. (2002), *Ozone Applications in Fish and Seafood Processing – Equipment Suppliers Perspective – Summary Paper*. In: *Ozone Applications in Fish Farming*, EPRI, Palo Alto, CA: 2002, 4 pages.
- 18) A. Muthukumar, M. Muthuchamy Optimization of ozone in gaseous phase to inactivate *Listeria monocytogenes* on raw chicken samples *Food Research International* 54 (2013) 1128–1130
- 19) James, R.R. Potential of ozone as a fumigant to control pests in honey bee (Hymenoptera: Apidae) hives. *J.Econ.Entomol.* 104(2):353-359 (2011).
- 20) Di Ciccio, P. et al. (2014). Effects of gaseous ozone on food-borne pathogens. *Ital. J.Food Sci.*, vol 26, 116-118.
- 21) Fan, L., Song, J., McRae, K.B. and Sharpe, D.. Gaseous ozone treatment inactivates *Listeria innocua* in vitro. *Journal of applied Microbiology* 103(2007)2657-2663.
- 22) Kekez, M.M., Sattar, S.A..A new ozone-based method for virus inactivation: preliminary study. *Phys. Med. Biol.* 42 (1997) 2027-2039.
- 23) Ripamonti B., Bersani C., Pirani S., Stella, S. Use of gaseous ozone as a disinfectant in meat industry. *IXVIII Convegno Nazionale AIVI 11-13 giugno 2008, Sabaudia (LT), Italy – 3.1/09 pag. 31-34 .*
- 24) Nicholas et al. The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 115, 555–564 2013.
- 25) Naito, S. nd Takahara, H. 2006). Ozone contribution in food industry in Japan. *Ozone: Science & Engineering*, v28(6):425-9.