

Dariusz Białoszewski^{1*}, Ewa Bocian², Stefan Tyski^{2,3}

¹Zakład Rehabilitacji Oddziału Fizjoterapii II Wydziału Lekarskiego, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków, Warszawa

³Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mechanizm działania ozonu. 3. Rozwój ozonoterapii. 4. Ozon w dezynfekcji wody i powietrza. 5. Zastosowanie ozonu w przemyśle spożywczym. 6. Zastosowanie ozonu w terapii. 7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ozonu oceniana *in vitro*. 8. Podsumowanie

Ozonotherapy and application of ozone as disinfectant

Abstract: Unquestionable bactericidal activity of ozone has been known for over 100 years. The possibility of artificial production of ozone in the specially constructed generators allows for studying the activity of ozone against microorganisms. Medical application (ozonotherapy) of ozone (gas naturally occurring in nature) is nothing more than one more method of physical therapy. In Poland, ozonotherapy was applied for the first time by professor Hubert Antoszewski, who working in Silesia and being a strong follower of this method, set up the Polish Society of Ozonotherapy (PTOT) located in Katowice. Ozonotherapy is still, despite the appearing increase in the number of major scientific reports about its efficacy, treated as a method of alternative medicine and for this reason it is not refunded by the health systems of many countries. Ozone is toxic to humans and when inhaled, it can cause serious health problems – if its concentration in air exceeds a safe value. Toxicity of ozone depends on its concentration, time of exposure and route of administration. Despite its toxicity, bactericidal, fungicidal and virucidal activity, ozone is used in ozonotherapy in many medical fields, e.g. surgery, dermatology, laryngology, ophthalmology, gynecology and dentistry. Additionally, ozone is also applied for disinfection of water and air, and in food industry. The Department of Antibiotics and Microbiology at the National Medicines Institute in Warsaw, has performed studies concerning antimicrobial activity of ozonized water and oxygen-ozone gas mixture, according to the methodology developed in the relevant European Standards (EN). These studies were intended for evaluation of bactericidal and fungicidal activity of disinfectants and antiseptics. The present state of knowledge, taking into consideration the research related to ozone antimicrobial activity, allows us to treat ozonotherapy as an evidence-based method (EBM). Other applications of this physical method are still disputable despite many studies.

1. Introduction. 2. Mechanism of action of ozone. 3. Development of ozonotherapy. 4. Ozone in water and air disinfection. 5. Use of ozone in the food industry. 6. Use of ozone in therapy. 7. Antimicrobial activity of ozone evaluated *in vitro*. 8. Summary

Słowa kluczowe: mieszanina tlenowo-ozonowa, ozon, ozonoterapia, ozonowana woda, dezynfekcja

Key words: oxygen-ozone gas mixture, ozone, ozonotherapy, ozonized water, disinfection

1. Wprowadzenie

Ozon, jako naturalny składnik atmosfery powstaje w stratosferze na wysokości około 30 km, jako wynik działania promieni ultrafioletowych na tlen. Możliwość sztucznego wytwarzania ozonu w specjalnie skonstruowanych generatorach pozwala na prowadzenie badań nad wpływem ozonu na żywe organizmy. Pierwsze, udokumentowane wyniki zwalczania zakażeń przyrannych za pomocą ozonu odnotowano już prawie 100 lat temu [52]. Zastosowanie medyczne ozonu (ozonoterapia) – naturalnie występującego w przyrodzie gazu jest w swej istocie niczym innym jak jeszcze jedną metodą fizjoterapii. Spełnia bowiem kryteria dla takiej metody podane przez P o n i k o w s k ą i F e r s o n a, którzy uznali ozon za gaz leczniczy mający zastosowanie w balneologii [42].

Pomimo toksycznych właściwości ozonu, jego aktywność bakterio-, grzybo- i wirusobójcza jest wykorzystywana w ozonoterapii prowadzonej m.in. w obszarze chirurgii, dermatologii, laryngologii, okulistyce, ginekologii czy stomatologii. Ponadto, do sterylizacji wrażliwych na wysoką temperaturę oraz wilgoć narzędzi i materiałów stosowanych w opiece medycznej, wykorzystuje się synergistyczne działanie par nadtlenu wodoru i ozonu (zwane w literaturze jako peroxone lub perozone), jako nową technologię szybkiej sterylizacji niskotemperaturowej o nazwie systemu „3M™ Optreoz™ 125-Z” [36]. System ten zapewnia dobrą penetrację długich i wąskich kanałów wewnętrznych, bez ryzyka uszkodzenia materiału, pozwalając na sterylizację np. długich wielokanałowych endoskopów giętkich. Ozon znalazł zastosowanie również jako środek do dezynfekcji

* Autor korespondencyjny: Zakład Rehabilitacji Oddziału Fizjoterapii II Wydziału Lekarskiego, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Solec 57, 00-424 Warszawa; tel. (022) 629 46 65; e-mail: dariusz.bialoszewski@wum.edu.pl

wody, powietrza oraz jako środek dezynfekcyjny i konserwujący w przemyśle spożywczym.

2. Mechanizm działania ozonu

Ozon jest jednym z najsilniejszych utleniaczy. Reagując ze związkami organicznymi powoduje ich utlenianie. W pierwszym etapie działania ozonu dochodzi do szybkiego przerwania ściany komórkowej bakterii. Następnie, reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów wchodzących w skład błony cytoplazmatycznej ulegają peroksydacji, co prowadzi do powstania nadtlenuków tych związków. Produkty peroksydacji zmieniają właściwości fizyczne błon komórkowych. Powodują ich depolaryzację, hamują aktywność enzymów błonowych i białek transportowych. Ponadto, w reakcjach z silnymi utleniaczami może również dojść do utlenienia aminokwasów, białek i kwasów nukleinowych [28].

Ozon jest gazem toksycznym dla człowieka, wdychany może powodować poważne problemy zdrowotne, jeśli jego stężenie w powietrzu przekroczy bezpieczną wartość. Symptomy takie jak: uczucie suchości w gardle i w ustach, kaszel, bóle głowy i klatki piersiowej mogą pojawić się przy dłuższym czasie ekspozycji na ozon i ulegają nasileniu również przy wyższych jego stężeniach. W szeregu badaniach na zwierzętach dowiedziono szkodliwego działania ozonu na układ oddechowy, procesy odpornościowe i wykazano jego genotoksyczność [53]. Ozon należy do grupy egzogennych czynników wyzwalających aktywne formy tlenu, odpowiedzialne za szereg efektów biologicznych. Organizmy tlenowe posiadają systemy obronne unieczynnijające aktywne formy tlenu, jednakże układ obronny komórki posiada określone możliwości tego unieczynniania, których wyczerpanie może powodować lawinowy wzrost stężenia rodników tlenowych w komórce. W wyniku działania ozonu na podwójną nić DNA, w układach *in vitro*, może dochodzić do pęknięć połączeń pomiędzy pętlami tego kwasu, a także pomiędzy DNA a białkami. W warunkach *in vivo*, skutki działania ozonu nie muszą być równie niebezpieczne, ponieważ uszkodzenia DNA mogą być sprawnie usuwane przez komórkowe systemy naprawcze, a i stężenie ozonu może być dużo mniejsze, niż w warunkach doświadczalnych [53].

Toksyczność ozonu zależy od jego stężenia, czasu ekspozycji i drogi podania. Ozon podawany drogą wziewną może powodować nieodwracalne zmiany w komórkach rzęskowych płuc, zmieniając strukturę ich błon komórkowych, czego konsekwencją jest zwłóknienie płuc. Według rozporządzenia Ministra Środowiska „w sprawie dokonywania oceny poziomów substancji w powietrzu”, dopuszczalny poziom ozonu w powietrzu wynosi $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ – uśredniony wynik pomiarów w ciągu 8 godzin [44].

3. Rozwój ozonoterapii

Ozon odkryto ponad 170 lat temu. W Tabeli I zestawiono istotne daty i wydarzenia związane z zastosowaniem ozonu w terapii.

Ważnym wydarzeniem w rozwoju badań ozonu było utworzenie w 1971 r. International Ozone Institute (IOI), przemianowanego w 1973 r. na towarzystwo naukowe o nazwie: International Ozone Associations (IOA), które miało służyć za centrum myśli i technologii związanych z wieloaspektowymi zastosowaniami ozonu w przemyśle i medycynie. Organizacja IOA to ogólnoświatowe forum badań i wymiany doświadczeń łączące naukowców, inżynierów, projektantów systemów, technologów, producentów wyposażenia i użytkowników technologii ozonowych. IOA wprowadziła szereg ogólnoświatowych programów obejmujących m.in. takie obszary jak: zastosowanie ozonu w dezynfekcji wody i ścieków, w produkcji i przetwórstwie żywności, a także badanie medycznych zastosowań ozonu.

Obecnie IOA zrzesza ponad 1300 członków, którzy prowadzą programy IOA w trzech regionalnych grupach światowych: panamerykańskiej (PAG: Ameryka Północna, Centralna i Południowa), japońskiej (NIG) i grupie EA3 (EA3G: Europa, Afryka, Azja, Australia) zrzeszającej ponad 40 krajów, prowadzących badania nad ozonem i stosujących go ze wskazań medycznych.

IOA wydaje regularnie czasopisma: *IOA Newsletter – Ozone News* i dwumiesięcznik *Ozone: Science & Engineering* (OS&E). Odbyło się już 20 światowych kongresów IOA, ostatni miał miejsce w Paryżu, w maju 2011 r.

W Europie od 1971 r. działa European Cooperation of Medical Ozone Societies z siedzibą w Paryżu zrzeszające obecnie 4 regionalne towarzystwa działające też w ramach EA3G: niemieckie: *Ärztliche Gesellschaft für Ozon-Anwendung in Prävention und Therapie*; szwajcarskie: *Swiss Medical Society for Ozone and Oxygen Therapies – SAGOS*; austriackie: *Ozone Therapists' Interest Group – OTIG* i włoskie: *International Medical Ozone Society Italy – IMOS*. Grupa ta w 2012 r., w dniach 4–6 lipca, zorganizowała we Francji, w Ecole d'ingenieurs de Purpon w Tuluzie kolejne spotkanie pod hasłem „Ozone & Related Oxidants to Meet Essential Human Needs Uses for Agri-Food, Industry, Water and Health”. Z kolei Grupa PAG organizuje swoje sympozjum we wrześniu 2012 r., w Milwaukee.

Ogromne zasługi dla nowoczesnej ozonoterapii oddali dr Renate V i e b a h n autorka uznanych podręczników tej metody i, obecnie emerytowany, profesor fizjologii Velio B o c c i, który od 40 lat propaguje i bada tę metodę organizując wiele kursów i szkoleń jako wieloletni Prezydent IMOS i Dyrektor Instytutu Wydziału Farmacji Uniwersytetu w Sienie.

W Polsce po raz pierwszy zastosował klinicznie ozonoterapię, pracujący w Katowicach, prof. Hubert

Tabela I

Wybrane istotne daty w rozwoju ozonoterapii – zestawienie własne

Rok	Wydarzenie	Pismien- nictwo
1840	Niemiecki chemik Friedrich Schönbein (1799–1868) odkrywa ozon i nazywa go dla szczególnego zapachu – ozonem, od greckiego słowa oznaczającego zapach – <i>ozein</i>	[43]
1856	Pierwsze medyczne użycie ozonu w Stanach Zjednoczonych przez homeopatę J. L. Martina	[19]
1857	Wynalezienie pierwszego, laboratoryjnego generatora ozonu tzw.: lampy ozonowej (Werner von Siemens)	[43]
1896	Stany Zjednoczone – Nikola Tesla opatentowuje pierwszy generator do przemysłowej produkcji ozonu	[53]
1900	Stany Zjednoczone – Nikola Tesla założył „Tesla Ozon Co”, który sprzedaje wynalezione generatory ozonu i ozonowaną oliwę dla lekarzy do użytku medycznego	[53]
1873	Odkrycie zdolności zabijania drobnoustrojów przez ozon (Fox)	[16]
1885	Pierwsza angielskojęzyczna publikacja dotycząca leczenia za pomocą ozonu – zatytułowana „Ozone” autorstwa Ch. J. Kenwortha z Jacksonville	[30]
1915	Pierwsze zastosowanie ozonu do leczenia ran	[56]
1916	Pierwsze doniesienie o przydatności leczenia ozonem w przypadkach zakażeń kości	[50]
1935	Pierwsze stosowanie insuflacji ropnych przetok ozonem (Payer i Auborg)	[7]
1971	Powstaje niemieckie „Medyczne Stowarzyszenie Terapii Ozonem”	–
1972	Powstaje Międzynarodowe Stowarzyszenie Terapii Tlenowej założone przez George Freibotta, które stało się następcą założonego w 1913 r. „Związku Terapii Tlenowej”	–
1971	Powstaje międzynarodowe towarzystwo naukowe: International Ozone Associations – IOA	–
1979	Wydanie przez E. Fischera w Verlag für Medizin w Heidelbergu pierwszego nowoczesnego, profesjonalnego podręcznika ozonoterapii klinicznej – „Das Medizinische Ozon” autorstwa H. H. Wolffa	[57]
1979	Pierwsze doniesienie o zastosowaniu ozonu w leczeniu miażdżycy zarostowej tętnic; mikroangiopatii i polineuropatii cukrzycowej oraz skutków niewydolności krążenia żylnego	[41]
1983	Pierwszy Międzynarodowy Kongres dotyczący medycznych zastosowań ozonu, Waszyngton, Stany Zjednoczone	–
1986	Pierwsze w Polsce zastosowanie kliniczne ozonoterapii	[4]
1995	Pierwsze na świecie podanie mieszaniny tlenowo-ozonowej do komór bocznych mózgu	[5]
2000	Pierwsze podane w piśmiennictwie zastosowanie głębokich pooperacyjnych insuflacji mieszaniną ozonowo-tlenową	[12]
2003	Pierwsze podane w piśmiennictwie śródoperacyjne zastosowanie ozonoterapii powierzchniowej w profilaktyce zakażeń miejsca operowanego w ortopedii	[9]

A n t o s z e w s k i, który będąc gorącym zwolennikiem tej metody powołał do życia Polskie Towarzystwo Ozonoterapii (PTOT) z siedzibą w Katowicach. Jako Prezes PTOT zorganizował pierwsze w Polsce Sympozjum Ozonoterapii oraz trzy Ogólnopolskie Kongresy Polskiego Towarzystwa Ozonoterapii – pierwszy w 1993 r. w Katowicach, a ostatni w Szczyrku w 1996 r. W 1997 r. pojawiła się pod jego redakcją pierwsza w Polsce publikacja opisująca terapeutyczne zastosowanie ozonu w medycynie [3].

Po odejściu prof. H. A n t o s z e w s k i e g o na emeryturę działalność PTOT zaczęła zamierać, a po Jego śmierci, we wrześniu 2007 r. w zasadzie zupełnie ustała i wymaga reaktywacji, chociaż być może w nieco innej formule.

Znaczne zasługi dla rozwoju ozonoterapii w Polsce położył dr Piotr S z m u r ł o prowadzący badania wraz z prof. Ireną P o n i k o w s k ą w kierowanej przez nią Klinice Balneologii i Medycyny Fizykalnej UMCS z siedzibą w Ciechocinku. Powstało tam wiele pomysłów dotyczących zastosowań ozonu w balneologii i prace nad zastosowaniami tej metody w balneologii i fizyko-terapii są tam nadal prowadzone [55].

Zasłużony dla polskiej ozonoterapii jest również mgr inż. Wiesław B r o j e k, entuzjasta tej metody,

współtwórca oraz producent jedynej do tej pory rodzennie polskiego, stale unowocześnianych aparatów do ozonoterapii (seria ATO₃.)

Obecnie terapia ozonem jest dopuszczona prawnie i stosowana z powodzeniem w: Niemczech, Włoszech, Francji, Rosji, Rumunii, Polsce i Ukrainie, w Czechach, na Węgrzech, w Jugosławii, Bułgarii, Izraelu, Japonii, Malezji, Singapurze, Brazylii, na Kubie, w Meksyku, Zjednoczonych Emiratach Arabskich oraz w Kanadzie i w większości stanów Stanów Zjednoczonych (Alaska, Waszyngton, Arizona, Kalifornia, Kolorado, Oregon, Nowada, Nowy Meksyk, Teksas, Oklahoma, Georgia, Nowy Jork, Północna i Południowa Karolina, Ohio, Minnesota). W innych krajach lub stanach, jest z niejasnych powodów, uznawana w całości za medyczne postępowanie niekonwencjonalne. Należy zaznaczyć, że ozonoterapia, zwłaszcza w swym aspekcie bakterio-bójczym, stosowana zgodnie z zaleceniami medycznymi i w sposób prawidłowy jest metodą bezpieczną i nietoksyczną [17, 27].

Ozonoterapia jest, jak już wspomniano nadal, pomimo ciągłego ukazywania się wielu poważnych doniesień naukowych o jej skuteczności, traktowana jako metoda medycyny alternatywnej. Z tego powodu

leczenie za jej pomocą nie jest refundowane przez systemy opieki zdrowotnej wielu z ww. krajów. Jest to szczególnie zdumiewające, jeśli wziąć pod uwagę chociażby znane od ponad 100 lat, niepodważalne działanie bakteriobójcze ozonu [15, 17, 29, 52].

4. Ozon w dezynfekcji wody i powietrza

Ozon, ze względu na silne działanie przeciwdrobnoustrojowe znalazł zastosowanie jako skuteczny środek do dezynfekcji wody do picia, wody w basenach, wody przemysłowej, wody do celów chłodniczych oraz ścieków. Jego aktywność przeciwdrobnoustrojowa przewyższa aktywność chloru około 50-krotnie [49]. W badaniach porównawczych aktywności ozonu i podchlorynu sodu wobec bakterii występujących w ściekach szpitalnych – głównie z rodzaju *Enterococcus*, wykazano znacznie wyższą skuteczność bakteriobójczą ozonu, nawet wobec enterokoków opornych na wankomycynę [49]. Dodatkową zaletą ozonu jest znacznie krótszy czas działania w porównaniu z czasem biobójczego działania podchlorynu sodu. Obok działania bakteriobójczego, ozon wykazuje również ważną cechę w przypadku zapewnienia czystości wody – zdolność ograniczania liczebności glonów i pierwotniaków oraz pleśni i innych grzybów. Systemy ozonowania instalowane w celu dezynfekcji wody zdanej do konsumpcji zapewniają ochronę przed skażeniem *Cryptosporidium* sp. [49]. Ozon stosowany jest również do ciągłego uzdatniania i napowietrzania wody w zbiornikach hodowlanych ryb. W obszarze weterynaryjnym, ozon może być również wykorzystywany do dezynfekcji ścieków, w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się drobnoustrojów do środowiska. Bakterie pochodzące ze ścieków odzwierzęcych, w wyniku częstego, prewencyjnego stosowania antybiotyków takich jak: chlorotetracyklina, linkomycyna, sulfametazyna, czy tetracyklina, są często na nie odporne [37]. Macauley i wsp. [37] przeprowadzili eksperyment, w którym porównano aktywność chloru, ultrafioletu i ozonu wobec bakterii obecnych w ściekach pochodzących z hodowli świń. Zastosowanie chloru o stężeniu 30 mg/L powodowało stopień redukcji liczby bakterii wynoszący 2,2–3,4 log, jednocześnie zidentyfikowano szczepy dwóch opornych na chlor gatunków *Bacillus subtilis* i *B. licheniformis*. Zastosowanie promieni UV prowadziło do inaktywacji prawie wszystkich bakterii, jednakże było energochłonne, natomiast ozon w stężeniu 100 mg/L powodował stopień redukcji liczby bakterii ściekowych na poziomie 3,3–3,9 log (gęstość bakteryjnej zawiesiny wyjściowej wynosiła ok. 7 log cfu/mL).

Ozon w formie gazowej wykorzystywany jest do dezynfekcji pomieszczeń mieszkalnych, w budynkach użyteczności publicznej takich jak: teatry, kasyna czy szpitale [49]. Jest skuteczny przy odgrzybianiu sta-

rych, zaniedbanych mieszkań czy domów, w których z powodu np. złej wentylacji i dużej wilgotności rozwinęły się grzyby pleśniowe, najczęściej z gatunków *Stachybotrys chartarum* czy *Aspergillus versicolor* [49]. Należy jednak pamiętać, aby unikać bezpośredniego kontaktu ludzi z mieszaniną ozonowo-powietrzną i użytkować oczyszczone ozonem pomieszczenia po odpowiedniej wentylacji, gdy resztki ozonu ulegną usunięciu lub rozkładowi.

Jedne z ostatnich badań Huttunen i wsp. [26] dotyczą możliwości wykorzystania ozonowania do dezynfekcji zakurzonych mebli pochodzących z wilgotnych i zaniedbanych budynków. Zastosowanie urządzenia myjącego przy użyciu pary i jednocześnie dezynfekującego za pomocą ozonu o stężeniu ponad 30 ppm, najczęściej prowadziło do redukcji drobnoustrojów w kurzu. Liczba większości gatunków grzybów ulegała obniżeniu, zwłaszcza dotyczyło to grzybów z rodzajów: *Penicillium*, *Cladosporium*, *Candida*, *Aureobasidium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* i *Actinomyces*. Jednakże zaobserwowano, że metoda ta nie usuwa czy też nie niszczy wszystkich gatunków grzybów. Zidentyfikowano cztery gatunki, które były obecne w kurzu po procesie mycia i dezynfekcji: *Cladosporium pullulans*, *C. cladosporides*, *C. herbarum* i *Epicoccum nigrum*.

5. Zastosowanie ozonu w przemyśle spożywczym

Ozon może być dodawany do płynów stosowanych do mycia warzyw, owoców, ryb i mięsa w celu dezynfekcji i przedłużenia trwałości tych produktów [38, 40]. Przeprowadzono badania efektywności działania ozonowanej wody o zawartości ozonu 3 ppm, 5 ppm i 10 ppm, użytej do płukania sałaty lodowej przez 5 min. w temperaturze pokojowej [33]. Zaobserwowano znaczny spadek liczby naturalnie bytujących bakterii na świeżo ściętej sałacie, gdy stosowano wodę ozonowaną, ale tylko do stężenia 5 ppm ozonu. Świeże warzywa zanieczyszczone *Yersinia enterocolitica* były przyczyną epidemii, którą opanowano dzięki zastosowaniu wody ozonowanej o stężeniu ozonu 1,4 i 1,9 ppm. Już po 1 minucie zaobserwowano redukcję populacji drobnoustrojów w wodzie, wynoszącą odpowiednio: 4,6 i 6,2 log cfu/mL [48]. W innych badaniach wykazano, że ozonowana woda (5 ppm ozonu) stosowana do płukania przez 1 min powoduje redukcję liczby bakterii *Y. enterocolitica* i *Listeria monocytogenes* na powierzchni ziemniaków, odpowiednio o 1,6 i 0,8 log cfu/g [48]. Zastosowanie ozonowanej wody o stężeniu ozonu 1,6 i 2,2 ppm przez 1 min, dało również dobre rezultaty w ograniczaniu kilku epidemii shigellozy, związanych ze świeżymi warzywami. Odnotowano redukcję liczebności populacji *Shigella sonnei* w wodzie, odpowiednio o 3,7 i 5,6 log cfu/mL (gęstość zawiesiny wyjściowej wynosiła 9 log cfu/mL).

[48]. Redukcję liczby bakterii, takich jak *E. coli* O157:H7 i *Salmonella* uzyskiwano również w przypadku mycia ozonowaną wodą małych owoców takich jak maliny czy truskawki (o 5,6 log i 4,5 log – odpowiednio, w przypadku dezynfekcji malin oraz o 2,9 log i 3,3 log – odpowiednio, w przypadku dezynfekcji truskawek) [8]. Kim i Hung [31] przeprowadzili badania dotyczące procesów dezynfekcji świeżych owoców (jagód). Do badań użyto szczep *E. coli* O157:H7, naniesiony na kwiaty i owoce jagód. Wykazano, że zastosowany do dezynfekcji ozon o stężeniu 4000 mg/L redukował liczbę komórek szczepu tylko o 0,66 log – w przypadku kwiatów i o 0,72 log w przypadku owoców jagód.

Vurma i wsp. [59], w badaniach bakteriobójczej aktywności gazowego ozonu wobec szczepu *E. coli* O157:H7, wykazali redukcję liczby komórek do 2,4 log, 1,8 log i 1,4 log, w zależności od warunków badania. Gęstość zawiesiny wyjściowej wynosiła ok. 7 log cfu/mL, a zatem należy zwrócić uwagę na fakt, że mimo wykazanej bakteriobójczej aktywności ozonu, poziom redukcji może być niewystarczający do zapewnienia bezpieczeństwa konsumenta.

W innych badaniach wykazano skuteczność ozonu o stężeniu 0,1 ppm stosowanego przez 6 h w inaktywacji *E. coli* skażającej czarny pieprz w postaci ziarnistej i mielonej, co nie miało wpływu na cechy organoleptyczne [23].

Ozon stosowany przy produkcji napojów, do płukania butelek przed napełnieniem, czy dezynfekcji beczek dębowych w winiarniach, wykorzystywany jest nie tylko jako czynnik przeciwdrobnoustrojowy, lecz także jako związek wiążący i usuwający żelazo, mangan, amoniak i siarkowodor z wody [40].

6. Zastosowanie ozonu w terapii

Zastosowanie ozonoterapii w stomatologii rozpoczęło się wkrótce po II wojnie światowej, pomimo braku nowoczesnych urządzeń do wytwarzania ozonu. Obecnie, dostępne są na rynku nowoczesne zestawy stomatologicznych generatorów ozonu pozwalające na precyzyjny i bezpieczny sposób aplikowania ozonu do konkretnego miejsca. W periodontologii leczone są zapalenia dziąseł i przyzębia, afty, opryszczki oraz kandydoza jamy ustnej. Właściwości bakteriobójcze ozonu wykorzystywane są zwłaszcza w stomatologii zachowawczej do leczenia próchnicy oraz zakażeń miazgi zęba. Zakażone i zleżające się rany w obrębie jamy ustnej również z powodzeniem leczone są przy użyciu ozonu, co jest stosowane w implantologii i chirurgii stomatologicznej [28].

W badaniach *in vitro*, z użyciem drobnoustrojów chorobotwórczych takich jak: *Enterococcus faecalis*, *Peptostreptococcus micros*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*, przygotowanych zarówno w postaci

zawiesiny jak i w postaci biofilmów, w modelu zakażenia korzenia zębowego, porównano skuteczność działania ozonu gazowego, wody ozonowanej, podchlorynu sodu (2,25% i 5,25%), diglukonianu chlorheksydyny (2%) i nadtlenu wodoru (3%), [25]. Znaczącą redukcję liczby patogennych drobnoustrojów w zawiesinach uzyskano po zastosowaniu ozonowanej wody o stężeniu ozonu do 5 µg/mL, jak również podchlorynu sodu i diglukonianu chlorheksydyny, natomiast gazowy ozon o stężeniu do 1 mg/mL i nadtlenek wodoru okazały się mniej skuteczne. W stosunku do drobnoustrojów w postaci biofilmów, aktywność ozonu gazowego i rozpuszczonego w wodzie była zależna od jego stężenia, gatunku badanego szczepu oraz czasu ekspozycji. Znamiennej redukcję liczby drobnoustrojów uzyskano dla wysokiego stężenia gazowego ozonu i podchlorynu sodu, już po 1 minucie działania. Ozonowana woda o wysokim stężeniu ozonu (20 µg/mL) oraz diglukonian chlorheksydyny prawie całkowicie redukowały liczbę komórek bakterii w biofilmach, podczas gdy nadtlenek wodoru był mniej skuteczny [15, 29].

W innych badaniach z wykorzystaniem modelu zakażonego kanału zębowego, porównano aktywność przeciwbakteryjną laseru KTP (potassium-titanyl-phosphate), gazowego ozonu oraz roztworu podchlorynu sodu (2,5%) i roztworu chlorku sodu (0,85%) wobec szczepu *E. faecalis* [34]. Zarówno gazowy ozon, jak i laser KTP wykazywały redukcję liczby komórek bakterii wynoszącą 2,0 i 1,8 log – odpowiednio, w stosunku do wyjściowej zawiesiny szczepu *E. faecalis* o gęstości 5,5 log, jednakże nie tak wysoką, jak grupa kontrolna z podchlorynem sodu, dla której zaobserwowano całkowitą redukcję liczby komórek szczepu. Gazowy ozon okazał się bardziej skuteczny niż laser KTP. Cardo i wsp. [21] przeprowadzili badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wody ozonowanej (24 mg/L ozonu) w modelu kanałów zębowych zakażonych szczepami *Candida albicans*, *E. faecalis* i zanieczyszczonych endotoksyną *Escherichia coli*. Zaobserwowano wysoki stopień redukcji liczby komórek *C. albicans* i *E. faecalis* w próbach pobranych bezpośrednio po irygacji ozonowaną wodą, natomiast w próbach pobranych po 7 dniach od ponownego wypełnienia kanałów zębowych ozonowaną wodą, zaobserwowano znaczny wzrost liczby komórek drobnoustrojów. Wobec endotoksyny *E. coli*, woda ozonowana nie wykazywała aktywności neutralizującej. Aktywność przeciwdrobnoustrojową ozonowanej wody (2 lub 4 mg/L ozonu) wobec szczepu *C. albicans* przedstawiono również w badaniach Arita i wsp. [6]. Wystarczył 1-minutowy czas kontaktu, aby w znacznym stopniu zredukować liczbę komórek drobnoustroju z powierzchni akrylowej protezy dentystycznej.

Przeciwbakteryjna aktywność gazowego ozonu określana była również wobec szczepu *Streptococcus mutans*, który może stanowić zagrożenie w jamie ustnej

w przypadku pozostałości pod elementami sztucznego uzębienia [41]. Zastosowanie ozonu dało wysoki poziom redukcji liczby komórek *S. mutans* po czasie kontaktu wynoszącym 80 sekund.

W wiarygodnych bazach piśmiennictwa jest zaskakująco mało prac, które w sposób zgodny z paradygmatem Evidence-Based Medicine (EBM) oceniają przydatność zastosowania ozonu w leczeniu zakażeń w chirurgii, zarówno pierwotnych jak i wtórnych, w tym jatrogennych. Jest to szczególnie zdumiewające, jeżeli wziąć pod uwagę znane od około 100 lat bakteriobójcze działanie ozonu oraz fakt, że pierwsze doniesienie pokazujące dobroczynne działanie ozonu w przypadkach powikłanych zakażeniem otwartych, wojennych złamań kości, zostało opublikowane przez majora *Stokera* w czasopiśmie *Lancet* już we wrześniu 1916 r. [52].

W ostatnich latach pojawiły się jednak prace kliniczne, których wyniki potwierdzają skuteczność ozonoterapii w odniesieniu do leczenia i profilaktyki zakażeń w ortopedii i traumatologii narządu ruchu. Dotyczą one leczenia przewlekłych ran, owrzodzeń tkanek miękkich, zakażonych ran pourazowych oraz profilaktyki zakażeń szpitalnych po planowych, rekonstrukcyjnych zabiegach ortopedycznych [10, 12, 13, 32, 54, 60]. Pojawiły się również prace kliniczne, w których donosi się o skuteczności bakteriobójczej ozonu w leczeniu zapalenia otrzewnej i ropnych zapaleń w obrębie miednicy małej [35, 58].

Zaobserwowano również korzystne efekty stosowania płukania płynami ozonowanymi w profilaktyce zakażeń zarówno w ortopedii jak i chirurgii ogólnej [1, 9]. Brak natomiast przekonujących, zgodnych z paradygmatem EBM, klinicznych dowodów na to, że jest to metoda przydatna w leczeniu różnych innych chorób – dotyczy to zwłaszcza podawania parenteralnego mieszaniny tlenowo-ozonowej w terapii takich chorób, jak: miażdżycy naczyń obwodowych, niektóre nowotwory, choroba zwyrodnieniowa stawów, dyskopatie lędźwiowe, dystrofie współczulne [2, 18, 20, 39, 51]. W powyższym zakresie ozonoterapia stosowana jest nadal w zasadzie empirycznie, wymaga dalszych badań i należy ją stosować z dużą ostrożnością.

Duże nadzieje roją pojawiające się ostatnio prace eksperymentalne z wykorzystaniem modeli zwierzęcych (badania na szczurach), które prowadzone zgodnie z zasadami paradygmatu EBM udowadniają celowość stosowania parenteralnie ozonu celem leczenia wywołanych doświadczalnie zapaleń nerek lub otrzewnej [20, 22, 50].

Ozon może być stosowany zewnętrznie w postaci olejowych preparatów ozonowanych produkowanych na bazie oliwy z oliwek tzw. pierwszego tłoczenia. Są to preparaty o uznanej skuteczności w terapii zakażeń skórnych i terapii przewlekłych ran, np.: odleżyn i owrzodzeń podudzi w przebiegu zespołów pozakrzepowych [62]. Certyfikowany zgodnie z normami UE polski ozonowany preparat olejowy jest dostępny na

rynku od 2001 r. Ozonowaniu można poddać również olej słonecznikowy. *Sechi* i wsp. [46] zastosowali taki właśnie preparat w celu wykazania jego bakteriobójczej aktywności wobec różnych szczepów bakterii, takich jak *Mycobacteria*, wielooporne Gram-dodatnie (gronkowce, paciorkowce, enterokoki) i Gram-ujemne bakterie (*P. aeruginosa* i *E. coli*), izolowane z różnych miejsc i materiałów (oczy, skóra, ropa, kał). Na podstawie określonych wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration) stwierdzono bakteriobójczą aktywność ozonowanego oleju wobec wszystkich badanych szczepów. Wartości MIC (z wyłączeniem *Mycobacterium*) mieściły się w granicach: 1,18–9,5 mg/mL. Badania wykazały, że spośród badanych szczepów najbardziej wrażliwe były *Mycobacterium* spp. (MIC: 0,95–2,37 mg/mL).

Stosowanie ozonu metodami nieinwazyjnymi takimi, jak: kąpiele tlenowo-ozonowe, płukania płynami ozonowanymi i aplikowanie olejowych preparatów ozonowych spełnia w swej istocie założenia typowe dla fizykoterapii, w której wykorzystuje się przede wszystkim jego działanie antybakteryjne.

7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ozonu, oceniana *in vitro*

W Zakładzie Antybiotyków i Mikrobiologii Narodowego Instytutu Leków przeprowadzono w współpracy z Zakładem Rehabilitacji Oddziału Fizjoterapii II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego badania aktywności bakteriobójczej i grzybobójczej wody ozonowanej oraz mieszaniny tlenowo-ozonowej [11, 14]. Starano się przeprowadzić ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej zgodnie z metodą opracowaną w odpowiednich normach europejskich (EN). Badania przeprowadzono zgodnie z normami: PN-EN 1040: Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Ilościowa zawiesinowa metoda określania podstawowego działania bakteriobójczego chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych (Faza 1) i PN-EN 1275: Ilościowa zawiesinowa metoda określania podstawowego działania grzybobójczego lub podstawowego działania bójczego wobec grzybów drożdżopodobnych chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych (faza 1).

W badaniach zastosowano szczepy testowe bakterii: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* NCTC 10538, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, a także izolowane z rozmaitego materiału od chorych, szczepy kliniczne, po 10 izolatów z następujących grup: *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* + *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus* (MRSA), *P. aeruginosa*. Ponadto użyto wzorcowe szczepy grzybów: *Candida albicans* ATCC 10231 i *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Stężenie ozonu w wodzie ozonowanej oznaczano metodą miareczkowania. Hodowle bakteryjne, na które działano ozonem prowadzono w formie planktonowej i w postaci biofilmów (tylko szczepy *S. aureus* i *P. aeruginosa*). Szczepy grzybów badano tylko w formie planktonowej.

W badaniach wody ozonowanej wykazano jej bardzo dużą aktywność biobójczą – wymagany przez normy czas kontaktu niezbędny do redukcji liczby komórek bakterii (o 5 log) i wegetatywnych komórek grzybów (o 4 log) jest bardzo krótki – 30 s lub 1 min. Natomiast wobec zarodników *A. brasiliensis*, tak krótki okres kontaktu okazał się niewystarczający. W badaniach gazowej mieszaniny tlenowo-ozonowej wykazano odpowiednią aktywność wobec bakterii w postaci planktonowej, ale dopiero po czasie kontaktu wynoszącym 2 minuty, jednakże należy zaznaczyć, że krótszego czasu nie można było zastosować z przyczyn technicznych.

W części doświadczalnej dotyczącej biofilmów bakteryjnych, biorąc pod uwagę wymagania norm PN-EN 1040 i PN-EN 1275, wykazano, że ozonowana woda może być uznana jako skuteczny środek niszczący biofilm bakteryjny. Biofilm *S. aureus* był bardziej wrażliwy na ozonowaną wodę (czas kontaktu 30 s) niż biofilm *P. aeruginosa*. Gazowa mieszanina tlenowo – ozonowa okazała się nieskuteczna w niszczeniu biofilmów bakteryjnych.

8. Posumowanie

Biorąc pod uwagę piśmiennictwo związane z badaniami aktywności przeciwdrobnoustrojowej, dzisiejszy stan wiedzy pozwala na traktowanie ozonoterapii jako metody opartej na faktach (EBM) w zakresie jej bakteriobójczych i grzybobójczych zastosowań. Inne zastosowania tej metody fizykalnej pozostają nadal, pomimo wielu badań, dyskusyjne.

Badania podstawowe i kliniczne nadal trwają, chociaż liczba ich nie jest zbyt wysoka. Obecnie (stan na 20 lipca 2012 r.) w największej, światowej medycznej bazie literaturowej PubMed, pod hasłem „ozone therapy” znajdowało się 2240 doniesień naukowych. Co zadziwiające wśród obowiązujących w PubMed słów kluczowych Medical Subject Headings (MeSH) nie ma do dzisiaj kategorii odnoszących się do stosowania ozonu jako czynnika bakteriobójczego i zastosowań ozonoterapii w chirurgii.

Piśmiennictwo

1. Agaev B.A., Agaev R.M., Gasymov R.Sh.: The method of biliary tracts drainage of patients with biliodigestive anastomosis at obstructive jaundice and acute cholangitis. *Khirurgiia (Mosk.)*, **1**, 18–22 (2011)

2. Al-Jaziri A.A., Mahmoodi S.M.: Painkilling effect of ozone-oxygen injection on spine and joint osteoarthritis. *Saudi Med. J.* **29**, 553–557 (2008)
3. Antoszewski Z., Madej P.: Ozonoterapia i jej zastosowanie w medycynie. α-Medica Press Bielsko Biała, 1997
4. Antoszewski Z., Skowron J., Wachowski J., Urbańczyk L., Kulej J.: Krótka historia zastosowania ozonoterapii po raz pierwszy w polskiej medycynie oraz techniki stosowania ozonu u chorych oparzonych. *Medycyna 2000*, 23–24 (1992)
5. Antoszewski Z., Wieczorkiewicz B., Mandat K., Madej P., Gubała-Kacała M.: Podawanie mieszaniny tlenowo-ozonowej do bocznej komory mózgu w leczeniu powikłań po wszczepieniu zastawki Pudenza (w) Ozonoterapia i jej zastosowanie w medycynie, red. Antoszewski Z., Madej P., Bielsko Biała, α-medica press, 1997
6. Arita M., Nagayoshi M., Fukuizumi T., Okinaga T., Masumi S., Morikawa M., Kakinoki Y., Nishihara T.: Microbial efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral Microbiol. Immunol.* **20**, 206–210 (2005)
7. Aubourg P.: Colibacillose Aigue, colibacillose Chronique: ameliorations Kliniki par notabli un traitement d'ozonowa. *Bull. Mem. Paris*, **140**, 644–645 (1936)
8. Bialka K.L., Demirci A.: Efficacy of aqueous ozone for the decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on raspberries and strawberries. *J. Food Prot.* **70**, 1088–1092 (2007)
9. Białoszewski D.: Zastosowanie ozonoterapii śródoperacyjnej jako profilaktyki zakażeń w chirurgii narządu ruchu ze szczególnym uwzględnieniem alloplastyk stawowych – doniesienie wstępne. *Ortop. Traum. Rehab.* **5**, 6, 781–786 (2003)
10. Białoszewski D.: Zastosowanie terapii ozonem do leczenia zakażeń w obrębie narządu ruchu (w) Leczenie zakażeń kości, red. Gaździk T., Urban & Partner, 2004, s. 411–422
11. Białoszewski D., Bocian E., Bukowska B., Czajkowska M., Sokół-Leszczynska B., Tyski S.: Antimicrobial activity of ozonated water. *Med. Sci. Monitor*, **16**, MT71–75 (2010)
12. Białoszewski D., Kowalewski M.: Przydatność miejscowych, głębokich insuflacji mieszaniną ozonowo-tlenową w profilaktyce i leczeniu zakażeń w obrębie narządów ruchu. *Ortop. Traum. Rehab.* **3**, **4**, 552–556 (2001)
13. Białoszewski D., Nowak P., Michalski P.: Przydatność terapii ozonem w leczeniu przewlekłych i pourazowych patologii w obrębie narządu ruchu. *Ortop. Traum. Rehab.* **4**, 47–49 (2000)
14. Białoszewski D., Pietruczuk-Padzik A., Kalicinska A., Bocian E., Czajkowska M., Bukowska B., Tyski S.: Activity of ozonated water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Med. Sci. Monitor*, **17**, BR339–344 (2011)
15. Bocci V.: Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br. J. Biomed. Sci.* **56**, 270–279 (1999)
16. Bocci V.: Oxygen-ozone therapy. A critical evaluation. *Kluwer Acad. Publ.* 2002
17. Bocci V.: Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **216**, 493–504 (2006)
18. Bonetti M., Fontana A., Martinelli F., Andreula C.: Oxygen-ozone therapy for degenerative spine disease in the elderly: a prospective study. *Acta Neurochir Suppl.* **108**, 137–142 (2011)
19. McCabe E.: The abbreviated history and suppression of ozone therapy in the USA. McCabe, 1994
20. Caliskan B., Guven A., Ozler M., Cayci T., Ozcan A., Bedir O., Surer I., Korkmaz A.: Ozone therapy prevents renal inflammation and fibrosis in a rat model of acute pyelonephritis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **71**, 473–480 (2011)
21. Cardoso M.G., de Oliveira L.D., Koga-Ito C.Y., Jorge A.O.: Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus*

- faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **105**, e85–91 (2008)
22. Chen H., Xing B., Liu X., Zhan B., Zhou J., Zhu H., Chen Z.: Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. *Eur. J. Pharmacol.* **581**, 306–314 (2008)
 23. Emer Z., Akbas M.Y., Ozdemir M.: Bactericidal activity of ozone against *Escherichia coli* in whole and ground black peppers. *J. Food Prot.* **71**, 914–917 (2008)
 24. Hertst R.F.: German law embraces alternative medicine. *New Scientist Magazine*, **3**, 256–258 (1997)
 25. Huth K.C., Quirling M., Maier S., Kamereck K., Alkhayer M., Paschos E.: Effectiveness of ozone against endontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int. Endod. J.* **42**, 3–13 (2009)
 26. Huttunen K., Kauhanen E., Meklin T., Vepsäläinen A., Hirvonen M.R., Hyvärinen A., Nevalainen A.: The effect of ozonization on furniture dust: microbial content and immunotoxicity in vitro. *Sci. Total. Environ.* **408**, 2305–2311 (2010)
 27. Ikonomidis S., Tsaousis P., Fyntanis A., Iliakis E.M.: New data regarding the use of ozone therapy in the former Soviet Union countries. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia*, **4**, 40–43 (2005)
 28. Iwanek P.: Biologiczne podstawy działania ozonu na florę jamy ustnej. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, **53**, supl. 3, 41–44 (2007)
 29. Jacobs i wsp.: Untersuchung über zwischenfälle und typische komplikationen in der ozon-sauerstoff-therapie. *Ozo Nachrichten*, **1**, 5 (1982)
 30. Kenworth Ch.J.: Ozone. Florida Medical Association, 1885
 31. Kim C., Hung Y.C.: Inactivation of *E. coli* O157:H7 on blueberries by electrolyzed water, ultraviolet light, and ozone. *J. Food. Sci.* **77**, M206-11 (2012)
 32. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, Park YM. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J. Korean Med. Sci.* **24**, 368–74 (2009)
 33. Koseki S., Isobe S.: Effect of ozonated water treatment on microbial control and browning of iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Food Prot.* **69**, 154–160 (2006)
 34. Kuştarci A., Sümer Z., Altunbaş D., Koşum S.: Bactericidal effect of KTP laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with gaseous ozone: an *ex vivo* study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **107**, e73–79 (2009)
 35. Lelianov AD, Budrin VA, Novikov AS, Guseva ED, Nesterov AA, Kirsov PP. [Optimization of the treatment of stomach ulcer in patients subjected to perforated gastroduodenal ulcer closure], *Eksp. Klin. Gastroenterol.* **5**, 81–85 (2007)
 36. Lenartowicz L.: Nowa najwszechstronniejsza metoda szybkiej sterylizacji niskotemperaturowej – 3M™ Optreoz™ 125-Z. *Zakażenia*, **3**, 18–21 (2012)
 37. Macauley J.J., Quiang A., Adams C.D., Surampalli R., Mormile M.R.: Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone. *Water Res.* **40**, 2017–2026 (2006)
 38. Mahapatra A.K., Muthukumarappan K., Julson J.L.: Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 447–461 (2005)
 39. Masini M., Calaça A.: Minimally invasive treatment for refractory low back pain, targeted by epidural endoscopy with O(2)/O(3) and steroid therapy. *Acta Neurochir. Suppl.* **108**, 33–37 (2011)
 40. Muszański R.: Zastosowanie technologii ozonowania w przemyśle spożywczym i napojowym. *Agro. Przemysł.* **3**, 27–29 (2007)
 41. Polydorou O., Pelz K., Hahn P.: Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding system. *Eur. J. Oral Sci.* **114**, 349–353 (2006)
 42. Ponikowska I., Ferson D.: Nowoczesna medycyna uzdrowiskowa. MediPress, Wyd. I, Warszawa, 2009
 43. Rokitsanski O., Steiner J., Trubel W., Viebahn R., Washütt J.: Die ozontherapie bei peripheren i arteriellen durchblutungs-strörungen, Klinik i biochemische und blutgasanalytische untersuchung. Wasser IOA Ozon- Weltkongress, Berlin, 1981, s. 53–75
 44. Rozporządzenie Ministra Środowiska z 17.12.2008 r. „w sprawie dokonywania oceny poziomów substancji w powietrzu” (w): Dz.U. 2009, nr 5, poz. 31.
 45. Rubin M.B.: The history of ozone. The Schönbein period, 839–1868, *Bull. Hist. Chem.* **26**, 40–56 (2001)
 46. Sechi L.A., Lezcano I., Nunez N., Espim M., Duprè I., Pinna A., Molicotti P., Fadda G., Zanetti S.: Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). *J. Appl. Microbiol.* **90**, 279–284 (2001)
 47. Selma M.V., Beltran D., Allende A., Chacon-Vera E., Gil M.I.: Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in shredded lettuce and water. *Food Microbiol.* **24**, 492–499 (2007)
 48. Selma M.V., Beltran D., Chacon-Vera E., Gil M.I.: Effect of ozone on the inactivation of *Yersinia enterocolitica* and the reduction of natural flora on potatoes. *J. Food Prot.* **69**, 2357–2363 (2006)
 49. Skalska K., Ledakowicz S.: Rozwój dezynfekcji chemicznej – perspektywy wykorzystania ozonu. *Laboratorium*, **10**, 10–13 (2007)
 50. Souza Y.M., Fontes B., Martins J.O., Sannomiya P., Brito G.S., Younes R.N., Rasslan S.: Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats. *Clinics (Sao Paulo)*, **65**, 195–202 (2010)
 51. Steppan J., Meaders T., Muto M., Murphy K.J.: A metaanalysis of the effectiveness and safety of ozone treatments for herniated lumbar discs. *J. Vasc. Interv. Radiol.* **21**, 534–548 (2010)
 52. Stoker G.: The surgical uses of ozone. *Lancet*, II **21**, 712 (1916)
 53. Szaflik J.: Ozon – wróg czy przyjaciel? *Biuletyn Informacyjny Stowarzyszenia Retina AMD Polska*, **1(4)**, (2001)
 54. Shah P, Shyam AK, Shah S. Adjuvant combined ozone therapy for extensive wound over tibia. *Indian. J. Orthop.* **45**, 376–379 (2011)
 55. Szmurło W., Ponikowska I.: Balneoozonoterapia – własna metoda lecznicza, metodyka, stosowanie. *Balneol. Pol.* **40**, 38–43 (1998)
 56. Tesla N., Johnston B.: My inventions: The autobiography of Nicola Tesla, Hart Brothers, First edition, Williston, Vermont, 1982
 57. Travagli V., Zanardi I., Valacchi G., Bocci V.: Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators Inflamm.* 2010:610418. Epub 2010 July 4. doi: 10.1155/2010/610418 (2010)
 58. Ventskovski ABM, Zhegulovich VG, Marchenko VV. [Surgical treatment of acute purulent inflammatory processes in the pelvic area] *Lik Sprava*, **5–6**, 76–82 (2007)
 59. Vurma M., Pandit R.B., Sastry S.K., Yousef A.E.: Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and natural microbiota on spinach leaves using gaseous ozone during vacuum cooling and simulated transportation. *J Food Prot.* **72**, 1538–1546 (2009)
 60. Wainstein J, Feldbrin Z, Boaz M, Harman-Boehm I. Efficacy of ozone-oxygen therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Technol Ther.* **13**, 1255–1260 (2011)
 61. Wolff A.: Eine medizinische verwendbarkeit des ozons. *Dtsch. Med. Wschr.* 311 (1915)
 62. Wolff H.H.: Das medizinische ozon. Verlag für Medizin Heidelberg, 1979