

Perspectieven van ozonbehandelingen ter bestrijding van schadelijke organismen op plantaardig uitgangsmateriaal

Literatuurstudie

Ir. L. van den Brink
Ing. H.P. Versluis

© 2005 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit onderzoek is financieel mogelijk gemaakt door: Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit in het kader van programma 388 "Gezond en vitaal uitgangsmateriaal voor de biologische en andere vormen van duurzame landbouw".

Projectnummer: 510477

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Business-unit Akkerbouw, Groene ruimte en Vollegrondsgroente

Adres : Edelhertweg 1
: Postbus 430, 8200 AK Lelystad
Tel. : 0320 - 29 11 11
Fax : 0320 - 23 04 79
E-mail : infoagv.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
2 BESCHIKBARE INFORMATIE OVER OZON	9
2.1 Algemeen.....	9
2.2 De karakteristieken van ozon	9
2.3 Effect op schimmels	10
2.4 Effect op insecten.....	14
2.5 Effect op bacteriën	15
3 BESPREKING VAN DE LITERATUURGEGEVENS	17
4 TOELAATBAARHEID VAN OZONBEHANDELINGEN	19
5 CONCLUSIE.....	21

Samenvatting

In verschillende gewassen komen op het uitgangsmateriaal schadelijke organismen voor die de kwaliteit nadelig beïnvloeden. In de biologische landbouw kunnen deze organismen niet met synthetische chemische middelen bestreden worden. Uit buitenlands onderzoek komt informatie beschikbaar waaruit blijkt dat er mogelijkheden zijn om schadelijke organismen te bestrijden met behulp van ozonbehandelingen. Om een inzicht te krijgen in de mogelijkheden die er eventueel zijn om met behulp van ozon de kwaliteit van het uitgangsmateriaal te verbeteren is een beperkte literatuurstudie uitgevoerd.

Uit het literatuuronderzoek komt naar voren dat ozonbehandelingen een hulpmiddel kunnen zijn om de aantasting van schimmels, bacteriën en insecten te beperken. Om de genoemde organismen te doden zijn meestal hoge concentraties ozon nodig. Deze concentraties kunnen alleen in afgesloten ruimten toegediend worden, omdat ze te hoog zijn om er mensen aan bloot te stellen. Met behulp van lage concentraties ozon kan de uitbreiding van schimmels en bacteriën tijdens de bewaring van uitgangsmateriaal geremd worden. De bestrijding of remming van de schadelijke organismen zal beter zijn, naarmate deze zich meer oppervlakkig op het uitgangsmateriaal bevinden.

De bestrijdingseffecten die in de literatuur gerapporteerd wordt, variëren sterk. Er zijn voorbeelden waarbij een goed bestrijdingseffect werd bereikt, maar ook voorbeelden waarin het resultaat tegenviel. Dit laatste was vooral het geval bij de toepassing van lage concentraties ozon gedurende een te korte periode. Het effect hangt ook af van het type schimmel of bacterie, terwijl ook de toestand van het uitgangsmateriaal een rol speelt. Zo bleek bij zaad het effect beter te zijn wanneer het zaad een hoger vochtgehalte had. Bij insecten zijn goede bestrijdingseffecten gemeten wanneer hoge concentraties ozon worden toegepast. Er zijn verschillen tussen insecten in gevoeligheid voor ozon.

Het hangt van het type uitgangsmateriaal af of er ook schade aan het uitgangsmateriaal zelf ontstaat. Beschadiging van zaden, zodanig dat de kiemkracht benadeeld wordt, lijkt niet snel op te treden indien er van uitgegaan wordt dat het zaad niet voorgeweekt hoeft te worden. Indien dit wel het geval is dan neemt de kans op een slechtere kiemkracht toe. Schade aan (aardappel)knollen lijkt eerder op te treden dan aan zaden. Er zijn voorbeelden dat de veldopkomst nadelig beïnvloed werd, maar ook voorbeelden, waarbij dit niet het geval en er wel sprake was van een goed bestrijdingseffect. Schade aan plantmateriaal kan vrij snel ontstaan, omdat ozon o.a. de waslaag en celmembranen kan beschadigen. Het plantmateriaal kan dan uitdrogings- en afstervingsverschijnselen gaan vertonen. In hoeverre ozonbehandelingen in praktijksituaties voldoende effect opleveren is niet duidelijk en dient nader onderzocht te worden. De meest perspectiefvolle toepassing bij uitgangsmateriaal lijkt een kortdurende behandeling te zijn, waarbij zaden of knollen (en mogelijk ook bollen) blootgesteld worden aan hoge concentraties ozon. Per combinatie van het type uitgangsmateriaal en het schadelijke organisme zal gezocht moeten worden naar een optimale toepassing waarbij enerzijds het bestrijdingseffect voldoende is en anderzijds de schade aan het uitgangsmateriaal beperkt blijft.

Met een aantal organisaties zijn contacten gelegd over de toelaatbaarheid van ozonbehandelingen. Hierover is echter nog onvoldoende duidelijkheid verkregen. Met name zal nagegaan moeten worden onder welke ARBO- en milieutechnische voorwaarden ozon kan worden toegepast en of ozonbehandelingen toegelaten kunnen worden in de biologische landbouw.

1 Inleiding

In verschillende gewassen komen op het uitgangsmateriaal schadelijke organismen voor die de kwaliteit nadelig beïnvloeden. In de biologische landbouw kunnen deze organismen niet met synthetische chemische middelen bestreden worden. Soms worden warmwaterbehandelingen toegepast, maar hieraan zitten ook nadelen. Uit buitenlands onderzoek komt informatie beschikbaar waaruit blijkt dat er mogelijkheden zijn om schadelijke organismen te bestrijden met behulp van ozonbehandelingen. Het doel van deze beperkte literatuurstudie is om op basis van de belangrijkste, recent beschikbaar gekomen literatuur een inzicht te krijgen in de mogelijkheden die er zijn om met ozon de kwaliteit van biologisch uitgangsmateriaal te verbeteren. Niet alleen voor de biologische, maar ook voor de gangbare landbouw kan de informatie van belang zijn. De literatuurstudie heeft in de eerste plaats tot doel een technische verkenning uit te voeren. Daarnaast is ook een eerste verkenning uitgevoerd naar toelatingsmogelijkheden van ozon. Bij het uitvoeren van de literatuurstudie kwam naar voren dat er meer literatuur beschikbaar is over ozonbehandelingen bij de bewaring van allerlei oogstproducten dan over ozonbehandelingen van uitgangsmateriaal. Toch is de informatie over toepassing van ozon tijdens de bewaring van producten wel meegenomen, omdat ook hieruit bruikbare gegevens kunnen komen over de effectiviteit van ozonbehandelingen, zowel met betrekking tot bestrijding van schadelijke organismen als met betrekking tot schade aan het uitgangsmateriaal. Het was niet mogelijk om in deze beperkte literatuurstudie alle beschikbare literatuur over ozon te behandelen.

2 Beschikbare informatie over ozon

2.1 Algemeen

Ozon wordt tot nu toe vooral toegepast in zwembaden en door waterbedrijven als desinfectiemiddel. Meer recente toepassingen zijn de behandeling van afvalwater, van recirculatie­water in de glastuinbouw, van mest en urine in de veehouderij, van water in koeltorens, van watersystemen in ziekenhuizen, het gebruik in aquaria en aquacultures, etc. Het gebruik van ozon bij de bewaring van fruit, groenten en uitgangsmateriaal is in het verleden wel onderzocht, maar het heeft tot nu toe geen grote opgang gemaakt. Voor de Tweede Wereldoorlog verschenen er reeds publicaties over de toepassing van ozon bij de bewaring van verschillende producten (geciteerd uit Skog & Chu, 2001). In verschillende landen is nu de belangstelling weer groeiende, m.n. vanwege het wegvallen van verschillende chemische middelen, zoals methylbromide bij de opslag van graan en zwaveldioxide bij de bewaring van druiven. Ook de toenemende wens van de consumenten om over meer verse producten te beschikken die daarnaast ook zo veel mogelijk vrij moeten zijn van residuen van chemische middelen, speelt een rol. Het blijkt dat er verschillende groepen onderzoekers in o.a. de VS, Canada, Spanje, Chili, Korea bezig zijn met ozon. Recent zijn er ook in Nederland oriënterende experimenten gestart met toepassing van ozon bij de bewaring van groenten en fruit. Daarnaast zijn er in het verleden proeven uitgevoerd waarin aardappelpootgoed en bloembollen gewassen werden met geozoneerd water.

2.2 De karakteristieken van ozon

Ozon is een instabiele verbinding van zuurstofatomen (O_3). Het degradatieproducten zijn zuurstof (O_2) en O . Ozon heeft een sterke oxiderende werking. De halfwaardetijd bedraagt 20 – 50 minuten in de atmosfeer en 1 – 10 minuten in water. Bij de toepassing van ozon ontstaan geen residuen.

Ozon is een kleurloos tot lichtblauw kleurend gas met een prikkelende geur die vergeleken kan worden met de geur die vrijkomt bij onweer of elektrische vonken. De geur is door de mens reeds te ruiken bij concentraties tussen 0,02 en 0,05 ppm. Er zijn generatoren op de markt waarmee ozon kan worden geproduceerd. Ozon kan worden toegepast als gas, maar ook als geozoneerd water. In de gasvorm worden sterk verschillende concentraties toegepast, van laag, d.w.z. lager dan 0,1 ppm tot zeer hoog, bijv. 2500 ppm. Ozon is in hoge concentraties erg gevaarlijk voor de mens. Langdurige blootstelling aan concentraties hoger dan 4 ppm is dodelijk. In Nederland geldt de norm van maximaal 0,06 ppm voor een normale blootstelling (8 uur per dag, 5 dagen per week). In ruimten met een concentratie van 0,3 ppm mag men niet langer dan een kwartier per dag verblijven. Genoemde waarden zijn de zgn. MAC-waarden (Maximaal Aanvaardbare Concentraties).

Ozon is een instabiel gas. In principe bestaat er explosiegevaar bij hoge temperaturen in de aanwezigheid van waterstof, ijzer, koper of chroom. In de praktijk zijn er echter geen gevallen bekend van explosies, met uitzondering van experimenten onder extreme omstandigheden.

Afhankelijk van het type generator kunnen er bij de productie van ozon ook NAI's (Negative Air Ions) vrijkomen: CO_4^- , OH^- , H_2O^- en O_2^- . Forney et al. (2001) vonden een bepaalde vorm van synergie tussen ozon en de NAI's bij de bestrijding van schadelijke organismen. Ze suggereren dat het van een aantal proeven die in de literatuur vermeld worden niet duidelijk is of zuiver ozon is gebruikt of dat het gaat om een combinatie van ozon met NAI's. Tegenstrijdige literatuurgegevens zouden hiermee verklaard kunnen worden.

Er wordt van uitgegaan dat bij de oxidatie door ozon de membranen van schimmels, bacteriën en insecten worden aangetast.

Ozon is in staat om ook allerlei vluchtige verbindingen te oxideren en kan daarom ook bij de bestrijding van geur gebruikt worden. Ook ethyleen wordt geoxideerd. Dit wordt dan ook wel toegepast in de bewaring om ethyleen gevoelige groenten en fruit beter te kunnen bewaren.

2.3 Effect op schimmels

Verreweg de meeste literatuur over ozon blijkt betrekking te hebben op de bestrijding van schimmels tijdens de bewaring van allerlei producten. In een beperkt aantal studies is ook onderzoek gedaan naar het gebruik van ozon op zaaizaad of op pootgoed. De beschikbare informatie is per gewas gerangschikt.

Gerst

Door Allen et al. (2003) is gekeken naar het effect van ozonbehandelingen bij gerstzaad. Een doding van 96% van de schimmelsporen (niet nader gespecificeerd welke) werd bereikt bij een dosis van 0,16 mg/gram gerst per minuut (tijdelijke concentratie van ca. 570 ppm) als de behandeling 5 minuten werd uitgevoerd bij een temperatuur van 20 °C en bij een vochtgehalte van de gerst van 30%. Bij een lager vochtgehalte was de doding minder: bij een vochtgehalte van 19% was de doding 81%. Ook bij lagere temperatuur was de doding minder: ca. 65% bij 0 °C tegen ca. 85% bij 20 °C (gemiddelde waarden van een aantal behandelingen). Verkorting van de behandelingsduur van 5 minuten naar 2 minuten met vervolgens het gedurende 15 minuten gesloten houden van de behandelingsruimte leverde bij gerst met een vochtgehalte van 30% ook een goed resultaat op: 99% doding. Een nadelig effect op de kieming van de gerst werd niet gevonden, zelfs niet na 10 minuten bij 570 ppm. Indien de behandeling 30 minuten duurde dan daalde het kiemingspercentage tot ca. 75%. Vastgesteld werd dat mycelium gevoeliger is dan sporen: 0,10 mg/gram gerst was wel voldoende voor doding van mycelium, maar niet voor het doden van sporen.

Graszaad

In China onderzochten Hsieh et al. (1998) het effect van ozon bij graszaad. Een behandeling met 0,24 ppm ozon(gas) gedurende 6 dagen, 4 uur per dag, gaf geen verbetering van de opkomst te zien. Het vochtgehalte van het zaad werd niet in de publicatie vermeld. Met ozon verzadigd water had een dodend effect op drie schimmels: *Bipolaris australiensis*, *Curvularia pallescens* en *Exserohilum rostratum*. De laatste was meer resistent (dikere wanden van de conidiën). Voor een complete doding van de conidiën van *Bipolaris australiensis*, *Curvularia pallescens* en *Exserohilum rostratum* was een behandelingsduur nodig van respectievelijk 10, 13 en 30 minuten.

Mais

In de VS hebben Kells et al. (2001) onderzoek gedaan naar het effect van ozon op *Aspergillus parasiticus* in maissilo's. De silo's bevatten ca. 9 ton mais. Bij een behandeling met 50 ppm ozon gedurende 3 dagen werd 63% reductie van het aantal levensvatbare conidiën vastgesteld. Een behandeling met 25 ppm ozon gedurende 5 dagen was niet effectief. In hetzelfde onderzoek werd ook het effect op insecten onderzocht. Hieruit bleek dat insecten gevoeliger zijn dan schimmels. Het vochtgehalte van het maiszaad tijdens de behandeling werd niet in de publicatie vermeld, maar het is waarschijnlijk dat het vochtgehalte op een niveau lag waarbij maiszaad normaliter wordt bewaard, beneden 16% vocht.

Rijst

Van Deynze (2004) heeft onderzoek gedaan aan de bestrijding van *Bakanae* in rijst met behulp van ozon. Hieruit kwam naar voren dat ozon alleen effectief was in voorgeweekt zaad en niet in droog zaad. In het droge zaad waren de sporen niet actief en daarom ongevoelig voor ozon. In dit onderzoek werd gewerkt met zaad dat vlak voor het zaaien op 20% vocht werd gebracht en dan werd er gedurende 24 uur een ozonbehandeling gegeven. De resultaten lieten een significante afname van de *Bakanae*-aantasting zien. Ozonbehandelingen waren minder effectief dan chlorine-behandelingen. De ozonconcentraties werden niet vermeld, maar waren waarschijnlijk laag. Uit informatie van het Rice Research Board blijkt dat de resultaten van ozon nogal wisselend waren en dat er bij hogere concentraties ook schade aan de veldopkomst mogelijk is.

Aardappel

In Canada heeft Spencer (2003) zeer uitgebreid onderzoek uitgevoerd naar het effect van ozonbehandelingen bij aardappelen. Het onderzoek richtte zich met name op de bewaring van aardappelen, maar in een aantal proeven is ook gekeken naar het effect op pootgoed. In bewaarcellen van 18 m³ werden aardappels behandeld met verschillende concentraties ozon (variërend van 0 tot 20 mg O₃/kg/uur;

omgerekend lag de maximaal bereikte concentratie op ca. 30 ppm). De behandelingen werden uitgevoerd bij 15 °C (simulatie van de pre-storage curing period). De behandelingsduur varieerde: 1 dag, 7 dagen en 21 dagen. Zowel de aantasting door *Rhizoctonia* als door *Fusarium* en zilverschurft werd gemeten. Daarnaast werd ook gekeken naar het gewichtsverlies van de knollen. In de eerste proef werd gewerkt met aardappelen met weinig ziekte-aantasting. Er werden slechts geringe effecten op de ziekte-aantasting vastgesteld en de auteur schrijft dit ook toe aan het lage aantastingsniveau. Er werden twee rassen gebruikt. Bij 1 ras nam het % *rhizoctonia* in geringe mate af wanneer de ozonbehandeling gedurende een lange periode werd toegepast (21 dagen versus 7 dagen). De ozonbehandelingen gaven wel een gewichtsverlies van de knollen te zien, waarbij de behandelingsduur belangrijker was dan de toegepaste concentratie. Het maximale gewichtsverlies bedroeg ca. 4%. Er trad echter nog geen verschrompeling op van de knollen en de marktwaarde werd dan ook niet negatief beïnvloed. Het gewichtsverlies werd toegeschreven aan beschadiging van de cellulaire membranen.

In andere proeven werden aardappels na 3 maanden bewaring bij 4 °C gedurende 1 dag behandeld met 10–20 mg O₃/kg/uur of met 200 ppm chloorine dioxide. Beide behandelingen hadden geen effect op de ziekte-aantasting. Echter ook in deze proeven was het aantastingsniveau van de ziekten gering, zodat er ook eigenlijk geen effect te verwachten was.

Spencer (2003) voerde ook proeven uit waarbij beschadigde aardappelknollen (ter simulatie van beschadigingen tijdens de oogst) geïnoculeerd werden met *Fusarium sambucinum*, *F. solani*, *Phytophthora infestans* en *Helminthosporium solani*. De verschillende ozonbehandelingen die direct hierna werden toegepast (oplopend tot 20 mg O₃/kg/uur gedurende 21 dagen) gaven geen reductie van de schimmelontwikkeling te zien. Uit deze proeven bleek duidelijk dat diepliggende infecties moeilijk met behulp van ozonbehandelingen bestreden kunnen worden. Proeven met reïncultures van *Fusarium* spp. *P. infestans* en *Sclerotinia* lieten zien dat er verschillen tussen de schimmelsoorten bestaat in gevoeligheid voor ozon. Myceliumgroei werd bij *Phytophthora* wel geremd, maar bij *Fusarium* niet. Ook de kieming van de sclerotiën van *Sclerotinia* werd geremd door ozon. Op de sporulatie had ozon bij geen van de genoemde schimmels een effect.

In andere proeven werd ozon toegepast als pre-plant behandeling (gedurende 1 of 2 dagen met 3 verschillende concentraties vlak voor het poten). De hoogste concentraties (20 mg O₃/kg/uur) gaven een reductie van het aantal opgekomen planten: van 90 à 95% tot ca. 75%. Geconstateerd werd dat ozon alleen geschikt is als een middel om ziekte-aantastingen op het knol-oppervlak te bestrijden op het moment van toepassing en dat het geen langdurige bescherming biedt tegen ziekten.

Hoewel Spencer op basis van de uitgevoerde proeven concludeert dat ozon beperkte mogelijkheden lijkt te hebben om tijdens de bewaring ziekten te beheersen, verwijst hij toch naar een toepassing van ozon in de praktijk die volgens hem mogelijk wel perspectiefvol zou kunnen zijn. Deze praktijktoepassing houdt in dat aardappelen voor het inschuren eerst gedurende 15 seconden blootgesteld worden aan 500 ppm ozon (deze concentratie ligt 4 à 5 keer zo hoog als de maximale concentraties die Spencer zelf in zijn proeven toepastte) behandeld worden. Daarna wordt er tijdens de bewaring zelf een concentratie van 2,5 ppm gehandhaafd.

Daniels-Lake et al. (1996) onderzochten ozon als kiemremmingsmiddel bij aardappel. Ozonconcentraties van 0,1 tot 4,0 ppm bleken niet effectief als kiemremmingsmiddel. Er was te weinig aantasting door schimmels aanwezig om het effect van ozon hierop vast te kunnen stellen. De toegepaste ozonbehandelingen hadden geen effect op de gehalten aan sucrose en reducerende suikers en ook niet op bakkleur.

Het bedrijf Ozone Solutions geeft op haar internetsite de resultaten van een behandeling van aardappelpootgoed waarop zilverschurft aanwezig was. Een behandeling met 1 ppm van eind december tot mei gaf een behoorlijke verlaging van het knoloppervlak dat aangetast was: bij de eerste beoordeling 2% van knoloppervlak aangetast tegen 37% bij de controle; bij de tweede beoordeling 7% tegen 17%. Een hogere concentratie van 2,5 ppm gaf een nog betere onderdrukking van de zilverschurft: bij de eerste beoordeling 1% en bij de tweede beoordeling 0% van het knoloppervlak aangetast. Bij deze hoge concentratie waren de knollen na afloop licht verbleekt. Er werd geen nadelig effect op de veldopkomst geconstateerd, ook niet na behandelingen met 2,5 ppm gedurende 4 maanden.

Het bedrijf O3Co past in de VS ozonbehandelingen toe op aardappelen. Bij het inschuren worden de aardappelen door een tunnel geleid waarin ze gedurende 20 seconden behandeld worden met 300 – 500 ppm ozon, terwijl ze daarna in de bewaring behandeld worden met 2,5 ppm ozon. Met deze behandeling claimt het bedrijf zowel een beperking van de aantasting door zilverschurft als een vernietiging van *Erwinia*-bacteriën.

Frazier (2004) rapporteert over onderzoek aan zilverschurft in aardappelen (1993 en 1994). Hierin zijn naast fungicide-behandelingen ook ozonbehandelingen onderzocht. De ozonbehandeling leverde geen reductie op van de aantasting door zilverschurft. De ozonbehandelingen zijn echter niet nader gespecificeerd.

Broccoli

Forney et al. (2003) deden onderzoek aan de bewaring van broccoli in cellen met lage concentraties ozon (0,2 en 0,7 ppm). De bewaartemperatuur was 12 °C en de relatieve luchtvochtigheid bedroeg 95-99%. Na 12 dagen werd bij beide doseringen in vergelijking met de onbehandelde een verminderde schimmelgroei vastgesteld. Bij 0,7 ppm was er echter te veel schade door uitdroging en verkleuring van de stengeluiteinden. Bij de hoogste concentratie van 0,7 ppm werd ook een verhoogde ademhaling gevonden evenals een hogere ethyleenproductie. Door het uitdrogen kwamen er teveel uitgedroogde bloemknoppen in het product voor. Als verklaring voor het gewichtsverlies wordt gegeven dat de cuticula wordt beschadigd door ozon. De auteurs verwijzen naar publicaties waarin microscopisch kleine barsten in de cuticula als gevolg van ozon-schade zijn vastgesteld.

Skog en Chu (2001) vonden bij de bewaring van broccoli een positief effect van een behandeling met 0,04 ppm ozon gedurende 21 dagen. Er trad minder vergeling van het product op. Wel waren de snijvlakken meer verbruind, maar dit was echter gemakkelijk weer te verwijderen.

Wortels

Liew et al. (1994) vonden in Canada bij de bewaring van wortels gedurende 8 dagen in ruimten met een concentratie van 60 ppm ozon een 50% reductie van de schimmelgroei (*Botrytis cinerea* Pers. en *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary). Wel werden er een aantal nadelige effecten gevonden: verhoogde ademhaling, elektrolytenverlies en heterogeenere kleur (sommige wortels sterker verbleekt dan anderen). De auteurs constateren dat ozon geen schimmeldodende werking heeft, maar wel in staat is om de schimmelgroei te beperken. Op basis van hun onderzoek stellen zij dat een ozonbehandeling van 15 ppm gedurende 8 dagen bij 2 °C enige bescherming tegen schimmelaantasting kan geven met een minimum aan fysische en fysiologische schade.

Forney et al. (2001) hebben dezelfde schimmels ook behandeld met combinaties van ozon en NAI's en stelden vast dat de schimmelgroei veel sterker beperkt werd dan bij de behandelingen met alleen ozon. Liew et al. vonden met 1 ppm bij 8 °C een reductie van de groei van *Botrytis cinerea* Pers. en *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary van respectievelijk 12 en 16%. Forney vond onder vergelijkbare omstandigheden een reductie van respectievelijk 69 en 57 % als een behandeling werd gebruikt van 0,1-0,5 ppm ozon in combinatie met 2×10^4 tot 7×10^4 NAI/cm³.

Kiwi

In Korea voerden Hur et al. (2003) onderzoek uit waarbij kiwi behandeld werd met ozon in water in een concentratie van 0,1 – 3,0 ppm. Bij een blootstellingsduur van 5 minuten stelden zij de LD95% vast voor een drietal schimmels: 0,81 ppm voor *Botryosphaeria dothidea*, 0,44 voor *Botrytis cinerea* en 0,38 voor *Diaporthe actinidiae* (*Phomopsis mali*). De auteurs concluderen dat ozonbehandelingen een ondersteunende maatregel kunnen zijn naast de fungicidebehandelingen om daarmee de schimmelgroei en de bewaarverliezen te beperken en de kwaliteit van de kiwi's langer op peil te houden.

Aardbeien

In Spanje vonden Nadas et al. (2003) een vertraging van de schimmelgroei (*Botrytis cinerea*) op aardbeien die gedurende 3 dagen bij 2 °C en 1,5 ppm ozon werden bewaard. In vergelijking met de onbehandelde leidde dit tot minder rot, een geringer gewichtsverlies en minder snel week worden van de aardbeien. Wel

vonden ze dat de aardbeien tijdelijk hun geur verloren. Dit laatste was het gevolg van de oxidatie van de vluchtige verbindingen door de ozon.

In onderzoek van Perez et al. (1999), eveneens uitgevoerd in Spanje, kregen aardbeien bij 2 °C en een relatieve luchtvochtigheid van 90% een ozonbehandeling van 0,35 ppm. Daarna werden ze bewaard bij 20 °C. Na 2 dagen bij 20 °C was er wel een positief effect van ozon: 15% minder rot. Echter na 4 dagen bij 20 °C kwam er op de met ozon behandelde partij zelfs meer *Botrytis cinerea* rot voor dan op de onbehandelde partij. Volgens de auteurs is een hogere concentratie nodig om een goed effect te bereiken, maar dit is volgens hen niet mogelijk vanwege het gevaar voor de mens. Andere effecten die gevonden werden: ozon gaf een lager anthocyaangehalte (na enige tijd bij 20 °C verdween dit effect echter weer) en daarnaast gaf ozon een hoger vitamine C-gehalte (3 keer zo hoog). Met betrekking tot het laatste veronderstellen de auteurs dat er bij de aardbeien in reactie op de ozonbehandeling een beschermingsmechanisme tegen oxidatie wordt geïnduceerd. Het aroma van de aardbeien werd wel nadelig beïnvloed door ozon (40% minder vluchtige esters die vrijkomen). De auteurs houden het voor mogelijk dat dit effect irreversibel is.

Perziken, sinaasappelen en druiven

In Amerika en Chili voerden Palou et al. (2001, 2002) onderzoek uit aan de bewaring van perziken, sinaasappelen en druiven. Zij komen tot de conclusie dat ozon geen goed alternatief is voor de fungicidebehandelingen die tot nu toe worden toegepast. De belangrijkste reden hiervoor is dat de meeste economisch belangrijke bewaarziekten ontstaan vanuit wondjes op de vrucht of vanuit latente infecties, terwijl bij een ozonbehandeling diepliggende infecties onvoldoende bestreden worden. Ozonbehandelingen kunnen wel een ondersteuning betekenen in het bestrijden van bewaarziekten. Het beperkt wel de schimmelgroei en het zorgt voor minder sporen in de bewaarruimten. Een ander voordeel is dat het de groei van schimmelvarianten die resistent zijn tegen de gebruikte fungiciden vertraagt. Perziken werden gedurende 4 weken bewaard bij 5 °C, 90% relatieve luchtvochtigheid en 0,3 ppm ozon. Bij alle schimmels werd gevonden dat de groei vertraagd werd door ozon. Bij *Monilinia fructicola* was dit effect significant; bij andere schimmels niet (*Botrytis cinerea*, *Mucor piriformis* en *Penicillium expansum*). Bij sinaasappelen zorgde een ozonbehandeling voor een week vertraging in het optreden van *Penicillium digitatum* en *P. italicum*. Bij druiven werd na 7 weken bewaring bij ozon gevonden dat het aantal met *Botrytis cinerea* geïnfecteerde druiven 0% bedroeg tegen 60% bij de onbehandelde.

Bij perziken werd na 5 weken bewaring in 0,3 ppm ozon wel waterverlies geconstateerd. Dit was bij één van de twee gebruikte rassen het geval. Waarschijnlijk wordt de huid van de perziken beschadigd door het gas. In druiven werd na 4 weken geen waterverlies gevonden.

Palou et al. (2003) hebben verder nog onderzoek verricht naar de penetratie van ozon in partijen fruit die op de gebruikelijke manier verpakt waren. Alleen in grote plastic kisten was de penetratie van ozon voldoende om een effect te bereiken. In het gebruikelijke verpakkingsmateriaal was er echter weinig tot geen effect van de ozonbehandeling merkbaar.

In Israël behandelden Sarig et al. (1996) druiven met hoge concentraties ozon (8 mg ozon per minuut op 2 kg druiven). De behandelingsduur liep op tot 30 minuten. Bij behandelingen van 20 minuten werd een aanmerkelijke afname geconstateerd in het aantal kolonies schimmels en bacterien op de druiven (reducties van ca. 40 kolonies naar ca. 5 per ml). Ook werden proeven uitgevoerd waarbij de druiven eerst behandeld werden met ozon en vervolgens werden geïnculeerd met *Rhizopus stolonifer*. Hieruit bleek dat de schimmel zich op de met ozon behandelde druiven aanmerkelijk minder snel ontwikkelde. Hieruit concludeerden de onderzoekers de ozonbehandeling resistentie induceerde tegen schimmelontwikkeling en verrotting. Ozonbehandeling is volgens de auteurs een mogelijke vervanger van de zwaveldioxide-begassing die nu in de praktijk wordt uitgevoerd. Bij langdurige blootstelling, langer dan 40 minuten, traden er wel beschadigingsverschijnselen op. Hierbij waren er wel rasverschillen.

Komkommer

Skog en Chu (2001) bewaarden komkommers bij 3 °C en voerden daarbij gedurende 17 dagen een behandeling uit met 0,04 ppm ozon. Bij 3 °C treedt er 'lage temperatuurbederf' op bij komkommers. De behandelde komkommers vertoonden minder rot, maar waren wel meer uitgedroogd dan de onbehandelde

komkommers. Ook werden op de komkommers minder pathogenen aangetroffen. Dit werd meer toegeschreven aan een verhoogde resistentie van de komkommer dan aan een dodend effect op de pathogenen. Het vochtverlies werd toegeschreven aan beschadiging van de cuticula. De auteurs concluderen dat de ozonbehandeling een veelbelovende maatregel kan zijn bij de bewaring van komkommers bij 3 °C, mits het uitdrogende effect geminimaliseerd kan worden.

Appel en peer

Skog en Chu (2001) bewaarden appels en peren bij 0 °C en pasten behandelingen toe met 0,4 ppm ozon gedurende 107 dagen. Ozon veroorzaakte een sterke daling van de ethyleenconcentratie (minder dan 2,0 µL/L tegen 25 µL/L na 107 dagen). Zowel bij appel als bij peer werden geen nadelige effecten op de kwaliteit gevonden. Er werden geen pathogenen bekeken.

Blauwe bes (Highbush blueberries)

Song et al. (2003) pastten gedurende 4 dagen behandelingen met 0,2 en 0,7 ppm ozon toe op blauwe bes bij 10 °C en een relatieve luchtvochtigheid van 95-98%. Daarna werden ze of 7 dagen bewaard in lucht of 4 weken bij 0 °C in CA (10 kPa CO₂/15 kPa O₂). Na de 7 dagen bewaring in lucht werd geen effect van de ozonbehandeling op de vermarktbaarheid vastgesteld. Na 4 weken CA-bewaring bleek de met ozon behandelde partij een betere vermarktbaarheid te hebben dan de niet met ozon behandelde partij (7% hoger). Er werd vlak na de ozonbehandeling een verhoogde ademhaling gevonden. Het aroma van de blauwe bes werd wel beïnvloed door ozon. Er werd meer ethanol geproduceerd, hetgeen duidt op verhoogde stress en veranderingen in het metabolisme.

2.4 Effect op insecten

Er is een beperkt aantal publicaties gevonden waarin verslag gedaan wordt van onderzoek waarin ozon werd gebruikt om insecten te bestrijden.

Maïs, granen, sojabonen

Volgens Kells et al. (2001) is in laboratoriumstudies vastgesteld dat een concentratie van 50 ppm gedurende 3 dagen voldoende is om de volwassenstadia van insecten die doorgaans in bewaarsilo's met graan voorkomen te doden. Onderzoek in silo's met ca. 9 ton maïs leverde op dat een behandeling van 3 dagen met 50 ppm een doding opleverde die hoger lag dan 90 %. Hierbij werd gekeken naar 3 insecten: larven van de Indian meal moth (*Plodia interpunctella* (Hübner)), de red flour beetles (*Tribolium castaneum* (Herbst)) in het volwassen stadium en de maïze weevils (*Sitophilus zeamais* (Motsch.)) eveneens in het volwassen stadium. Een concentratie van 25 ppm gedurende 5 dagen gaf vergelijkbare resultaten, behalve bij de larven van de Indian meal moth. Bij de laatste werd dan een doding van ca. 75% vastgesteld.

Mendez et al. (2003) refereren aan onderzoek van Strait (1998) waaruit blijkt dat ozonbehandelingen met 50 ppm ozon geen nadelig effect hebben op de kieming van maïs.

Eveneens in de VS hebben Leesch et al. (2003) onderzoek uitgevoerd naar het effect van ozon op de Indian mealmoth (*Plodia interpunctella* (Hübner)) en de confused flour beetle (*Tribolium confusum* (Jacquelin du Val)). Deze onderzoekers gebruikten gedurende 2 uur hoge concentraties (tot 10.000 ppm) in combinatie met verhoogde CO₂-concentraties (5 tot 6%) en vacuum. Ze vonden in alle stadia's van de insecten een dodend effect van ozon. De werking van ozon werd versterkt door verhoogde CO₂-concentraties.

Mendez et al (2003) hebben vooral gekeken naar de effecten van ozonbehandelingen op de kwaliteit van de producten. Uit hun onderzoek komt naar voren dat behandelingen met 50 ppm ozon gedurende 50 dagen geen nadelig effect hebben op het popvolume van maïs, de vetzuur- en aminozuursamenstelling van sojabonen, tarwe en maïs, de maaleigenschappen van tarwe en maïs, de bakeigenschappen van tarwe en de "stickiness" van rijst.

2.5 Effect op bacteriën

Er is een beperkte hoeveelheid literatuur beschikbaar over het effect van ozon op bacteriën.

Groenten en fruit

Fan et al. (2003) behandelden de bacteriën *Pseudomonas fluorescens* en *Erwinia carotovora* pv. *Caratovora* met 0,1 ppm ozon al dan niet in combinatie met 1,0 ppm NAI's (negative air ions). Beide bacteriën spelen in rol bij de bewaring van groenten en fruit. Daarnaast werd ook de bacterie *Escherichia coli* onderzocht, een bacterie die pathogeen kan zijn voor de mens. Ozon alleen was beperkt effectief in het doden van de bacteriën: 25 a 30% doding bij een behandelingsduur van 6 uur. De combinatie van ozon en NAI was veel effectiever: bij *Pseudomonas fluorescens* en *Erwinia carotovora* pv. *Caratovora* werd de levensvatbaarheid gereduceerd tot resp. 0,7% en 4%. De bacterie *Escherichia coli* bleek het meest immuun te zijn: de levensvatbaarheid kon slechts verlaagd worden tot 40% als de behandelingsduur werd verlengd tot 11 uur.

Liew et al. (1994) refereren aan onderzoek van Kashiwagi, waaruit bleek dat *Escherichia coli* gedood kon worden met 0,05 ppm gedurende 3 dagen; voor *Staphylococcus aureus* was 15 dagen nodig.

Aardappel

In 1993 en 1994 heeft het PAGV onderzoek uitgevoerd naar het gebruik van ozon in aardappelen om *Erwinia carotovora* susp. *Atroseptica* te bestrijden (Ridder, 1996). Een behandeling van beschadigde en met *Erwinia* geïnfecteerde knollen gedurende 8 minuten met geozoneerd water reduceerde het aantal bacteriën op de schil. De reductie liep uiteen van 40% tot 85%. Het aantal rotte knollen werd ook gereduceerd door de ozonbehandeling 55% tot 90%, afhankelijk van het ras/de partij. Geconcludeerd werd dat de behandeling met ozon wel effect had, maar dat dit effect niet afdoende was. De resultaten die geboekt werden met de twee chemische middelen die ook in dit onderzoek werden toegepast, waren duidelijk beter.

Spencer (2003) onderzocht het effect van ozonbehandelingen op *Erwinia*. Behandelingen met maximaal 20 mg O_3 /kg/uur (omgerekend tijdelijk maximaal ca. 100 ppm) gedurende 21 dagen bij 15 °C leverden geen duidelijke vermindering van de ziekte-aantasting op. De auteur geeft echter aan dat het aantastingsniveau dusdanig laag was, dat het ook moeilijk was om een effect aan te kunnen tonen.

Het bedrijf O3zone laat op internet resultaten zien van proeven met aardappelen. Behandelingen met 3200 a 3600 ppm gedurende 25 à 38 seconden gaven een doding van meer dan 90% van *Erwinia carotovora*. Ook een behandeling van 18 seconden met 700 ppm gaf vergelijkbare resultaten. Ook proeven waarin geozoneerd water (8,0 ppm) over de knollen werd gespreoid, gaven goede resultaten: ca. 98% doding.

Luzerne

Fett (2004) deed onderzoek aan het elimineren van de bacteriën *Escheichia coli* 0157:H7 en *Listeria monocytogenes* op luzernezaad. De chlorine-behandelingen die hiervoor effectief waren, hebben ernstige nadelen voor de mensen die het moeten toepassen en hebben daarnaast ook negatieve milieu-aspecten. Rajkowski and Rice (2003) gebruikten geozoneerd water voor het doden van bacterien op luzernezaad. In deze proeven werd geen doding gerealiseerd.

3 Bespreking van de literatuurgegevens

Effect op schimmelziekten.

Uit de bestudeerde literatuur komt naar voren dat ozon toegepast in lage concentraties (0,3 ppm en lager) alleen een vertragend of stabiliserend effect op de ontwikkeling van schimmels heeft. Voor doding van schimmels zijn (veel) hogere concentraties nodig. Deze zijn te hoog om als mens mee in aanraking te komen. Ook bij hoge concentraties wordt meestal geen schimmeldoding van 100% bereikt, maar de aantasting kan wel aanzienlijk teruggedrongen worden. Het effect is afhankelijk van het product/plantmateriaal, van de hoedanigheid van het plantmateriaal (o.a. vochtgehalte), van de schimmelsoort, van het stadium waarin de schimmel verkeert, van de bereikbaarheid van de schimmel (in het plantmateriaal en onder verontreinigingen (grond, organisch materiaal), van de ozonconcentratie, van de behandelingsduur, het al dan niet voorkomen van NAI's (Negative Air Ions) en van de omstandigheden waarbij ozon wordt toegepast (temperatuur, relatieve luchtvochtigheid). Infecties die diep in het plantmateriaal zitten, worden niet of moeilijk bestreden. De meest perspectiefvolle toepassing van ozon lijkt te zijn het gedurende een korte periode (korter dan 1 minuut) bloot stellen aan zeer hoge concentraties ozon (500 ppm en hoger), eventueel gevolgd door bewaring bij een lage concentratie ozon. Een dergelijke behandeling zal het meest perspectief bieden bij schimmels die voornamelijk oppervlakkig op het uitgangsmateriaal zitten. Bij zaden, knollen en mogelijk ook bij bollen zou een dergelijke behandeling een positief effect kunnen opleveren. Bij plantmateriaal is waarschijnlijk de fytoxische schade te groot.

Effect op insecten

Er zijn geen literatuurgegevens gevonden van onderzoek waarin geprobeerd werd om insecten te bestrijden door blootstelling aan lage concentraties ozon (0,3 ppm en lager). Met hoge concentraties ozon (50 ppm en hoger) kunnen insecten goed bestreden worden. Een bestrijding van ruim 90% is bij verschillende insecten mogelijk, ook onder praktijkomstandigheden. Er zijn verschillen tussen de insecten in gevoeligheid. Ook de mate waarin de insecten bereikbaar zijn in het uitgangsmateriaal zal sterk bepalend zijn voor het effect.

Effecten op bacteriën

Evenals bij schimmelziekten hebben lage concentraties ozon (0,3 ppm of lager) bij de bestrijding van bacteriën een beperkt effect. Indien ozon wordt gecombineerd met NAI's kan het bestrijdingseffect mogelijk verbeterd worden. Bij hoge concentraties die tijdens een korte periode worden toegepast, wordt een beter bestrijdingseffect verkregen. Er zijn verschillen tussen bacteriën in gevoeligheid voor ozon. Naarmate de bacteriën zich meer oppervlakkig op het uitgangsmateriaal bevinden, mag een beter effect verwacht worden.

Schade aan het bewaarproduct of het plantaardig uitgangsmateriaal

Zaden kunnen blijkbaar veel ozon verdragen voordat er een daling van de kiemkracht optreedt, vaak meer dan die nodig is voor het bestrijden van schimmels, insecten en bacteriën. Dit geldt echter het duidelijkst voor zaad met een laag vochtgehalte (16% en lager). In situaties dat het voor het effect op het schadelijke organisme nodig is om het zaad voor te weken, kan er wel een negatief zijn op de kiemkracht. Dit zal ook samenhangen met de lengte van de periode dat het zaad vochtig blijft.

Schade aan (aardappel)knollen lijkt eerder op te treden dan aan zaden. Er zijn voorbeelden dat de veldopkomst nadelig beïnvloed werd, maar ook voorbeelden, waarbij dit niet het geval was en er wel sprake was van een goed bestrijdingseffect. Schade aan plantmateriaal kan vrij snel ontstaan, omdat ozon o.a. de waslaag en celmembranen kan beschadigen. Het plantmateriaal kan dan uitdrogings- en afstervingsverschijnselen gaan vertonen. Het zal van het plantmateriaal afhangen in hoeverre groeipunten ook beschadigd kunnen worden.

4 Toelaatbaarheid van ozonbehandelingen

Op 22 november 2004 zijn de belangrijkste resultaten van het literatuuronderzoek gepresenteerd aan de Werkgroep Open Teelten van Biologica. De reactie was redelijk terughoudend, met name in verband met de veiligheidsrisico's die gelopen worden bij de toepassing van ozon. Dit had vooral betrekking op de toepassing van ozon bij de bewaring van bijv. aardappelpootgoed op het bedrijf van de teler. Over de toepassing door gespecialiseerde bedrijven werd genuanceerder gedacht. Een tweede bezwaar tegen ozonbehandelingen was dat ozon niet selectief werd, waarbij dus niet alleen de schadelijke organismen bestreden worden maar ook de eventuele antagonisten.

Er is eveneens contact geweest met Biologica over de vraag of ozonbehandelingen op biologisch uitgangsmateriaal toegelaten zijn of toegelaten kunnen worden. Deze vragen konden echter voor de afsluiting van deze studie niet beantwoord worden.

Er is ook contact opgenomen met de Commissie Toelating Bestrijdingsmiddelen (CTB) om duidelijkheid te krijgen over de toelaatbaarheid van ozon. Op dit moment is het niet duidelijk of de toepassing van ozon als een gewasbeschermingsmiddel-toepassing of als een biocide-toepassing gezien moet worden. Is het een biocide-toepassing dan is het alleen nodig dat voldaan wordt aan eisen in verband met milieubelasting, arbeidsveiligheid en volksgezondheid. Indien het wel als een gewasbeschermingsmiddel gezien wordt dan is ook een toelating door het CTB nodig. Waarschijnlijk is het nodig om een uitspraak van de Europese Commissie te vragen, om op die manier binnen de EU eenzelfde gedragslijn te krijgen.

In de VS heeft de FDA (Food and Drug Administration) in 2001 ozon toegelaten als een anti-microbieel middel voor gebruik bij de verwerking, opslag en bewerking van voedsel, waaronder groenten en fruit. Ozon heeft hiervoor de zgn. GRAS-status (Generally Recognized As Safe) gekregen. In de VS wordt ozon ook toegepast in de biologische landbouw. In de National List of Allowed and Prohibited Substances wordt ozon vermeld als een middel dat toegestaan wordt voor gebruik in verwerkte producten die gelabeld zijn als "organic".

5 Conclusie

Ozonbehandelingen kunnen een hulpmiddel zijn om de aantasting van schimmels, bacteriën en insecten op uitgangsmateriaal te beperken. Om de genoemde organismen te doden zijn meestal hoge concentraties ozon nodig. Deze concentraties kunnen alleen in afgesloten ruimten toegediend worden, omdat ze te hoog zijn om er mensen aan bloot te stellen. Met behulp van lage concentraties ozon kan de uitbreiding van schimmels en bacteriën tijdens de bewaring van uitgangsmateriaal geremd worden. De bestrijding of remming van de schadelijke organismen zal beter zijn, naarmate deze zich meer oppervlakkig op het uitgangsmateriaal bevinden.

Het hangt van het type uitgangsmateriaal af of er ook schade aan het uitgangsmateriaal zelf ontstaat. Beschadiging van zaden, zodanig dat de kiemkracht benadeeld wordt, lijkt niet gauw op te treden indien er van uitgegaan wordt dat de ozonbehandeling kan worden toegepast op droog zaad. Indien het zaad voorafgaand aan de ozonbehandeling voorgeweekt moet worden, dan is het wel mogelijk dat de kiemkracht benadeeld wordt.

Schade aan (aardappel)knollen lijkt eerder op te treden dan aan zaden. Er zijn voorbeelden dat de veldopkomst nadelig beïnvloed werd, maar ook voorbeelden, waarbij dit niet het geval was en er wel sprake was van een goed bestrijdingseffect. Schade aan plantmateriaal kan vrij snel ontstaan, omdat ozon o.a. de waslaag en celmembranen kan beschadigen. Het plantmateriaal kan dan uitdrogings- en afstervingsverschijnselen gaan vertonen. Het zal van het plantmateriaal afhangen in hoeverre groeipunten ook beschadigd kunnen worden.

In hoeverre ozonbehandelingen in praktijksituaties voldoende effect opleveren, is niet duidelijk en dient nader onderzocht te worden. De meest perspectievolle toepassing bij uitgangsmateriaal lijkt een kortdurende behandeling te zijn, waarbij zaden of knollen (en mogelijk ook bollen) blootgesteld worden aan hoge concentraties ozon. Per combinatie van het type uitgangsmateriaal en het schadelijke organisme zal gezocht moeten worden naar een optimale toepassing waarbij enerzijds het bestrijdingseffect voldoende is en anderzijds de schade aan het uitgangsmateriaal beperkt blijft.

Er is nog veel onduidelijkheid over de toelaatbaarheid van ozonbehandelingen op uitgangsmateriaal, zowel voor de gangbare landbouw als voor de biologische landbouw. Hierover zal nog meer duidelijkheid moeten worden verkregen.

Literatuur

Allen, B., J. Wu and H. Doan (2003). Inactivation of fungi associated with barley grain by gaseous ozone. *Journal of Environmental Science and Health. Part B-Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*. 2003, 38: 617-630.

Daniels-Lake, B.J., R.K. Prange, W. Kalt, C.L. Liew, J. Walsh, P. Dean and R. Coffin (1996). The effects of ozone and 1,8-cineole on sprouting, fry color and sugars of stored Russet Burbank potatoes. *American Potato Journal* 73: 469-481.

Deynze, A. van (2004). Controlling Bakanae Disease-03. Internetsite www.syix.com/rrb/03rpt/Bakanae.htm

Fett, W.F. (2004). Decontamination of Alfalfa Seeds and Sprouts with Ozone. Internetsite www.sproutnet.com/Research/decontamination_of_alfalfa_seeds.htm

Forney, C.F. J. Song, L. Fan, P.D. Hildebrand and M.A. Jordan (2003). Ozone and 1-methylcyclopropene alter the postharvest quality of broccoli. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128: 403-408.

Forney, C.F., L. Fan, P.D. Hildebrand and J. Song (2001). Do negative air ions reduce decay of fresh fruits and vegetables? *Proc. 4th Int. Conf. On Postharvest*: 421 – 424.

Frazier, M.J. (2004). Assessment of fungicide combinations as seed treatments for controlling silver scurf (*Helminthosporium solani*) during tuber growth, at harvest and during storage. Internetsite: www.kimberly.uidaho.edu/potatoes/scurftrt.htm.

Hsieh, S.P.Y., S.S. Ning and D.S. Tzeng (1998). Control of turf grass seedborne pathogenic fungi by ozone. *Plant Pathology Bulletin* 7: 105-112.

Hur, J.S., J.A. Kim, M. Kim, J.S. Jung and Y.J. Koh (2003). Effects of Ozonated Water on Postharvest Pathogens of Kiwifruits in Laboratory. *Proc. IS on Kiwifruit 2003*: 433-436

Huyskens-Keil, S., M. Schreiner and A. Krumbein (2003). Possibilities and Constraints of Postharvest Treatments for Quality Assurance of Fruits and Vegetables in Chain Management. *Proc. Int. Conf. Quality in Chains 2003*: 737 – 742.

Liew, C.L. and R.K. Prange (1994). Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots (*Daucus carota* L.). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(3): 563 -567

Kells, S.A., L.J. Mason, D.E. Maier and C.P. Woloshuk (2001). Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. *J. of Stored Products Research* 37: 371 – 382.

Leesch, J.G., J.W. Armstrong and J.S. Tebbets (2004). Insect Control with ozone gas as an alternative to methyl bromide. *Proceedings of International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives 2004*: 63-1 – 63-2.

Mendez, F., D.E. Maier, L.J. Mason and C.P. Woloshuk (2003). Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. *J. of Stored Products Research* 39: 33 – 44.

- Nadas, A., M. Olmo and J.M. Garcia (2003). Growth of *Botrytis cinerea* and strawberry quality in ozone-enriched atmospheres. *J. of Food Science* 68: 1798 – 1802.
- Palou, L., J.L. Smilanick, C.H. Crisosto and M. Mansour (2001) Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue molds on cold stored citrus fruit. *Plant Disease* 85 (6): 632 – 638.
- Palou, L., C.H. Crisosto, J.L. Smilanick, J.E. Adaskaveg and J.P. Zoffoli (2002). Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 24: 39 – 48.
- Palou, L., J.L. Smilanick, C.H. Crisosto, M. Mansour and P. Plaza (2003). Ozone gas penetration and control of the sporulation of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* within commercial packages of oranges during cold storage. *Crop protection* 22: 1131 – 1134.
- Palou, L., C.H. Crisosto, J.L. Smilanick, J.E. Adaskaveg and J.P. Zoffoli (2002). Evaluation of the effect of ozone exposure on decay development and fruit physiological behavior. *Proc. 4th Int. Conf on Postharvest 2001*: 429 – 430.
- Perez, A.G., C. Sanz, J.J. Rios, R. Olias and J.M. Olias (1999). Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1652 – 1656.
- Rajkowski, K and E. Rice (2003). Effect of Alfalfa Seed Washing on the Organic Carbon Concentration in Chlorinated and Ozonated Water. Internetsite www.sproutnet.com/Research/effect_of_alfalfa_seed_washing.htm
- Ridder, J.K. (1996). Wassen en knolontsmetten van aardappelen ter bestrijding van bacteriën en bodempathogenen. *Jaarboek PAGV 1995/1996*. Publicatie No 81A: 20 – 22.
- Sarig, P, T. Zahavi, Y. Zutkhi, S. Yannai, N. Lisker and R. Ben-Arie (1996). Ozone for control of post-harvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48: 403 – 415.
- Skog, L.J. and C.L. Chu (2001). Effect of ozone on qualities of fruits and vegetables in cold storage. *Can. J. Plant Sci.* 81: 773 –778.
- Song, J., L. Fan, C.F. Forney, M.A. Jordan, P.D. Hildebrand, W Kalt and D.A.J. Ryan (2003). Effect of ozone treatment and controlled atmosphere storage on quality and phytochemicals in Highbush Blueberries. *Proc. 8th Int. CA Conference*: 417 – 423.
- Spencer, R.C.J. (2003). Ozone as a post-harvest treatment for potatoes. Thesis Department of Plant Sciences, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada. 139 pp.