



Artículo original / Original article

Efecto de la ozonización sobre la carga bacteriana del aire en ambientes de procesamiento de semen porcino

Effect of ozonation on the bacterial load of the air in porcine semen processing environments

Verónica Marianella Román-Coyla ¹; Elias David Esquicha-Larico ^{1*}

¹Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa, Perú

Recibido: 08/05/2024

Aceptado: 10/06/2024

Publicado: 25/07/2024

*Autor de correspondencia: eesquicha@unsa.edu.pe

Resumen: La calidad microbiológica del aire es relevante en el procesamiento de semen porcino, donde los microorganismos pueden comprometer las condiciones higiénicas del proceso. El objetivo fue determinar el efecto del ozono sobre la carga bacteriana del aire en ambientes de procesamiento de semen porcino. Se evaluaron el laboratorio y la sala de colecta, en ausencia y presencia del semental, mediante muestreo por impactación de 1 m³ de aire antes y después de una ozonización de 10 min, con recuento de aerobios mesófilos totales, coliformes totales y *Escherichia coli*. Los aerobios mesófilos disminuyeron de 210 a 74, de 1120 a 162 y de 1736 a 202 UFC/m³, con reducciones de 64,8, 85,5 y 88,4 %, respectivamente, y un promedio de 79,6 %, sin detección de *Escherichia coli* ni coliformes totales. La ozonización mostró potencial como medida complementaria de control microbiológico ambiental dentro de las prácticas de higiene y bioseguridad.

Palabras clave: desinfección; aerobios mesófilos; coliformes; *Escherichia coli*; bioseguridad

Abstract: The microbiological quality of air is relevant in boar semen processing, where microorganisms may compromise the hygienic conditions of the process. The objective was to determine the effect of ozone on airborne bacterial load in boar semen processing environments. The laboratory and semen collection room, both in the absence and presence of the boar, were evaluated by impact air sampling of 1 m³ before and after a 10-min ozonation cycle, with enumeration of total aerobic mesophiles, total coliforms, and *Escherichia coli*. Aerobic mesophiles decreased from 210 to 74, from 1120 to 162, and from 1736 to 202 CFU/m³, corresponding to reductions of 64.8, 85.5, and 88.4%, respectively, with an average reduction of 79.6%, while *Escherichia coli* and total coliforms were not detected. Ozonation showed potential as a complementary measure for environmental microbiological control within hygiene and biosecurity practices.

Keywords: disinfection; aerobic mesophiles; coliforms; *Escherichia coli*; biosecurity

1. Introducción

La inseminación artificial constituye una tecnología fundamental en los sistemas modernos de producción porcina y depende ampliamente del uso de semen refrigerado y procesado en centros especializados. La conservación de la calidad seminal durante la preparación y el almacenamiento de las dosis requiere controlar diferentes factores físicos y microbiológicos, debido a que la contaminación bacteriana puede comprometer la funcionalidad espermática y limitar la conservación del semen (Waberski et al., 2019). Gączarzewicz et al. (2016) observaron que la presencia y proliferación de determinados microorganismos durante el almacenamiento puede asociarse con disminución de la motilidad, alteraciones de la membrana plasmática y daño acrosomal.

La contaminación bacteriana puede incorporarse durante diferentes etapas de la colecta y procesamiento de las dosis seminales. Además de los microorganismos asociados al propio animal, las condiciones higiénicas, los equipos y la manipulación constituyen factores relevantes para mantener la calidad microbiológica del proceso. Schulze et al. (2019) evidenciaron una relación entre los mecanismos antibacterianos presentes en el plasma seminal y características de la calidad espermática, mientras que Sancho et al. (2017) resaltaron la necesidad de desarrollar estrategias capaces de controlar la carga bacteriana sin depender exclusivamente de los antimicrobianos adicionados a los diluyentes.

El control bacteriano de las dosis seminales se ha apoyado tradicionalmente en la incorporación de antibióticos a los diluyentes; sin embargo, esta estrategia no garantiza la eliminación completa de los microorganismos presentes y su utilización debe acompañarse de medidas preventivas de higiene. Tvrdá et al. (2021), al evaluar diferentes diluyentes para semen porcino, observaron una reducción de la carga bacteriana con la incorporación de antimicrobianos, aunque persistieron determinados microorganismos y se identificaron aislamientos con resistencia a distintos antibióticos. Estos hallazgos refuerzan la importancia de disminuir las oportunidades de contaminación desde la colecta y el procesamiento, en lugar de concentrar el control únicamente en la conservación posterior de las dosis seminales.

En este contexto, el ambiente de procesamiento representa una vía adicional de exposición microbiológica. Los microorganismos presentes en el aire pueden integrar bioaerosoles y dispersarse hacia superficies, equipos y áreas de trabajo. Kraemer et al. (2019) demostraron que el aire interior de instalaciones porcinas contiene comunidades bacterianas propias del entorno productivo. De manera más específica, Augustin et al. (2021) evaluaron mediante muestreo por impactación la calidad microbiológica del aire de una granja porcina y registraron aerobios mesófilos expresados en UFC/m³, encontrando mayores cargas en los espacios interiores que en el aire exterior. Estos antecedentes sustentan la importancia de considerar el aire como parte del control microbiológico en instalaciones vinculadas a la producción porcina.

Entre las tecnologías utilizadas para disminuir la contaminación ambiental, el ozono presenta interés debido a su elevada capacidad oxidante y a la posibilidad de aplicarlo en fase gaseosa. Martinelli et al. (2017) evaluaron la ozonización del aire mediante recuentos microbiológicos antes y después del tratamiento y observaron respuestas variables según el microorganismo y las condiciones de exposición. Asimismo, Xue et al. (2023) señalan que la actividad antimicrobiana del ozono se relaciona con su capacidad oxidante y que su efectividad está condicionada por factores como la concentración, el tiempo de contacto, la humedad y las características del medio tratado. Por ello, la ozonización representa una alternativa de interés para la descontaminación ambiental, aunque requiere considerar las condiciones específicas de aplicación.

A pesar de los avances en el control microbiológico del semen porcino y en las tecnologías de descontaminación ambiental, existe información limitada sobre la aplicación de ozono directamente en los ambientes destinados a la colecta y procesamiento seminal. Evaluar su efecto sobre la carga bacteriana del aire puede aportar evidencia para complementar las estrategias de higiene implementadas en estas instalaciones. Por ello, el objetivo de esta investigación fue

determinar el efecto de la aplicación de ozono sobre la carga bacteriana del aire en ambientes de procesamiento de semen porcino, mediante la comparación de los recuentos microbiológicos antes y después de la ozonización.

2. Materiales y Métodos

2.1 Lugar y diseño del estudio

La investigación se realizó en una unidad dedicada a la producción y procesamiento de semen porcino, ubicada en el distrito de Cerro Colorado, provincia de Arequipa, Perú, durante septiembre de 2023. El estudio tuvo un enfoque cuantitativo y un diseño experimental, orientado a evaluar el efecto de la aplicación de ozono sobre la carga bacteriana presente en el aire de los ambientes de procesamiento de semen porcino.

Se evaluaron dos ambientes: el laboratorio y la sala de colecta de semen. Esta última fue analizada bajo dos condiciones, en ausencia y en presencia del semental porcino. En cada caso se determinó la carga bacteriana antes y después de la aplicación de ozono, expresada como unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire (UFC/m³).

2.2 Muestreo microbiológico del aire

El muestreo microbiológico del aire se realizó antes y después de la aplicación de ozono en cada una de las condiciones de evaluación. Para la recolección se utilizó un equipo Biological Air Sampler, mediante el cual se aspiró 1 m³ de aire por evaluación.

El equipo operó mediante un sistema de aspiración e impactación, permitiendo que las partículas aerotransportadas atravesaran los microorificios del cabezal y se depositaran directamente sobre la superficie del medio de cultivo. Las placas obtenidas fueron posteriormente sometidas al procedimiento microbiológico para el desarrollo y recuento de las colonias (Augustin et al., 2021).

2.3 Procesamiento microbiológico de las muestras

El material utilizado para el análisis microbiológico fue previamente esterilizado en autoclave. Se prepararon y rotularon placas con agar nutritivo y agar Chromocult, las cuales fueron utilizadas para la recuperación y diferenciación de los microorganismos bacterianos considerados en el estudio (Maheux et al., 2008).

Después del muestreo del aire, las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Finalizado el periodo de incubación, se realizó el recuento de las colonias desarrolladas y los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire (UFC/m³). Se determinaron los recuentos correspondientes a aerobios mesófilos totales, coliformes totales y *Escherichia coli*.

2.4 Aplicación del tratamiento con ozono

La desinfección de los ambientes se realizó mediante un generador de ozono ACR Sanitizer Plus digit. El equipo fue programado para operar durante 10 min en cada condición evaluada. Durante la ozonización se mantuvo activado el sistema de aire acondicionado con la finalidad de favorecer la circulación del ozono en el ambiente y a través de los conductos del sistema de ventilación.

Finalizado el tiempo de exposición, el equipo concluyó automáticamente el ciclo de funcionamiento. Posteriormente, los ambientes fueron ventilados mediante la apertura de puertas y/o ventanas antes de efectuar el muestreo microbiológico posterior al tratamiento. El esquema general del procedimiento experimental, desde el muestreo inicial hasta la evaluación posterior a la ozonización, se presenta en la Figura 1.

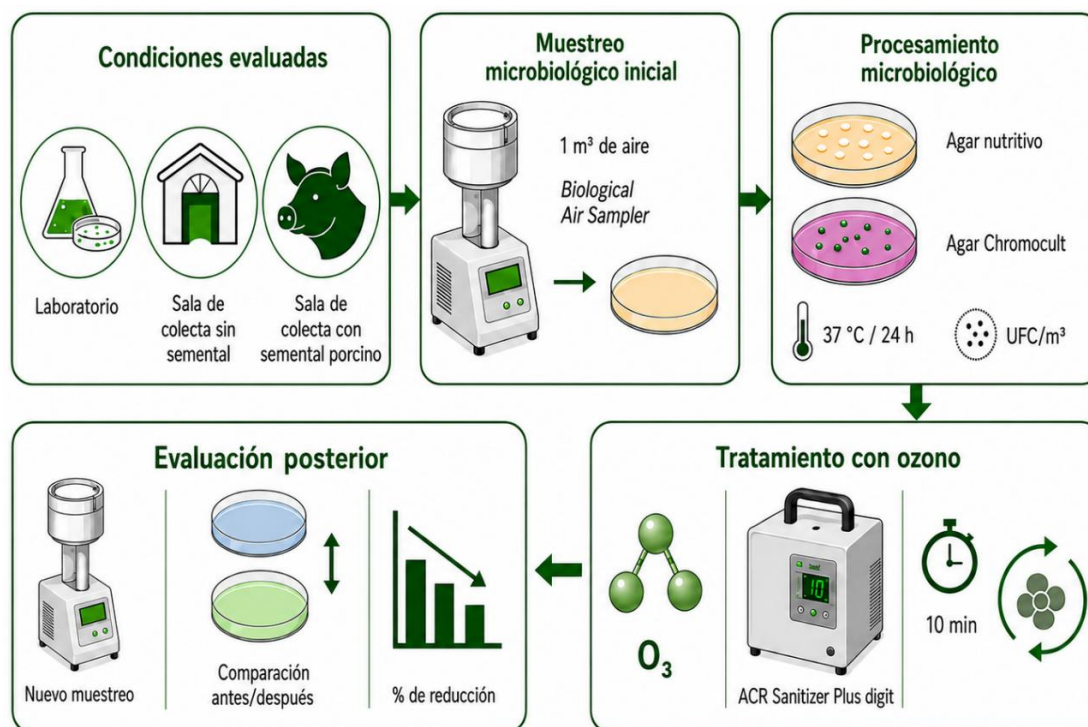


Figura 1. Esquema resumido del procedimiento experimental.

2.5 Variables evaluadas y cálculo de reducción

La variable de respuesta fue la carga bacteriana del aire, expresada en unidades formadoras de colonias por metro cúbico (UFC/m³). Se evaluaron los recuentos de aerobios mesófilos totales, coliformes totales y *Escherichia coli* antes y después de la aplicación del tratamiento con ozono.

La magnitud de la reducción de la carga bacteriana se determinó mediante el porcentaje de reducción de UFC/m³, calculado a partir de la diferencia entre los recuentos obtenidos antes y después de la ozonización:

$$\text{Reducción (\%)} = \frac{\text{UFC iniciales} - \text{UFC posteriores}}{\text{UFC iniciales}} \times 100$$

Este cálculo se aplicó de manera independiente para cada condición evaluada.

2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados mediante estadística descriptiva. La carga bacteriana se expresó como unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire (UFC/m³) para cada condición evaluada, comparando los valores registrados antes y después de la aplicación de ozono. Asimismo, se calculó el porcentaje de reducción de la carga bacteriana posterior al tratamiento, con el propósito de describir la magnitud del efecto observado en cada condición.

3. Resultados y discusión

3.1 Carga bacteriana antes y después de la ozonización

No se detectaron unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* ni de coliformes totales en ninguna de las condiciones evaluadas, tanto antes como después de la aplicación de ozono. En contraste, se registraron aerobios mesófilos totales en los tres escenarios de evaluación, con recuentos iniciales diferentes entre ellos.

Antes de la ozonización, el laboratorio presentó el menor recuento de aerobios mesófilos totales, con 210 UFC/m³. En la sala de colecta sin semental se registraron 1120 UFC/m³, mientras que la

mayor carga correspondió a la sala de colecta con presencia del semental, con 1736 UFC/m³. Posterior al tratamiento, los recuentos disminuyeron a 74, 162 y 202 UFC/m³, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Recuentos bacterianos antes y después de la ozonización.

Condición evaluada	<i>Escherichia coli</i> (UFC/m ³)	Coliformes totales (UFC/m ³)	Aerobios mesófilos antes (UFC/m ³)	Aerobios mesófilos después (UFC/m ³)
Laboratorio	0	0	210	74
Sala de colecta sin semental	0	0	1120	162
Sala de colecta con semental	0	0	1736	202

3.2 Reducción de aerobios mesófilos totales

Los recuentos de aerobios mesófilos totales disminuyeron después de la aplicación de ozono en las tres condiciones evaluadas, con reducciones comprendidas entre 64,8 y 88,4 % (Figura 2). La mayor disminución porcentual correspondió a la sala de colecta con presencia del semental, seguida de la sala sin semental y del laboratorio.

En conjunto, el promedio de reducción observado fue de 79,6 %. Asimismo, la condición con presencia del semental, que presentó la mayor carga bacteriana inicial, mostró también la mayor reducción porcentual posterior a la ozonización.

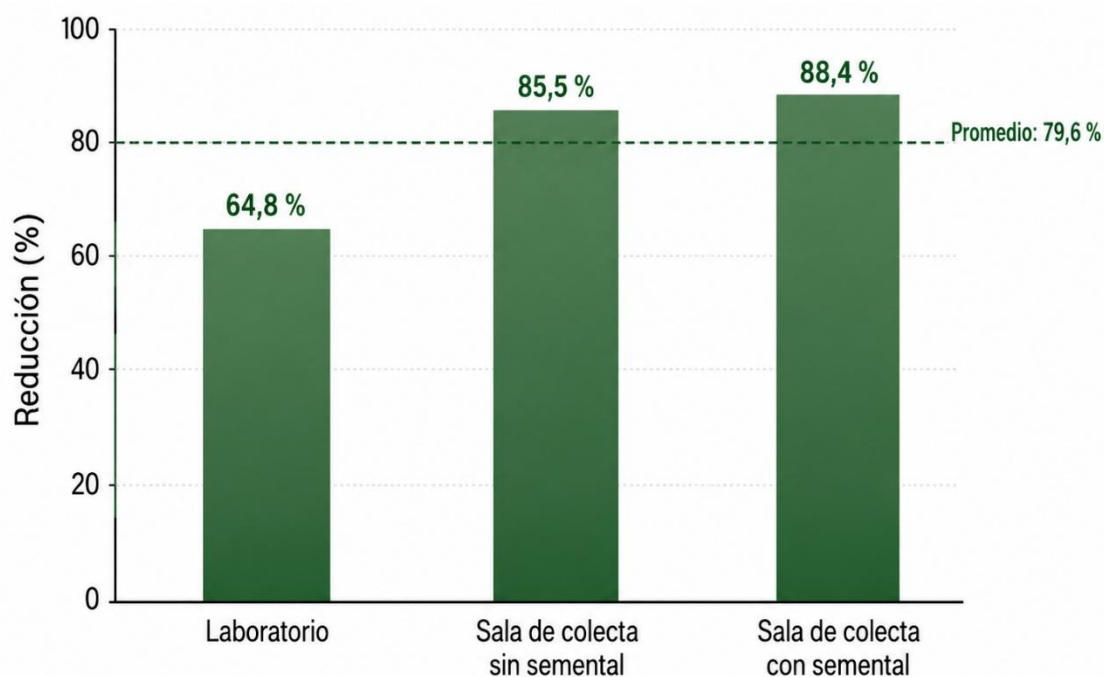


Figura 2. Porcentaje de reducción según condición evaluada.

3.3 Discusión

La aplicación de ozono estuvo acompañada de una disminución de los recuentos de aerobios mesófilos totales en las tres condiciones evaluadas, con reducciones entre 64,8 y 88,4 % y un promedio de 79,6 %. Este comportamiento coincide con investigaciones realizadas en otros ambientes cerrados. Masotti et al. (2019), mediante muestreo de aire por impactación en una planta láctea, comprobaron que la ozonización permitió reducir la contaminación microbiana aerotransportada; mientras que Moccia et al. (2020) observaron una disminución de la carga microbiana del aire y de superficies después de aplicar ozono en ambientes hospitalarios. Aunque

estos escenarios difieren del procesamiento de semen porcino, en conjunto evidencian la capacidad del ozono gaseoso para disminuir microorganismos presentes en ambientes cerrados.

La carga inicial de aerobios mesófilos fue diferente entre las condiciones evaluadas y alcanzó su mayor valor en la sala de colecta con presencia del semental. Sin embargo, debido al diseño y al carácter descriptivo del análisis, este hallazgo no permite atribuir exclusivamente al animal el incremento observado. En centros de inseminación porcina, la contaminación puede proceder de múltiples puntos del proceso. Schulze et al. (2015) identificaron nueve puntos críticos higiénicos en centros de producción de semen porcino y encontraron evidencias de contaminación asociada con equipos, superficies y etapas de procesamiento. Asimismo, Costinar et al. (2022) señalan que, además del propio semental, el agua destilada y el equipamiento empleado en la preparación de las dosis pueden actuar como fuentes de contaminación bacteriana. Estos antecedentes muestran que el control microbiológico debe contemplar integralmente el ambiente de colecta y procesamiento, y no únicamente al animal.

La ausencia de *Escherichia coli* y coliformes totales en todas las evaluaciones debe interpretarse como una no detección bajo las condiciones de muestreo empleadas, y no como ausencia general de contaminación bacteriana, debido a que los aerobios mesófilos estuvieron presentes en todos los escenarios. Esta distinción es relevante en sistemas de producción de semen porcino, donde se ha descrito una microbiota contaminante diversa. Ciornei et al. (2021) identificaron múltiples especies bacterianas y fúngicas en muestras de semen de verraco, mientras que Costinar et al. (2022) aislaron bacterias Gram negativas como *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*. Por tanto, el recuento de aerobios mesófilos constituye un indicador útil de la carga bacteriana general, aunque no permite determinar la composición taxonómica de los microorganismos presentes.

La reducción observada después de la ozonización tampoco fue uniforme entre las tres condiciones, lo que puede relacionarse con la naturaleza de la contaminación inicial y con las condiciones propias de cada ambiente. Piletić et al. (2022), al evaluar ozono gaseoso en una habitación hospitalaria, encontraron respuestas diferenciadas entre bacterias aerotransportadas, con reducciones de 33 % para *Micrococcus*, 58 % para *Staphylococcus* y 61 % para *Bacillus*. De manera complementaria, Epelle et al. (2022) demostraron que la susceptibilidad al ozono puede variar entre diferentes microorganismos. Estos hallazgos permiten comprender que una disminución de la carga bacteriana no supone necesariamente su eliminación completa y que la respuesta al tratamiento depende, entre otros factores, de las características de los microorganismos expuestos.

Las condiciones de aplicación constituyen otro elemento relevante para interpretar la magnitud de la reducción. Neves et al. (2023), en un ensayo de campo con ozono gaseoso, observaron que la eficacia de descontaminación aumentó en relación con el tiempo de exposición y la humedad relativa. Asimismo, Epelle et al. (2023) destacan que la concentración, el tiempo de contacto, la circulación y extracción del gas, así como la medición y el control del proceso, son aspectos críticos en la implementación de tecnologías basadas en ozono. En el experimento desarrollado se aplicó un ciclo de ozonización de 10 min y se favoreció la circulación del gas mediante el sistema de aire acondicionado; sin embargo, no se dispuso de mediciones ambientales de la concentración de ozono, la humedad relativa o la temperatura durante el tratamiento. En consecuencia, los porcentajes de reducción obtenidos representan la respuesta observada bajo las condiciones específicas del procedimiento utilizado y no permiten establecer una relación dosis-respuesta.

Desde el punto de vista de la producción de dosis seminales, el control de la carga bacteriana ambiental adquiere relevancia como parte de las medidas de higiene y bioseguridad. Nitsche-Nitsche-Melkus et al. (2020), mediante el seguimiento de 28 centros europeos de inseminación artificial, encontraron que la mejora de las condiciones higiénicas en puntos críticos estuvo estrechamente relacionada con menores niveles de contaminación bacteriana en semen procesado. Además, Contreras et al. (2022) destacan que la contaminación bacteriana puede

afectar la calidad y funcionalidad del semen porcino y que su prevención resulta particularmente importante frente a la necesidad de reducir la dependencia de antimicrobianos en los diluyentes. En este contexto, la ozonización del ambiente podría considerarse una medida complementaria dentro de un programa integral de higiene; no obstante, el presente estudio evaluó exclusivamente la carga bacteriana del aire y, por tanto, no permite establecer un efecto directo sobre la calidad microbiológica del semen, los parámetros espermáticos o el desempeño reproductivo.

Los resultados deben interpretarse considerando algunas limitaciones. La evaluación se efectuó en una única unidad de procesamiento y en un periodo específico, con un análisis estadístico de carácter descriptivo. Además, el estudio se limitó al recuento de aerobios mesófilos totales, coliformes totales y *E. coli*, sin identificar taxonómicamente las demás colonias recuperadas. Tampoco se cuantificaron variables ambientales que pueden modificar la acción del ozono, como su concentración efectiva, humedad relativa y temperatura. Por ello, investigaciones posteriores deberían incorporar muestreos repetidos, control de las condiciones de ozonización, caracterización de los microorganismos recuperados y evaluación conjunta del aire, superficies y semen procesado. Esto permitiría determinar con mayor precisión el papel de la ozonización ambiental dentro de los programas de control microbiológico en unidades de procesamiento de semen porcino.

4. Conclusiones

La ozonización ambiental permitió disminuir la carga de aerobios mesófilos en los espacios destinados al procesamiento de semen porcino, evidenciando su potencial como medida complementaria dentro de las estrategias de higiene y control microbiológico. La respuesta observada varió según las condiciones del ambiente, por lo que su aplicación debe considerarse como parte de un programa integral de bioseguridad y no como una medida aislada de desinfección.

Los hallazgos constituyen una base para posteriores evaluaciones orientadas a establecer protocolos de ozonización bajo condiciones controladas, incorporando la medición de variables ambientales y el análisis microbiológico del semen y de las superficies de procesamiento, con el fin de determinar con mayor precisión su contribución a la calidad sanitaria del proceso.

Financiamiento

Ninguno.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Contribución de autores

Román-Coyla, V. M.: conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, administración del proyecto, validación, visualización, redacción – borrador original, redacción – revisión y edición.

Esquicha-Larico, E. D.: conceptualización, metodología, supervisión, validación, redacción – revisión y edición.

Referencias bibliográficas

Augustin, K., Tanuwidjaja, I., Kovaček, I., Majić, I., Luković, Z., & Mrkonjic Fuka, M. (2021). Microbiological analysis of indoor and outdoor air on a pig farm in Slavonia. *Journal of Central European Agriculture*, 22(2), 260–268. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/22.2.3143>

- Ciornei, Ș., Drugociu, D., Ciornei, L. M., Mareș, M., & Roșca, P. (2021). Total Asepsitization of Boar Semen, to Increase the Biosecurity of Reproduction in Swine. *Molecules*, 26(20), 6183. <https://doi.org/10.3390/molecules26206183>
- Contreras, M. J., Núñez-Montero, K., Bruna, P., García, M., Leal, K., Barrientos, L., & Weber, H. (2022). Bacteria and Boar Semen Storage: Progress and Challenges. *Antibiotics*, 11(12), 1796. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121796>
- Costinar, L., Herman, V., Pitoiu, E., Iancu, I., Degi, J., Hulea, A., & Pascu, C. (2022). Boar Semen Contamination: Identification of Gram-Negative Bacteria and Antimicrobial Resistance Profile. *Animals*, 12(1), 43. <https://doi.org/10.3390/ani12010043>
- Epelle, E. I., Emmerson, A., Nekrasova, M., Macfarlane, A., Cusack, M., Burns, A., Mackay, W., & Yaseen, M. (2022). Microbial Inactivation: Gaseous or Aqueous Ozonation? *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 61(27), 9600–9610. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c01551>
- Epelle, E. I., Macfarlane, A., Cusack, M., Burns, A., Okolie, J. A., Vichare, P., Rolland, L., & Yaseen, M. (2023). Ozone Decontamination of Medical and Nonmedical Devices: An Assessment of Design and Implementation Considerations. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 62(10), 4191–4209. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c03754>
- Gączarzewicz, D., Udała, J., Piasecka, M., Błaszczuk, B., & Stankiewicz, T. (2016). Bacterial Contamination of Boar Semen and its Relationship to Sperm Quality Preserved in Commercial Extender Containing Gentamicin Sulfate. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(3), 451–459. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0057>
- Kraemer, J. G., Aebi, S., Oppliger, A., & Hilty, M. (2019). The Indoor-Air Microbiota of Pig Farms Drives the Composition of the Pig Farmers' Nasal Microbiota in a Season-Dependent and Farm-Specific Manner. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(9). <https://doi.org/10.1128/AEM.03038-18>
- Maheux, A. F., Huppé, V., Boissinot, M., Picard, F. J., Bissonnette, L., Bernier, J.-L. T., & Bergeron, M. G. (2008). Analytical limits of four β -glucuronidase and β -galactosidase-based commercial culture methods used to detect *Escherichia coli* and total coliforms. *Journal of Microbiological Methods*, 75(3), 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.08.001>
- Martinelli, M., Giovannangeli, F., Rotunno, S., Trombetta, C., & Montomoli, E. (2017). Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. *J Prev Med Hyg*, 58(1), E48–E52. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5432778/>
- Masotti, F., Vallone, L., Ranzini, S., Silveti, T., Morandi, S., & Brasca, M. (2019). Effectiveness of air disinfection by ozonation or hydrogen peroxide aerosolization in dairy environments. *Food Control*, 97, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.022>
- Moccia, G., De Caro, F., Pironti, C., Boccia, G., Capunzo, M., Borrelli, A., & Motta, O. (2020). Development and Improvement of an Effective Method for Air and Surfaces Disinfection with Ozone Gas as a Decontaminating Agent. *Medicina*, 56(11), 578. <https://doi.org/10.3390/medicina56110578>
- Neves, E. S., Ng, C. T., Pek, H. Bin, Goh, V. S. L., Mohamed, R., Osman, S., Ng, Y. K., Kadir, S. A., Nazeem, M., She, A., Sim, G., Aik, J., Ng, L. C., Octavia, S., Fang, Z., Wong, J. C. C., & Setoh, Y. X. (2023). Field trial assessing the antimicrobial decontamination efficacy of gaseous ozone in a public bus setting. *Science of The Total Environment*, 876, 162704. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162704>
- Nitsche-Melkus, E., Bortfeldt, R., Jung, M., & Schulze, M. (2020). Impact of hygiene on bacterial contamination in extended boar semen: An eight-year retrospective study of 28 European AI centers. *Theriogenology*, 146, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.031>

- Piletić, K., Linšak, D. T., Kovač, B., Mežnarić, S., Repustić, M., Radmanović-Skrbić, M., & Gobin, I. (2022). Ozone disinfection efficiency against airborne microorganisms in hospital environment: a case study. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 73(4), 270–276. <https://doi.org/10.2478/aiht-2022-73-3651>
- Sancho, S., Briz, M., Yeste, M., Bonet, S., & Bussalleu, E. (2017). Effects of the antimicrobial peptide protegrin 1 on sperm viability and bacterial load of boar seminal doses. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(S4), 69–71. <https://doi.org/10.1111/rda.13061>
- Schulze, M., Ammon, C., Rüdiger, K., Jung, M., & Grobbel, M. (2015). Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*, 83(3), 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.004>
- Schulze, M., Czirják, G. Á., Müller, K., Bortfeldt, R., Jung, M., & Jakop, U. (2019). Antibacterial defense and sperm quality in boar ejaculates. *Journal of Reproductive Immunology*, 131, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.11.001>
- Tvrda, E., Bučko, O., Rojková, K., Ďuračka, M., Kunová, S., Kováč, J., Benko, F., & Kačániová, M. (2021). The Efficiency of Selected Extenders against Bacterial Contamination of Boar Semen in a Swine Breeding Facility in Western Slovakia. *Animals*, 11(11), 3320. <https://doi.org/10.3390/ani11113320>
- Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitze, K. F., & Johnson, L. (2019). Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*, 137, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.030>
- Xue, W., Macleod, J., & Blaxland, J. (2023). The Use of Ozone Technology to Control Microorganism Growth, Enhance Food Safety and Extend Shelf Life: A Promising Food Decontamination Technology. *Foods*, 12(4), 814. <https://doi.org/10.3390/foods12040814>