

**BIO<sup>3</sup>GEN**  
protezione totale



**TEST CHIMICI ED  
AMBIENTALI**



Spett.le  
DF PRODUZIONI SAS di Capponi Diego &  
C.  
Via Lungo Romna, 51  
24020 Casnigo (BG)

# **VALUTAZIONE DELL'ABBATTIMENTO DELLA LEGIONELLA PNEUMOPHILA INOCULATA IN CAMPIONI DI ACQUA PRIMARIA CON TRATTAMENTO DISINFETTANTE TRAMITE L'AUSILIO DELLO STRUMENTO BIO3GEN GENERATORE DI OZONO.**

AEDES s.r.l. Laboratorio riconosciuto dal Ministero della Salute con sistema di qualità UNI EN ISO 9001:2000 BVQI Certificato n° 163345

Via Cancelliera n° 65      [aedes.rm@tiscalinet.it](mailto:aedes.rm@tiscalinet.it)  
00040 Ariccia (Roma)      [www.aedes.info](http://www.aedes.info)  
Tel. 06.9343260  
Fax. 06.93495559  
P.I. 04904471002



Ariccia, 28/06/2012

## INDICE

INDICE.....	2
<b>2 SCOPO DELL'ANALISI.....</b>	<b>3</b>
<b>3 MATERIALE OCCORRENTE PER LA PROVA.....</b>	<b>4</b>
<b>4 ESECUZIONE DEL SAGGIO.....</b>	<b>4</b>
<b>6 CONCLUSIONI.....</b>	<b>7</b>

AEDES s.r.l. Laboratorio riconosciuto dal Ministero della Salute con sistema di qualità UNI EN ISO 9001:2000 BVQI Certificato n° 163345

Via Cancelliera n° 65      [aedes.rm@tiscalinet.it](mailto:aedes.rm@tiscalinet.it)  
00040 Ariccia (Roma)      [www.aedes.info](http://www.aedes.info)  
Tel. 06.9343260  
Fax. 06.93495559  
P.I. 04904471002

## **2 SCOPO DELL'ANALISI**

Lo scopo di questa indagine svolta in data 01/06/2012, è di verificare il grado di abbattimento del microrganismo *Legionella pneumophila* presente nell'acqua primaria (contaminata precedentemente con ceppo puro), tramite il dispositivo "BIO3GEN".

Tale dispositivo eroga ozono ad una concentrazione di 400 mg/h, con un flusso compreso tra i 3-3,6 L/minuto.

L'erogazione può essere gestita tramite display presente sul corpo macchina che regola l'immissione dei vapori nell'ambiente ad intervalli di 2, 5, 10, 20 e 30 minuti.

In laboratorio il dispositivo, tramite il suo tubo in silicone correlato nella parte finale da una pietra di 20 mm, è stato inserito all'interno di una busta per alimenti sterile, contenente 1 litro di acqua potabile contaminata con ceppo di *Legionella pneumophila* ATCC 33152 a concentrazione nota, il procedimento è stato eseguito per tre volte ad intervalli diversi:

- a tempo 0 (subito dopo contaminazione);
- a tempo T1 dopo 5 minuti di funzionamento;
- a tempo T2 dopo 10 minuti di funzionamento;
- a tempo T3 dopo 20 minuti di funzionamento;

La ditta fornitrice del ceppo per l'analisi è la Biogenetics S.r.l..

### **3 MATERIALE OCCORRENTE PER LA PROVA**

#### Preparazioni della sospensione batterica:

Il ceppo di *Legionella pneumophila* è stato ricostruito in un diluente sterile in modo da ottenere una concentrazione rispettivamente di  $7,0 \times 10^2$  U.F.C./ml.

(U.F.C.= unità formanti colonie).

La metodica utilizzata per l'analisi dei campioni di acqua è quella descritta nel documento "Conferenza permanente per i rapporti tra Stato, Regioni, Province Aut. Trento e Bolzano, Doc. 04/04/2000 GU n°103 05/05/2000". Per tale metodica il laboratorio Aedes è accreditato dall'Ente Accredia.

### **4 ESECUZIONE DEL SAGGIO**

Il dispositivo BIO3GEN munito di tubo in silicone e pietra da 20 mm nella parte terminale, ha erogato all'interno di un litro di acqua contaminata con 700 U.F.C. di *Legionella pneumophila*, ozono per 5 minuti. Successivamente il campione è stato filtrato su membrana sterile da 0,2 micron, e processato secondo la metodica descritta nel Documento 04/04/2000 GU n°103 05/05/2000.

Si è proceduto poi, con l'inquinamento di un altro litro di acqua primaria contaminata con altri 700 U.F.C. di ceppo batterico, sottoposti a 10 minuti di ozono, fino ad arrivare a 20 minuti di immissione di ozono nel campione di acqua primaria.



Per ciascuna analisi le percentuali di abbattimento sono state calcolate secondo la seguente formula:

$$\text{Riduzione \%} = (A - B / A) \times 100$$

Dove:

A = popolazione microbica al T=0, espressa come U.F.C./ml

B = popolazione microbica al tempo di analisi T=Tx (Tx=5 minuti; Tx=10 minuti, Tx=20 minuti), espressa come U.F.C./L.

AEDES s.r.l. Laboratorio riconosciuto dal Ministero della Salute con sistema di qualità UNI EN ISO 9001:2000 BVQI Certificato n° 163345

Via Cancelliera n° 65      [aedes.rm@tiscalinet.it](mailto:aedes.rm@tiscalinet.it)  
00040 Ariccia (Roma)      [www.aedes.info](http://www.aedes.info)  
Tel. 06.9343260  
Fax. 06.93495559  
P.I. 04904471002

## **RISULTATI SU SUPERFICIE DI LAVORO**

**TABELLA 1**

<b>Tempo di analisi (minuti)</b>	<b>Legionella pneumophila U.F.C./L</b>
T= 0 minuti	$7,0 \times 10^2$
T= 5 minuti	<10
T= 10 minuti	<10
T= 20 minuti	<10

Si evidenzia che la dizione " <10 U.F.C./L", significa che nessuna colonia è stata riscontrata nel campione analizzato. Tale risultato è dovuto all'applicazione della formula matematica che è parte integrante del metodo di analisi.

**TABELLA 2**

<b>Tempo di analisi (minuti)</b>	<b>Riduzione della popolazione batterica (%) rispetto all'inoculo di partenza T=0 Legionella pneumophila</b>
T= 5 minuti	100 %
T= 10 minuti	100 %
T= 20 minuti	100 %

## 6 CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti lo strumento “BIO3GEN”, risulta essere “EFFICACE” nell’abbattimento del microrganismo *Legionella pneumophila*, in campioni di acqua potabile precedentemente contaminata, com’è evidenziato nelle tabelle 1 e 2.

Il Responsabile Laboratorio  
Il Chimico (Dott.ssa Marina Ievoli)




**VERIFICA DELL'EFFICACIA DEL GENERATORE DI  
OZONO BIO<sup>3</sup>GEN NEL TRATTAMENTO  
DELL'ACQUA**

**1. DATI AMMINISTRATIVI**

<b>Identificazione documento</b>	<b>RELAZIONE VARIA N. 24/2012</b>		
<b>Data emissione documento</b>	<b>27/04/2012</b>	<b>Data conclusione documento</b>	<b>02/05/2012</b>
<b>Documento preparato da</b>	<b>Dott.ssa Maria Bonachini</b>	<b>Responsabile Gestione Qualità</b>	
<b>Documento verificato da</b>	<b>Dott.ssa Emanuela Rossignoli</b>	<b>Direttore Tecnico</b>	

**COMMITTENTE:**

**DF PRODUZIONI S.a.S. di Capponi Diego & C**

**Via Lungo Romna, 51**

**24020 CASNIGO (BG)**

**LABORATORIO DI PROVA:**

**STUDIO AMBIENTE S.r.l.**

**Via Monte Baldo 4 – Airport Center**

**37062 DOSSOBUONO di VILLAFRANCA (VR)**

*NOTA: Studio Ambiente S.r.l. adotta un Sistema di Gestione per la Qualità certificato da Cermet (Reg. No 7173-A – vedi ALLEGATO 1) nell'esecuzione dei servizi di consulenza tecnica nei settori biomedicale farmaceutico ed industriale, dei servizi di laboratorio per analisi microbiologiche e fisiche e dello sviluppo di protocolli di validazione su prodotti processi ed ambienti produttivi.*

*NOTE: Studio Ambiente has a Quality Management System certified by Cermet (Reg. No 7173-A) for the execution of services of technical consultation in biomedical, pharmaceutical and industrial fields, laboratory services for microbiological and physical analyses, and development of validation protocols on products, production processes and production areas.*

## 2. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

L'Ozono è un gas incolore ad elevato potere ossidante che è in grado di rompere le membrane cellulari, base dell'integrità vitale delle cellule microbiche. Le caratteristiche antimicrobiche dell'ozono, in particolare le sue proprietà quale sanificante dell'aria, acqua, cibi e superfici sono da molti anni studiate e attestate dalla numerosa letteratura disponibile sull'argomento.

L'ozono è però un gas instabile, che non può essere conservato e deve essere prodotto al momento dell'uso.

Il committente *DF PRODUZIONI* produce e commercializza un apparecchio (BIO<sup>3</sup>GEN) per la produzione istantanea di ozono, idoneo alla disinfezione dell'aria ed alla purificazione dell'acqua.

Il committente intende verificare, attraverso una prova analitica, la reale efficacia dell'ozono prodotto dall'apparecchio BIO<sup>3</sup>GEN nel trattamento / disinfezione dell'acqua potabile.

Scopo della presente relazione è illustrare le metodiche adottate ed i risultati ottenuti nella prova analitica di verifica dell'efficacia disinfettante per l'acqua del prodotto BIO<sup>3</sup>GEN in oggetto.

## 3. DESCRIZIONE DELL'APPARECCHIO

L'apparecchio utilizzato per l'esecuzione della prova, così come di seguito identificato, è stato consegnato direttamente dal committente unitamente alle istruzioni d'uso (vedi ALLEGATO 2).

Nome: **GENERATORE di OZONO**

Modello: **BIO<sup>3</sup>GEN**

Lotto: **2011/12**

## 4. PROCEDURA DI PROVA

### 4.1. Generale

Per raggiungere lo scopo concordato con il committente si è creata una situazione di contaminazione microbica "estrema" (peggiorativa rispetto a quanto previsto per un'acqua potabile) di un determinato quantitativo d'acqua utilizzando ceppi microbici standard a titolo noto.

Si è quindi attivato l'apparecchio generatore di ozono ed a intervalli specificati, compatibilmente con le istruzioni d'uso del fabbricante, si sono eseguiti prelievi sul campione trattato.

E' stato quindi verificato l'abbattimento della carica microbica contaminante nel campione ai diversi intervalli di tempo, confrontandolo con la carica microbica contaminante inizialmente il campione.

### 4.2 Ceppi microbici

Per l'esecuzione della prova sono stati utilizzati i ceppi microbici di seguito riportati, conservati e gestiti conformemente a procedure operative interne Studio Ambiente.

Ceppo	ATCC	Condizioni di sviluppo
Staphylococcus aureus	ATCC 6538	Termostato (37 ± 1)°C, aerobiosi, 48 – 72 ore
Escherichia coli	ATCC 10536	Termostato (37 ± 1)°C, aerobiosi, 48 – 72 ore

### 4.3 Operatività

I ceppi sono stati subcoltivati in maniera da ottenere colture in fase di sviluppo. Da ciascuna di queste colture sono state prelevate ansate di cellule microbiche e con esse preparata una sospensione in fisiologica sterile contenente circa  $1 \times 10^7$  ufc/ml. Per conoscere l'esatto numero di microrganismi contenuti in ciascuna sospensione, 1 ml di questa è stato filtrato attraverso una membrana, in duplicato. Le membrane sono state trasferite in piastre contenenti idoneo terreno colturale e mantenute in termostato alle condizioni di sviluppo specificate. Al termine dello sviluppo è stato contato e registrato il numero di colonie cresciute su ciascuna membrana e determinato il numero di unità formanti colonie per millilitro (ufc/ml) di sospensione test (N).

Utilizzando 0,1 ml di ciascuna sospensione microbica è stata contaminata una bottiglia contenente 1000 ml di acqua potabile sterile in maniera da ottenere una concentrazione di contaminazione circa uguale a  $10^3$ , considerando tale un worst case process per l'acqua potabile. La concentrazione microbica nell'acqua è stata determinata per filtrazione in duplicato di 1 ml di acqua e successivo conteggio delle colonie; il numero di ufc/ml ottenuto è stato considerato quale valore di riferimento a tempo 0 (NT<sub>0</sub>).

Dopo la contaminazione è stata eseguita la purificazione dell'acqua contaminata mediante ozonizzazione, seguendo le istruzioni del fabbricante dell'apparecchio BIO<sup>3</sup>GEN di seguito dettagliate:

- ↻ BIO<sup>3</sup>GEN è stato collegato alla presa elettrica;
- ↻ il tubo in dotazione è stato collegato a pressione all'apparecchio;
- ↻ la pietra rotonda è stata inserita a pressione all'estremità del tubo;
- ↻ il tubo è stato immerso con la pietra all'interno della bottiglia;
- ↻ BIO<sup>3</sup>GEN è stato acceso ed è stato fatto funzionare per i seguenti tempi di contatto: **2, 5, 10 e 20 minuti.**

Allo scadere di ciascun tempo di contatto, sono state prelevate 2 aliquote di acqua da 1 ml ciascuna dalla bottiglia ed in esse è stata determinata la concentrazione di ufc/ml di microrganismi sopravvissuti (NT<sub>2</sub>, NT<sub>5</sub>, NT<sub>10</sub> e NT<sub>20</sub>).

## 5. RISULTATI E CONCLUSIONI

Le prove sono state iniziate il 17 aprile 2012 e si sono concluse il 27 aprile 2012. I risultati, espressi come ufc/ml e come riduzione percentuale rispetto al conteggio iniziale (T0), sono riassunti nelle tabelle sottostanti.

Ceppo	Cont. iniziale (N)	Cont. T0 (NT <sub>0</sub> )	Cont. 2 min (NT <sub>2</sub> )	Cont. 5 min (NT <sub>5</sub> )	Cont. 10 min (NT <sub>10</sub> )	Cont. 20 min (NT <sub>20</sub> )
<b>S. aureus</b> ATCC 6538	2,51 x 10 <sup>8</sup>	2,44 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0
<b>E. coli</b> ATCC 10536	8,0 x 10 <sup>7</sup>	9,6 x 10 <sup>3</sup>	0	0	0	0

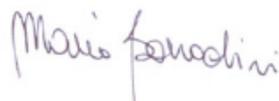
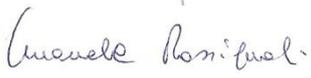
Riduzione percentuale				
Ceppo	2 minuti	5 minuti	10 minuti	20 minuti
<b>S. aureus</b> ATCC 6538	> 99,9%	> 99,9%	> 99,9%	> 99,9%
<b>E. coli</b> ATCC 10536	> 99,9%	> 99,9%	> 99,9%	> 99,9%

Come evidenziano i dati riportati nella tabella, si riscontra **una sostanziale diminuzione della carica microbica** contaminante l'acqua, sia di batteri gram positivi (S. aureus) che gram negativi (E. coli), dopo **2 minuti** di ozonizzazione.

## 6. ALLEGATI

1. Certificato del Sistema di Gestione per la Qualità di Studio Ambiente Reg. No 7173-A
2. Istruzioni per l'uso dell'apparecchio BIO<sup>3</sup>GEN

<b>Data conclusione emissione e verifica documento</b>	<b>02/05/2012</b>
--	-------------------

<b>Documentato preparato da</b>	<b>Dott.ssa Maria Bonachini</b> Resp. Gestione Qualità	
<b>Documento verificato da</b>	<b>Dott.ssa Emanuela Rossignoli</b> Direttore Tecnico	

*La presente relazione si riferisce esclusivamente ai campioni in oggetto. La riproduzione anche parziale del presente documento è consentita solo se autorizzata da Studio Ambiente Srl.*

## **VERIFICA DELL'EFFICACIA DEL GENERATORE DI OZONO BIO<sup>3</sup>GEN NEL TRATTAMENTO DI FRUTTA**

### **1. DATI AMMINISTRATIVI**

<b>Identificazione documento</b>	<b>RELAZIONE VARIA N. 36/2012</b>		
<b>Data emissione documento</b>	<b>01/08/2012</b>	<b>Data conclusione documento</b>	<b>01/08/2012</b>
<b>Documento preparato da</b>	<b>Dott.ssa Maria Bonachini</b>	<b>Responsabile Gestione Qualità</b>	
<b>Documento verificato da</b>	<b>Dott.ssa Emanuela Rossignoli</b>	<b>Direttore Tecnico</b>	

#### **COMMITTENTE:**

**DF PRODUZIONI S.a.S. di Capponi Diego & C**

**Via Lungo Romna, 51**

**24020 CASNIGO (BG)**

#### **LABORATORIO DI PROVA:**

**STUDIO AMBIENTE S.r.l.**

**Via Monte Baldo 4 – Airport Center**

**37062 DOSSOBUONO di VILLAFRANCA (VR)**

*NOTA: Studio Ambiente S.r.l. adotta un Sistema di Gestione per la Qualità certificato da Cermet (Reg. No 7173-A – vedi ALLEGATO 1) nell'esecuzione dei servizi di consulenza tecnica nei settori biomedicale farmaceutico ed industriale, dei servizi di laboratorio per analisi microbiologiche e fisiche e dello sviluppo di protocolli di validazione su prodotti processi ed ambienti produttivi.*

### **2. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE**

L'Ozono è un gas incolore ad elevato potere ossidante che è in grado di rompere le membrane cellulari, base dell'integrità vitale delle cellule microbiche. Le caratteristiche antimicrobiche dell'ozono, in particolare le sue proprietà quale sanificante dell'aria, acqua, cibi e superfici sono da molti anni studiate e attestate dalla numerosa letteratura disponibile sull'argomento.

L'ozono è però un gas instabile, che non può essere conservato e deve essere prodotto al momento dell'uso.

Il committente *DF PRODUZIONI* produce e commercializza un apparecchio (BIO<sup>3</sup>GEN) per la produzione istantanea di ozono, idoneo alla disinfezione dell'aria ed alla purificazione dell'acqua.

Il committente intende verificare, attraverso una prova analitica, la reale efficacia dell'ozono prodotto dall'apparecchio BIO<sup>3</sup>GEN nel lavaggio della frutta.

Scopo della presente relazione è illustrare le metodiche adottate ed i risultati ottenuti nella prova analitica di verifica dell'efficacia disinfettante del prodotto BIO<sup>3</sup>GEN in oggetto.

### 3. DESCRIZIONE DELL'APPARECCHIO

L'apparecchio utilizzato per l'esecuzione della prova, così come di seguito identificato, è stato consegnato direttamente dal committente unitamente alle istruzioni d'uso.

Nome: **GENERATORE di OZONO**

Modello: **BIO<sup>3</sup>GEN**

Lotto: **2011/12**

### 4. PROCEDURA DI PROVA

#### 4.1. Generale

Per raggiungere lo scopo concordato con il committente è stato verificato il livello di contaminazione microbica della buccia esterna di mele prima e dopo un trattamento di immersione in acqua ozonizzata con l'apparecchio test per un tempo di contatto definito e concordato con il committente, verificando l'abbattimento ottenuto.

#### 4.3 Operatività

5 mele, circa delle medesime dimensioni, sono state lavate manualmente sotto acqua corrente per 15 secondi. Quindi sono state posizionate ciascuna in un becker sterile contenente 400 ml di eluente (fisiologica + tween 80) sterile: 4 campioni sono sottoposti al trattamento (**campioni 1 – 4**) ed 1 è stata tenuta quale controllo positivo (**mela non trattata**).

In ciascun becker con il campione da trattare, è stato inserito l'erogatore di ozono ed azionato per **30 minuti**. Dopo questo trattamento, i becker sono stati posti in agitazione in maniera da garantire il distacco delle cellule microbiche dalla superficie esterna del campione. Quindi sono stati prelevati gli eluati da ciascun becker contenenti i campioni (trattati e non) e, dopo accurata miscelazione, filtrati per la determinazione della carica microbica presente. I filtri sono stati trasferiti su piastre di Triptone Soia Agar per la ricerca dei batteri aerobi ed anaerobi mediante incubazione a  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  per 5 giorni.

### 5. RISULTATI E CONCLUSIONI

Le prove sono state iniziate il 15 giugno 2012 e si sono concluse il 18 giugno 2012. I risultati, espressi come ufc/mela e come riduzione logaritmica e percentuale, sono riassunti nelle tabelle sottostanti.

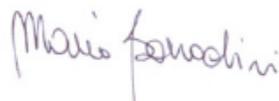
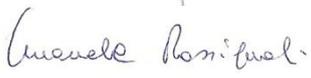
Campione	Conteggio (ufc/camp)	Logaritmo
Mela non trattata	1,60 x 10 <sup>3</sup>	3,20
Mela Campione 1	170	2,23
Mela Campione 2	149	2,17
Mela Campione 3	179	2,25
Mela Campione 4	115	2,06
Valore medio campioni 1 - 4		2,18
Riduzione logaritmica		1,02
Riduzione percentuale		90,04%

Come evidenziano i dati riportati nella tabella, si riscontra **una sostanziale diminuzione della carica batterica** contaminante la superficie esterna dei campioni, quando trattati con **30 minuti** di ozonizzazione.

## 6. ALLEGATI

1. Certificato del Sistema di Gestione per la Qualità di Studio Ambiente Reg. No 7173-A

<b>Data conclusione emissione e verifica documento</b>	<b>01/08/2012</b>
--	-------------------

<b>Documentato preparato da</b>	<b>Dott.ssa Maria Bonachini</b> Resp. Gestione Qualità	
<b>Documento verificato da</b>	<b>Dott.ssa Emanuela Rossignoli</b> Direttore Tecnico	

*La presente relazione si riferisce esclusivamente ai campioni in oggetto. La riproduzione anche parziale del presente documento è consentita solo se autorizzata da Studio Ambiente Srl.*



Biomedical

**Questo locale viene  
sanificato  
quotidianamente  
mediante il generatore  
di Ozono Bio<sup>3</sup>Gen**

**BIO<sup>3</sup>GEN**  
protezione totale