

**Relazione concernente l'effetto disinfettante
dell'Anolyte prodotto dal dispositivo Envirolyte EL-600
dell'Envirolyte Industries International ltd. di
Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli**

Istituto per l'Igiene e l'Ambiente,
Steinstraße 10, D-33457 Lollar, Germania

Dr. J. Prucha

Cliente:
Envirolyte Industries International ltd., Tallinn

Relazione Nr. G01-198a.tmd
Lollar, 02.08.2001

Realizzazione della prova

Per effettuare le prove abbiamo ricevuto dal Sig. van Schaik una soluzione Anolyte con una concentrazione di cloro libero di 265 mg/l. Questo Anolyte è stato prodotto con il dispositivo Envirolyte 600.

Al fine di fornire un'applicazione pratica, per i test di prova sono stati da noi utilizzati gli organismi

- Escherichia coli e
- Pseudomonas aeruginosa

e come di consueto il nostro laboratorio ha analizzato campioni di acqua isolati cresciuti in Caso-Boullion. Diluendo le sospensioni di prova così ottenute con soluzione salina sterile e fisiologica, è stata prodotta la soluzione batterica necessaria per le prove. Per tutti gli approcci sperimentali è stata utilizzata acqua del rubinetto della città di Lollar.

Esperimenti con Anolyte senza batteri di prova (blind test)

Gli esperimenti sono stati condotti in un becher da 2 litri. Questo è stato riempito con 1500 ml di acqua di rubinetto. Innanzitutto, la serie di esperimenti è stata eseguita senza aggiunta di batteri. In seguito, è stata realizzata una serie di test senza batteri con diverse concentrazioni di cloro libero di

- ca. 0,5 mg / l

e

- ca. 0,1 mg / l

con l'aggiunta dell'Anolyte.

Dopo un minuto, sono stati prelevati 100 ml di campione per la misurazione della concentrazione di

- cloro libero,

- cloro combinato e

- cloro complessivo.

Esperimenti con batteri e Anolyte e test di prova

Gli esperimenti sono stati effettuati nello stesso becher da 2 litri, come gli esperimenti senza batteri. Il bicchiere è stato riempito con 1500 ml di acqua di rubinetto e infine è stato aggiunto il volume della sospensione batterica necessaria opportunamente diluita con la concentrazione desiderata dei batteri di *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*.

Prima dell'aggiunta dell'Anolyte sono stati presi 100 ml di prova per definire la concentrazione batterica iniziale. Poi, al fine del raggiungimento della concentrazione desiderata sono state aggiunte date quantità di cloro libero di

- 0,5 mg / l
- 0,1 mg / l

con il volume richiesto di Anolyte. Poi, dopo

- 1 minuto,
- 5 minuti
- 10 minuti
- 30 minuti
- 60 minuti

sono stati prelevati 100 ml di campione per la misurazione della concentrazione di

- cloro libero,
- cloro combinato e
- cloro complessivo.

Inoltre, sono stati prelevati altri 100 ml di campione

- per il rilevamento di *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* in 100 ml e
- per il conteggio dei batteri.

A questo secondo campione è stato aggiunto subito dopo il prelievo del sodio tiosolfato, un reagente che distrugge il cloro libero, al fine di escludere la possibilità che il cloro libero potesse rimanere efficace anche dopo il prelievo.

Coltivazione e rilevazione dei batteri di prova e determinazione del numero di batteri

Per eseguire il conteggio del numero di batteri della diluizione che va da 1:10 a 1:10¹⁰ è stato versato su agar nutriente 1ml di ciascuna diluizione, le piastre di agar nutritivo così ottenute sono state incubate a 36° C e dopo due giorni sono state contate le colonie cresciute. La rilevazione di *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* è stata effettuata con brodo di lattosio e brodo di malachite verde e in caso di reazione positiva dopo 2 giorni di incubazione a 36° C c'era ancora una placatura sull'endo-agar o sull'agar cetrimide.

Nel caso dei batteri di prova *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* è stata identificata per ciascuno una concentrazione

di batteri *Escherichia coli* di

- 66000 fino a 100000 UFC/100 ml (alta concentrazione batterica)

di *Pseudomonas aeruginosa*

- Circa 5000 fino a 8.000/100 ml (media concentrazione batterica)

A ciascuno degli organismi di prova sono stati aggiunti negli esperimenti i livelli iniziali di cloro libero

- 0,1 mg / l

e

- 0,5 mg / l.

Nelle pagine che seguono sono mostrati i primi risultati degli esperimenti senza organismi di prova e poi i risultati di esperimenti con *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Metodo applicato

Tutte le prove e le misurazioni qui descritte sono state eseguite secondo le norme DIN (Istituto Tedesco per la Normativa) seguenti:

Determinazione del cloro libero e combinato:	DIN 38408 G4
Determinazione del numero totale delle colonie:	DIN 38411 K5
Prova di Escherichia coli:	DIN 38411 K6
Prova di Pseudomonas aeruginosa:	DIN 38411 K8

Risultati

Tab. 1: Regolazione della concentrazione di cloro libero mediante aggiunta di soluzione Anolyte**Inizio: 1.500ml di acqua****Quantità data di Anolyte: 3,0 ml**

Parametro	Unità	Risultato dopo un minuto dall'aggiunta di Anolyte		
		Approccio 1	Approccio 2	Approccio 3
Cloro libero	mg/l	0,48	0,49	0,49
Cloro combinato	mg/l	0,00	0,00	0,00
Cloro complessivo	mg/l	0,48	0,49	0,49

Inizio: 1.500ml di acqua**Quantità data di Anolyte: 1,05 ml**

Parametro	Unità	Risultato dopo un minuto dall'aggiunta di Anolyte		
		Approccio 1	Approccio 2	Approccio 3
Cloro libero	mg/l	0,08	0,10	0,11
Cloro combinato	mg/l	0,00	0,00	0,00
Cloro complessivo	mg/l	0,08	0,10	0,11

Tab. 2: Parametri chimico-fisici e microbiologici della sperimentazione con *Escherichia coli* in funzione del tempo

Concentrazione di *Escherichia coli*: **80.000 UFC/100 ml**
 Area di concentrazione del cloro: **0,5 mg/l**

Parametri	Unità	Acqua del rubinetto dopo l'aggiunta dei batteri	Sperimentazione con acqua del rubinetto e germi dopo l'aggiunta dell'Analyte				
			dopo la miscelazione	dopo 1 minuto	dopo 5 minuti	dopo 10 minuti	dopo 30 minuti
Cloro libero	mg/l	0.00	0,46	0,45	0,44	0,30	0,27
Cloro combinato	mg/l	0,00	0,01	0,02	0,02	0,04	0,05
Cloro complessivo	mg/l	0,00	0,47	0,47	0,46	0,34	0,32
100 ml della miscela in brodo di lattosio		pos	neg	neg	neg	neg	neg
Placcatura su endo.agar		pos	neg	neg	neg	neg	neg
Numero di colonie in 1 ml a 36 °C	UFC per 1 ml	800	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> in 100 ml	UFC per 100 ml	80.000	0	0	0	0	0

Tab. 3: Parametri chimico-fisici e microbiologici della sperimentazione con *Escherichia coli* in funzione del tempo

Concentrazione di *Escherichia coli*: **81.000 UFC/100 ml**
 Area di concentrazione del cloro: **0,1 mg/l**

Parametri	Unità	Acqua del rubinetto dopo l'aggiunta dei batteri	Sperimentazione con acqua del rubinetto e germi dopo l'aggiunta dell'Analyte				
			dopo la miscelazione	dopo 1 minuto	dopo 5 minuti	dopo 10 minuti	dopo 30 minuti
Cloro libero	mg/l	0,00	0,11	0,11	0,10	0,04	0,01
Cloro combinato	mg/l	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,05
Cloro complessivo	mg/l	0,00	0,11	0,11	0,11	0,07	0,06
100 ml della miscela in brodo di lattosio		pos	pos	neg	neg	neg	neg
Placcatura su endo.agar		pos	pos	neg	neg	neg	neg
Numero di colonie in 1 ml a 36 °C	UFC per 1 ml	810	3	0	0	0	0
Escherichia coli in 100 ml	UFC per 100 ml	81.000	300	0	0	0	0

Valutazione della serie di test con *Escherichia coli* in una concentrazione batterica di circa 81.000 UFC/100 ml.

Dopo la serie di test con la nuova soluzione di Anolyte non si è rilevato alcun batterio alla concentrazione di cloro di 0,5 mg/l già dopo 1 minuto in 100 ml.

Alla concentrazione di cloro iniziale di 0,10 mg/l, i 100 ml di approccio sperimentale in brodo di lattosio e la corrispondente placcatura di endo-agar hanno mostrato una reazione positiva. In 1 ml di approccio sperimentale dopo 1 minuto non era rilevabile alcun batterio.

Tab. 4: Parametri chimico-fisici e microbiologici della sperimentazione con *Pseudomonas aeruginosa* in funzione del tempoConcentrazione di *Pseudomonas aeruginosa*: **5.800 UFC/100 ml**Area di concentrazione del cloro: **0,5 mg/l**

Parametri	Unità	Acqua del rubinetto dopo l'aggiunta dei batteri	Sperimentazione con acqua del rubinetto e germi dopo l'aggiunta dell'Analyte				
			dopo la miscelazione	dopo 1 minuto	dopo 5 minuti	dopo 10 minuti	dopo 30 minuti
Cloro libero	mg/l	0,00	0,48	0,45	0,38	0,25	0,18
Cloro combinato	mg/l	0,00	0,01	0,02	0,03	0,03	0,05
Cloro complessivo	mg/l	0,00	0,49	0,47	0,41	0,28	0,23
100 ml di miscela in brodo di malachite verde		pos	neg	neg	neg	neg	neg
Placcatura su agar ceftrimide		pos	neg	neg	neg	neg	neg
Numero di colonie in 1 ml a 36 °C	UFC per 1 ml	58	0	0	0	0	0
Ps. aeruginosa in 100 ml	UFC per 100 ml	5.800	≥ 1 <100	0	0	0	0

Tab. 5: Parametri chimico-fisici e microbiologici della sperimentazione con *Pseudomonas aeruginosa* in funzione del tempo

Concentrazione di *Pseudomonas aeruginosa*: 8.200 UFC/100 ml

Area di concentrazione del cloro: 0,1 mg/l

Parametri	Unità	Acqua del rubinetto dopo l'aggiunta dei batteri	Sperimentazione con acqua del rubinetto e germi dopo l'aggiunta dell'Analyte				
			dopo la miscelazione	dopo 1 minuto	dopo 5 minuti	dopo 10 minuti	dopo 30 minuti
Cloro libero	mg/l	0,00	0,11	0,08	0,05	0,03	0,02
Cloro combinato	mg/l	0	0,00	0,03	0,04	0,05	0,06
Cloro complessivo	mg/l	0	0,11	0,11	0,09	0,08	0,08
100 ml di miscela in brodo di malachite verde		pos	pos	neg	neg	neg	neg
Placcatura su agar ceftrimide		pos	pos	neg	neg	neg	Neg
Numero di colonie in 1 ml a 36 °C	UFC per 1 ml	82	2	0	0	0	0
Ps. aeruginosa in 100 ml	UFC per 100 ml	8.200	200	0	0	0	0

Valutazione della serie di test con media concentrazione batterica di *Pseudomonas aeruginosa*

Dopo la serie di test con media concentrazione batterica di *Pseudomonas aeruginosa* già dopo 1 minuto non si è rilevato alcun batterio alla concentrazione di cloro di 0,5 mg/l in 100 ml. Alla concentrazione iniziale più bassa equivalente a 0,11 mg/l la sperimentazione mostra dopo un tempo di reazione di 1 minuto in brodo di malachite verde una reazione positiva e sono state rilevate 2 colonie in 1 ml. Dopo un tempo di reazione di 5 minuti in 100 ml non si rilevava più alcun batterio.

Valutazione

Per l'esame dell'effetto disinfettante dell'"Anolyte" (prodotto con il dispositivo Envirolyte EL-600) sono state svolte delle indagini sugli organismi di prova.

- *Escherichia coli* e
- *Pseudomonas aeruginosa*

che sono stati testati a due diverse concentrazioni di cloro. Con lo scopo di una applicazione pratica, gli organismi di prova di cui sopra sono stati isolati in campioni da laboratorio come di consueto e sono stati coltivati; per gli esperimenti è stata utilizzata l'acqua del sistema idrico della città di Lollar.

I risultati di vari esperimenti con la soluzione "Anolyte" hanno dimostrato che l'"Anolyte" preso in esame è in effetti un efficace disinfettante.

Gli esperimenti con il batterio di prova *Escherichia coli* hanno dimostrato che con una concentrazione di Anolyte con cloro libero nel range di 0,5 mg/l in una concentrazione di batteri di 80.000 UFC/100 ml già dopo un tempo di reazione di 1 minuto si ha come risultato la completa distruzione dei batteri. Tuttavia ad una concentrazione di cloro libero nel range di 0,1 mg/l aumenta il tempo di disinfezione di una elevata concentrazione di *Escherichia coli* e raggiunge i 5 minuti. Questa scoperta conferma i risultati del primo studio (vedi relazione G00-345d.tmd) in cui *Escherichia coli* a più elevate concentrazioni in più bassa concentrazione di cloro libero veniva completamente distrutta dopo 5 minuti.

Anche negli esperimenti con il batterio di prova *Pseudomonas aeruginosa* sono stati confermati i risultati del primo studio (vedi relazione G00-345d.tmd). Con una concentrazione di Anolyte con cloro libero nel range 0,5 mg/l in una concentrazione media di *Pseudomonas aeruginosa* equivalente a 5.800 UFC/100 ml si verifica una completa distruzione già dopo 1 minuto; anche a concentrazioni minori in cloro libero nel range di 0,1 mg/l si verifica una completa disinfezione, ma dopo 5 minuti.