

Spett.le
Progetto Clima snc
Via delle Calabrie 33
Fuorni di Salerno

Fisciano, 3 ottobre 2014

Oggetto: trasmissione relazione preliminare su prove sperimentali effettuate su sistema PCO-001

Si trasmette relazione preliminare riguardante le prove effettuate con VS sistema PCO-001, come da allegato tecnico A facente parte dell'offerta tecnica per prove conto terzi ordinateci in data 17 settembre 2014.

Si rammenta che tale relazione NON costituisce né comunicazione definitiva dei risultati NÉ ha valore di certificazione. Come da punto D. del regolamento per le prestazioni conto terzi, infatti, la relazione ufficiale sui risultati delle prove sarà prodotta solo in seguito al pagamento della prestazioni effettuate, e sarà rilasciato in bollo su esplicita richiesta del committente.

Con i migliori saluti,



Francesco Murra

Responsabile della sperimentazione
Professore aggregato
di Principi di Ingegneria Chimica Ambientale

Relazione preliminare sui risultati dei test microbiologici allestiti per valutare la capacità microbicide del dispositivo PCO-001 Progetto Clima, Salerno.

Fisciano, SA, 3 ottobre 2014

1. Introduzione e descrizione degli esperimenti

Per valutare l'attività microbicide del dispositivo PCO-001 su microrganismi diversi come batteri, lieviti e muffe e sulla carica microbica presente nell'aria, sono stati predisposti due diversi test microbiologici.

Test n° 1

Il test è stato allestito in un locale chiuso (non ermeticamente)avente una cubatura di circa 35 m³. In questo ambiente, sono state effettuate prove di contaminazione di terreni di coltura agarizzati, sterili o inoculati con i microrganismi prescelti (vedi di seguito sez. Microrganismi impiegati) in capsule Petri.

Con il solo terreno sterile (vergine) si è voluta monitorare la carica microbica presente nell'ambiente sia in presenza che in assenza di PCO-001 dove la prima rappresenta il controllo della prova.

Nel secondo caso, cioè quando veniva utilizzato il terreno di coltura previamente inoculato con un microrganismo, è stata saggiata la capacità del dispositivo di abbattere la carica microbica iniziale di una matrice contaminata. Il controllo, in questo caso, era effettuato con capsule Petri inoculate e mantenute chiuse per evitare la contaminazione del terreno agarizzato con microrganismi presenti nell'aria, tenute a temperatura controllata (25 °C) in assenza del dispositivo PCO-001. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato.

Disposizione delle piastre

Come riportato in figura 1, le piastre sono state collocate in punti ritenuti strategici per la valutazione del grado di abbattimento della contaminazione microbica.

Per il test sono stati considerati diversi tempi di trattamento con il dispositivo PCO-001e più precisamente i tempi di 1, 4, 8 e 24 h.

Prima di eseguire l'esperimento il dispositivo PCO-001 è stato fatto fluire nell'ambiente di lavoro per un tempo di almeno 24 h.

Prove di fluidodinamica

Nella configurazione del test n.1, è stata valutata la capacità della soffiante installata di movimentazione dell'aria: tale valutazione si è avvalsa dell'utilizzo di un sistema di velocimetria di particelle per immagini, composto da un emettitore laser a diodi (Firefly, Oxford Laser

illuminazione (pco.1300, PCO AG, Germania) con un obiettivo Nikon 50 mm (f/1.4 G, Nikon, Giappone).

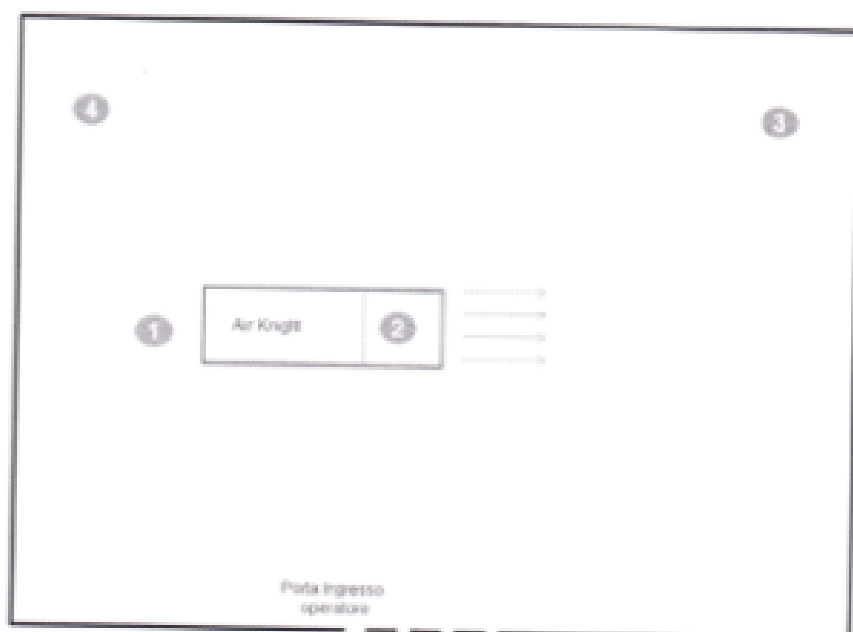


Figure 1. Rappresentazione schematica della disposizione delle capsule di Petri (figura non in scala). Posizione 1: ingresso soffiante all'esterno del dispositivo; posizione 2: all'interno del dispositivo sotto il sistema catalitico; posizione 3: angolo ambiente davanti alla soffiante; posizione 4: angolo ambiente dietro la soffiante.

Test n°2

Questo test è stato eseguito con piastre inoculate (con un numero noto di colonie di *E. coli*), poste in un ambiente confinato di cubatura limitata ($\approx 0.1 \text{ m}^3$) come illustrato in figura 2 e sottoposte all'azione del sistema catalitico + soffiante della potenza di 3 W.

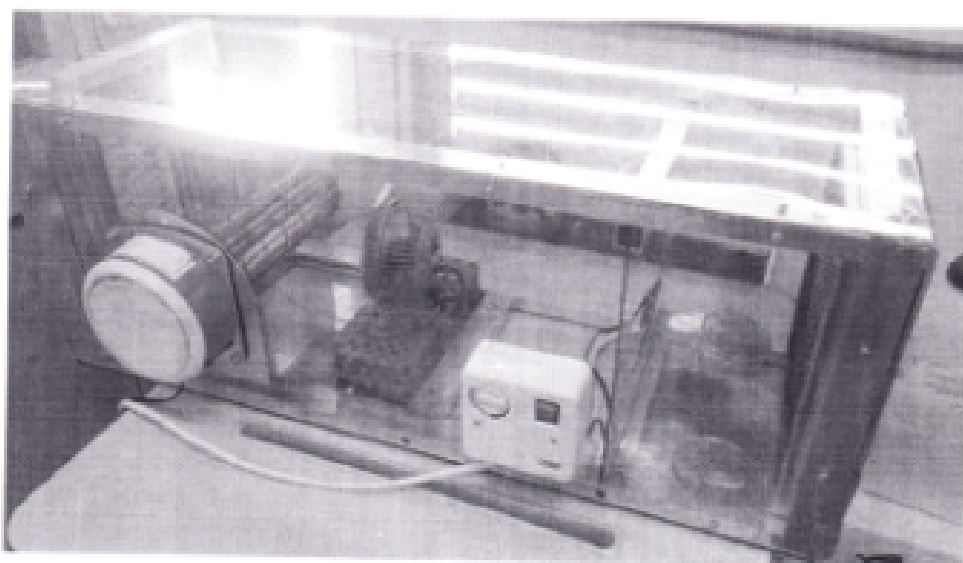


Figure 2 Allestimento test n° 2

Le piastre sono state collocate ad una distanza di circa 50 cm dal sistema catalitico.

Per il test sono stati presi in considerazione differenti tempi di trattamento e più precisamente 1, 4, 8 e 24 h. Tutte le prove sono state effettuate in duplicato.

Prima di eseguire l'esperimento il dispositivo PCO-001 è stato fatto fluire nell'ambiente di lavoro per un tempo di almeno 24 h.

2. Microrganismi

In via preliminare, per i test di attività microbica del dispositivo PCO-001, sono stati presi in considerazione tre microrganismi rappresentativi dei gruppi microbici precedentemente menzionati, ovvero batteri, lieviti e muffe. Più precisamente, per i batteri è stato utilizzato *Escherichia coli*, e due forme fungine una unicellulare, *Saccharomyces cerevisiae* e l'altra miceliare, *Aspergillus niger*, per i lieviti e le muffe rispettivamente. Tenendo conto che la struttura cellulare dei microrganismi prescelti è paragonabile a quella di patogeni appartenenti agli stessi raggruppamenti la loro resistenza all'azione microbica del dispositivo PCO-001 è stata considerata indicativa.

Specifiche dei microrganismi impiegati:

- *Escherichia coli* DH5 α
- *Saccharomyces cerevisiae* 168/9. Ceppo industriale isolato dal panetto di lievito nel laboratorio BiotechInMicro dell'Università degli Studi di Salerno
- *Aspergillus niger* ATCC 3642

3. Terreno di coltura

Per la crescita delle forme microbiche prescelte è stato usato un unico tipo di terreno di coltura, noto come YEPD, capace di garantire la proliferazione di un ampio spettro di microrganismi noto come YEPD e avente la seguente composizione: yeast extract (1% p/v), peptone (2% p/v), glucosio (2% p/v).

Risultati Test 1

Prove effettuate con terreno YEPD vergine:

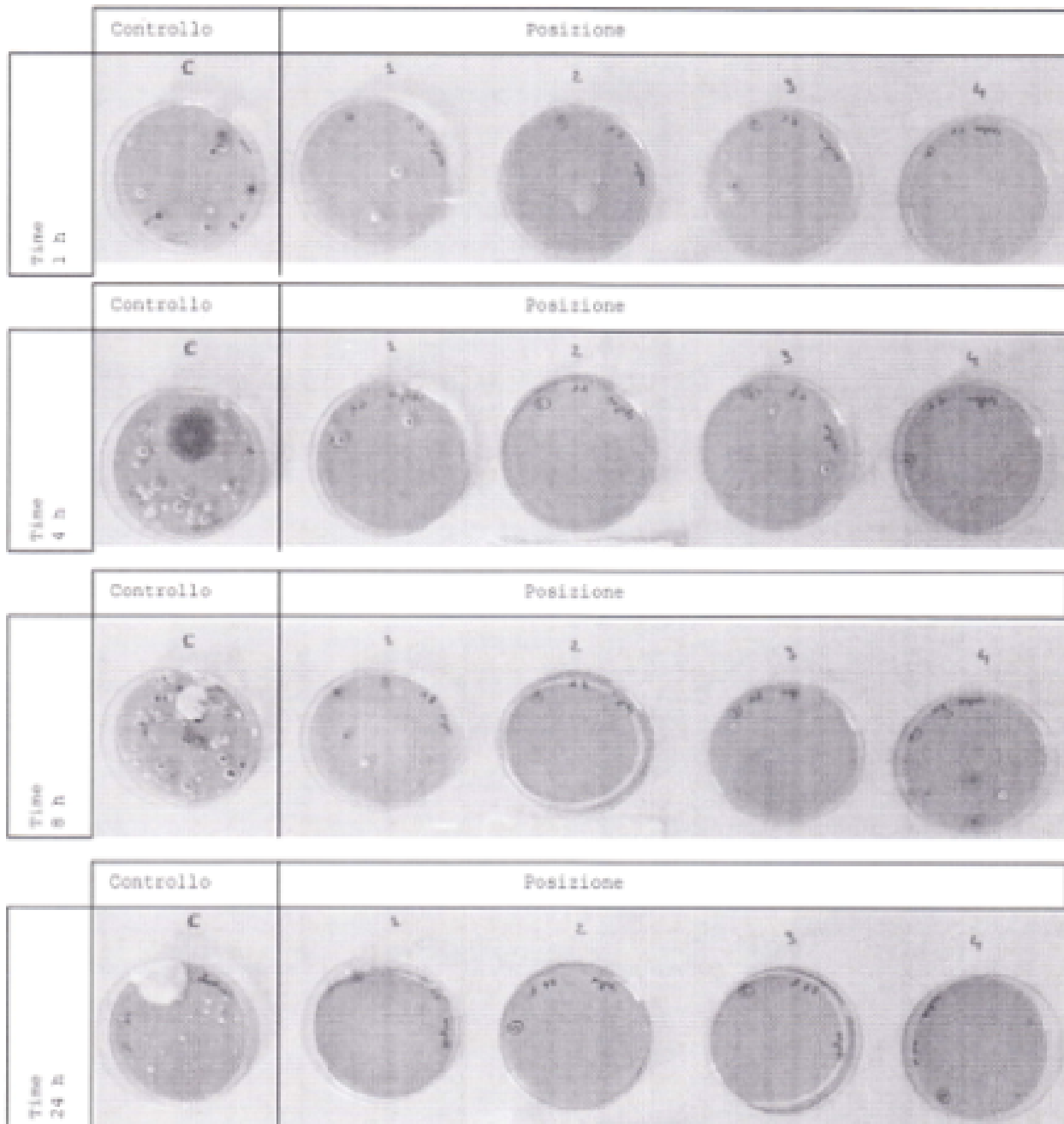


Figura 3. Capsule Petri contenenti terreno YEP agarizzato e non inoculato (sterile a $t=0$) a diversi tempi di esposizione all'azione di PCO-001, nelle posizioni illustrate in figura 1. Il controllo è rappresentato dalla capsula lasciata nello stesso ambiente e per lo stesso tempo con PCO-001 inattivo. Tutte le piastre sono state osservate dopo effettive 48 h di incubazione a temperatura ambiente (25 °C) a valle del trattamento.

Prove effettuate inoculando le piastre con microrganismi:

Escherichia coli

	Posizione	Time [h]			
		1	4	8	24
CFU	1	360	404	350	74
	2	8	0	0	0
	3	444	374	288	0
	4	400	292	276	176
	Controllo	412			

Saccharomyces cerevisiae

	Posizione	Time [h]			
		1	4	8	24
CFU	1	28	17	13	18
	2	21	0	0	0
	3	26	26	36	7
	4	32	33	33	24
	Controllo	33			

Aspergillus niger

	Posizione	Time [h]			
		1	4	8	24
CFU	1	74	83	82	55
	2	84	63	0	0
	3	81	83	89	27
	4	85	83	75	47
	Controllo	83			

Figura 4. Unità formanti colonia (CFU) cresciute su terreno agarizzato nelle diverse posizioni nell'ambiente di trattamento. Il controllo è rappresentato dal numero di colonie cresciute su piastre lasciate chiuse in ambiente sterile senza l'azione di PCO-001e incubate a 25 °C.

Stima della disidratazione del terreno agarizzato contenuto nelle piastre:

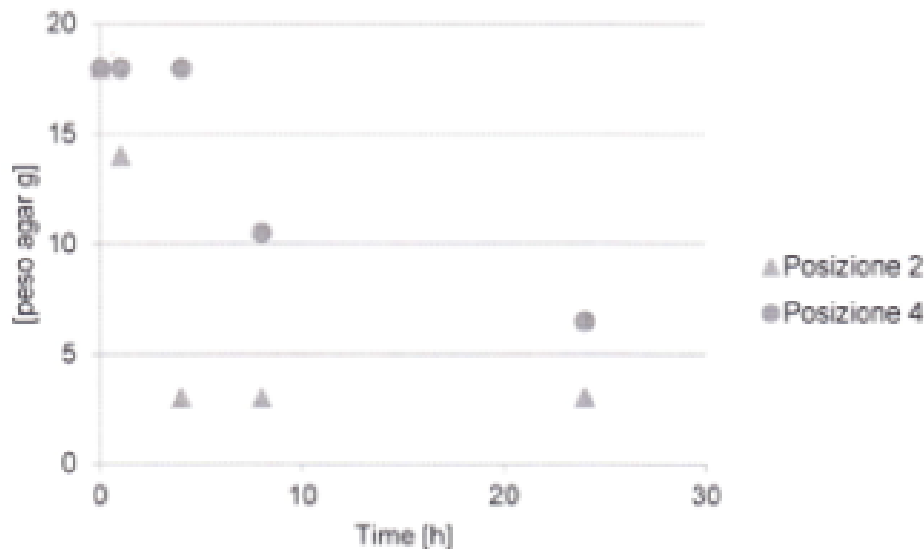


Figure 5. *Stima del peso dell'agar all'interno della capsula di Petri durante il trattamento con PCO-001. Nel grafico sono monitorati i cali di peso dell'agar nelle posizioni 2 e 4 (vedi figura 1) rappresentando esse, rispettivamente, la più e la meno favorita posizione per lo scambio di materia.*

Il calo di peso è dovuto a fenomeni di essiccamento (disidratazione) del terreno per esposizione all'aria in movimento per effetto della soffiante. Le prove fluidodinamiche hanno evidenziato che nell'intero ambiente utilizzato negli esperimenti si stabiliscono condizioni di turbolenza (non solo come regime di moto in sé ma soprattutto come risultato della rottura dei profili di velocità a causa della configurazione del modulo di trattamento e all'incrocio di flussi di aria che si stabiliscono all'interno del volume di controllo. Nelle aree meno esposte all'azione della soffiante sono state registrate velocità minime dell'ordine di centimetri al secondo. Dal punto di vista della crescita microbica si considerano dati attendibili, ovvero non inficiati dalla presenza di poca acqua nel mezzo agarizzato, le piastre con peso superiore a 10 g, ovvero fino a 1 h nelle zone più esposte all'azione della soffiante (Posizione 1 e 2) e fino a 8 h per quelle meno esposte (Posizione 2 e 4), ovvero per tempi e posizioni per cui il contenuto d'acqua residuo del terreno agarizzato è ancora compatibile con la proliferazione cellulare almeno di una muffa.

Trattamento delle piastre essiccate, "crescita cellulare per inclusione su terreno agarizzato fresco":

Per verificare che nelle piastre con un peso inferiore a 10 g l'assenza di crescita fosse dovuta a morte cellulare e non a semplice inattivazione per mancanza di acqua, queste sono state ricoperte con terreno fresco versandovi sopra YEPD agarizzato liquido a 45 °C. Il test è stato condotto per le piastre inoculate con *E. coli* ed *S. cerevisiae*.

Tale esperimento ha permesso di concludere che non vi è un incremento del numero di colonie a seguito del trattamento con agar liquido e quindi che l'inattivazione delle cellule è irreversibile.

Risultati Test 2

Escherichia coli

		Time [h]			
		1	4	8	24
CFU	PCO-001	8	0	0	0
	Controllo	164			

Figure 6. Numero di unità formanti colonia (CFU) corrispondenti a cellule microbiche cresciute su terreno agarizzato su piastre sottoposte a trattamento con PCO-001. Il controllo è rappresentato dal numero di colonie cresciute su piastre lasciate chiuse in ambiente sterile senza l'azione di PCO-001.

Osservazioni:

- Il peso dell'agar a fine trattamento è leggermente inferiore a 10 g (limite fissato al sotto del quale il dato non viene considerato attendibile - vedi stima della disidratazione in "test 1") solo nel caso a 24 h di trattamento. Il peso medio dell'agar dopo 24 h risulta essere 9.5 g.
- Le piastre sono state controllate, a seguito del trattamento, dopo 72 e 96 h (oltre che dopo 48 h per la lettura delle cellule superstiti) ed è stata notata, per tutti i tempi di trattamento, la presenza sporadica di inquinamento dovuto molto probabilmente a muffe presenti nell'aria (vedere figura 7).

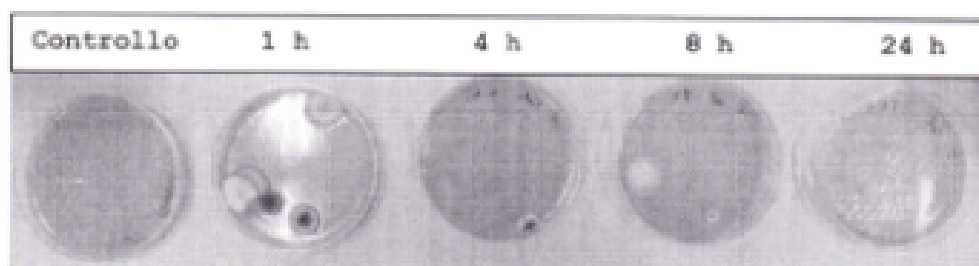


Figure 7. Osservazione delle piastre Petri 96 h dopo il trattamento con PCO-001 ai diversi tempi. Piastre inizialmente inoculate con *E. coli*, si osserva per effetto del trattamento vi è un drastico abbattimento della carica batterica inizialmente inoculata ma viene riscontrata proliferazione di muffe presenti nell'ambiente dell'esperimento che dunque sono attive nonostante l'azione di PCO-001.

Analisi e discussione dei dati

Il test n°1 è eseguito con solo terreno di coltura vergine (figura 3) per la valutazione della capacità microbica del sistema PCO-001 sull'aria e su matrici contaminate con microrganismi noti in un ambiente di grandi dimensioni. I risultati evidenziano che:

- la carica microbica depositata sulle piastre contenenti terreno agarizzato durante il trattamento con PCO-001 è nettamente inferiore a quella che si deposita quando nell'ambiente non è presente il dispositivo. La differenza di contaminazione tra il campione ed il controllo è risultata tanto più marcata quanto maggiore era il tempo esposizione delle piastre. E' possibile stimare che dopo 24 ore di trattamento la carica microbica (trattasi in prevalenza di muffe normalmente presenti nell'ambiente) riscontrata sul terreno agarizzato in presenza di PCO-001 è circa 100 volte inferiore (2 log) a quella del controllo cioè a quella presente su di una piastra lasciata nello stesso ambiente ma non in presenza della macchina.

Il test n° 1 eseguito con terreno di coltura inoculato con un numero noto di cellule di tre diversi microrganismi (figura 4) per valutare la capacità microbica del sistema PCO-001 su superfici solide contaminate in un ambiente di grandi dimensioni ha evidenziato che:

- ad eccezione della posizione n°2 e del test a 24 h, non è possibile riscontrare una significativa capacità microbica del Sistema PCO-001, in quanto laddove si verifica assenza di crescita non è possibile stabilire se questa sia dovuta all'essiccamento conseguente al continuo flusso d'aria o effettivamente all'azione della macchina.

Il test n°2 eseguito su piastre inoculate con un numero noto di colonie di *E. coli* trattate in un ambiente di dimensioni ridotte con una soffiante di potenza contenuta ha permesso di valutare l'efficacia del dispositivo in queste condizioni su una forma batterica. Infatti anche per tempi brevi di trattamento (1 h) si ha una drastica riduzione della carica microbica. È possibile affermare con certezza che dopo 4 h di trattamento si ha un abbattimento pressoché totale della carica microbica inoculata al tempo zero.