drinkthewater 🚥

Sviluppo Tecnologie Innovative per l'Ambiente

High efficiency low power consumption system used to sanitise and make water drinkable by means of filter ozone processes

- Target users:

- civil protection authorities
- army forces
- schools and public concerns
- work sites in difficult area
- hospitals and ER units in difficult areas or war zones
- food and drink manufacturers who need sanitising fluids (milk, fruit juices etc)
- mollusc culture businesses
- public and private communities
- all firms which need sterile or sanitised water for various uses (to clean butcher's counters, hospital wards)

Foreword

Making water drinkable has become a primary requirement in many Countries throughout the World; in fact, access to fresh water is only the first step towards a minimum quality of life that uses water mainly for drinking purposes without contraindications due to poor quality water which microbes use as a dissemination agent which can lead to serious health disorders (dysentery, gastroenteritis, typhoid and others even worse).

Water must therefore readily available, used primarily for drinking, it must not contain pathogens of any kind which are able to damage the health of those drinking it.

This simple trilogy often stops as early as the 'readily available' aspect as water is becoming increasingly scarce and what there is, is often not drinkable.

Many travellers, workers, soldiers have found themselves in conditions of severe and sometimes fatal health disorders due to ingestion of bacteriologically contaminated water. Millions of people are forced to drink from uncontrolled sources every day while working contracting illnesses caused by the infected water.

In "civilized" countries, which are in minority, there is not generally any shortage of water and all required monitoring tests are conducted by public or private concerns to ensure its quality; but in the Rest of the World (the majority) these tests do not exist which generates a long sequence of tragic events that cause death in the populations (particularly children).

The control of water sources is strategic in every country in the world, especially where there are wars in progress.

In fact, where there are no general regulations, water is:

- sometimes available and sometimes not
- poisoned
- is not drinkable because nobody has disinfected it.

Reduce the risk of consuming "non-drinkable" or microbiologically contaminated water

It is certainly possible to drastically reduce, until it virtually disappears, the risk of drinking infected or non-potable water. During natural disasters, military actions or on construction sites located in difficult areas, the water is purified beforehand to prevent the inconveniences caused by bacterial infections: Generally they use a salt or a solution of chlorine or iodine which is added to the water in varying concentrations or, in more sophisticated systems, they use chlorine gas generators which guarantee the absence of pathogenic micro-organisms in the water. Other systems use ozone, the oxidant gas par excellence, considered the best bactericidal agent in the world.

Whilst there may be problems getting supplies of chlorine or iodine tablets in underprivileged countries whose waters need purifying, ozone is easy to produce and only needs electricity.

For some time now technology has provided solar systems which are able to generate from 1 to 100 kw/h. at low costs, rendering the system independent from the normal circuit equipment connected to a photovoltaic system.

There is hence the possibility of using ozone to purify water that is bacteriologically polluted which greatly reduces the risk of drinking contaminated water and the risk of high numbers of users being afflicted by severe intestinal life threatening diseases.

Producing ozone with lower energy consumption

A team of Italian researchers coordinated by Prof. Paolo Broglio Scientific Director of Ecologia Applicata - Scientific Organisation for Environmental Research in Milan and Development of Innovative Technologies for the Environment, has created an ozone generator which is capable of producing 30 g/h using about 100 watts (the consumption of a light bulb).

This result has been certified by the Milan Polytechnic - Institute of Electrical Technologies and finally establishes an important moment in the evolution of this technology.

Dissolving ozone in water

If the objective is to purify the water, the ozone must be dissolved in the water up to its maximum saturation level which is compatible with the temperature and pressure. Ozone does not disperse easily in water because of its chemical instability characteristics, and at a temperature of 20° C with relative atmospheric pressure, it reaches a maximum concentration ranging between 3-5 mg/l. This amount, however, is adequately sufficient to ensure good levels of purification and, in optimal conditions, even the sterilisation of the water (sterilisation = zero micro-organisms of any kind, pathogenic or not in a litre of water). In practice, 0.5 mg/l of dissolved ozone is sufficient to destroy all kinds of bacteria in few seconds and inhibit and destroy viruses.

It is therefore essential to "dissolve" the ozone in the water as efficiently as possible.

The research team has also reached this second objective, creating a special diffuser which is able to "nebulise" the ozone in the water ensuring extremely high performance.

Two things to realize a third: Drinkthewater ®

The possibility of using next-generation very low power consuming ozone generators and special diffusers able to "dissolve" the ozone in the water makes it possible to implement a simple water purification system which can be installed in every corner of the Earth.

This system is called Drinkthewater ®

In a fourth container (3x2.4xH2.5 m) there is a condenser system which can treat 9,000 litres/hour of water with high ozone content and can sustain a concentration of 3-5 mg/l of ozone for at least 20-30 minutes, without altering the taste of the perfectly disinfected water.

The ozonised water is stored in a special non-toxic plastic tank (1,000 litres) from where it can be "tapped" and distributed.

A fourth possibility: DOTWO ® (Disinfection of the wound)

Bearing in mind that in the first 20-30 minutes the ozone maintains very high levels of concentration, the water can be used in hospitals to medicate and cleanse wounds, disinfecting them which encourages them to heal better. If the system will be used for hospitals only, it is possible to produce water (150 litres each time) in batches, i.e. by filling the contact tank with water and ozonising it for about 15 minutes. After this period 150 litres of "ozone treated aqueous disinfectant" will be available for medical/ nursing purposes, and when this runs out, it will always be possible to repeat the cycle for another 150 litres of "disinfectant".

The features of the system

All the equipment, including the partial storage tank, are housed in a "minicontainer" where all the equipment necessary to the process has been installed.

Data sheet for the Drinkthewater ® DTW150 model

All components of the ozone generator that can come into contact with ozone are built from AISI 316 or PVC. The seals are all in Viton® or Teflon®. All the pipes used to feed the ozone into the ejectors are made from steel or PVC. The connecting pipes between the submersible pump and the contact column can be made of standard flexible rubber for use with water. All the connecting pipes between the contact column, the steel body pump and the collection tank are made of steel or PVC. The ozone is generated using an average consumption of electricity that does not exceed the value indicated in Table I. A Certificate issued by the Institute of Electrical Engineering at the Milan Polytechnic is also available. A gauge constantly measures the inlet pressure of the pressure filter which, when necessary, will trigger the automatic cleaning procedure This procedure lasts on average 2-3 minutes and the frequency of these wash cycles depends on the quality of the water fed to the system.

Table I - Technical Data

220/250 VAC – 50/60 Hz
4.5 kWh at working capacity and maximum output
IP 65
-10 ÷55 °C
$10 \div 75$ % (without condensation)
H: 2.5 m L: 3 m D: 2.4 m
CE
150 l/min
30 g/h

Technical information:

The column, the ozone unit and the tank are all housed in a container. The water intake submersed pump (external) should not be located at distances over ~ 15 m from the contact column. Water must be retrieved at a depth which has a minimum distance from the bottom of about 1.5 m The contact column, the collection tank, the generator and all other system components can be placed in an appropriate container or in a prefab unit which has concrete slab or similar type of flooring.

It is not necessary to use cold liquids for the cooling process because the contact reactor is cooled by the passage of the water to be purified, whilst the ozone generator spark plugs are cooled separately by a mini- conditioner.

System Mod.OZ1 - capacity 150 l/min (9000 l/h)



System Mod.OZ2 - capacity 50 l/min (3000 l/h)



Mechanical features:

• The structure housing the generator is made from fibre glass and has a protection rating of IP 65.

• Structure containing the contact column and the collection tanks. The 150 litre collection tank is made from certified food-grade HD polyethylene. The contact column is made from AISI 316 Stainless Steel



Control Circuit:

• This consists mainly in contactors controlled by alternate current, particularly over-dimensioned to achieve an average working life of the contacts which

exceeds 10 million manoeuvres, corresponding to roughly 200,000 machine working hours.

• There is also another water level electronic control unit fitted on the contact column or the collection tank. The latter works perfectly at a temperature of between -10°C and 55°C.



Reliability:

- Machine reliability levels are studied very carefully with regard to both the mechanical components and possible electrical inconveniences.
- The final results are provided by extensive know-how which has cutting-edge safety, low electrical consumption and high Ozone production features.
- Moreover, the working life and reliability of the machine and the various devices, which are increasingly efficient and flexible, have been achieved following countless mechanical and electronic testing phases.
- This has been achieved with the close working relations with our Technical/Scientific staff, a team of specialists working in similar sectors and some Public Authorities such as, for instance: Universities, Satellites, etc., who helped in fine-tuning the solutions that best respond to the specific needs of such equipment.



Generator reliability:

- The generator is designed and tested to produce 30 g/m^3 of Ozone using air.
- The reactors constitute the most delicate part of the system and must be installed or removed by qualified technical staff only.
- These reactors are fitted on a panel which is easily removed for shipping or when half-year or yearly maintenance is performed on the system.
- The generator operates in environments with a temperature of from -15°C to 55°C. A specific air conditioning/ventilating system ensures the air circulated inside the spark plug housing to maintain the right temperature.



Reliability of the contact column:

• The contact column uses Venturi ejectors to dissolve the Ozone in the water up to 5 mg/l per ejector.

Reliability of electronic components and circuits:

- All electronic components carry a 12 month warranty.
- The electronic circuit does not require particular maintenance.
- Special cables (with dielectric rigidity which provides insulation of 10-12 kV) are used to provide high voltage power to the reactors.
- Special connectors are used to make this section of the electrical network more robust.
- The high voltage transformer has IP44 rated protection and can work in environments with temperatures of under 45°C; pursuant to this aspect, a cooling system has been installed on the generator panel.
- Please check that the electrical network has an adequate earthing system (EN 50107).

Reliability of the hydraulic circuit:

- The hydraulic system used on the 50 and 150 systems consist in two pumps and a self-washing filter system.
- The first pump is a self-priming centrifugal electrical pump which powers the recirculation of water in the contact column via two Venturi ejectors.
 - The pump is covered by a 12 month warranty.
 - The temperature of the pumped liquid varies from 10°C to 40°C...
 - The maximum working environment temperature is 55°C.
 - It has Class F insulation and IP55 protection rating.
- The second pump is a submerged electrical pump with a stainless steel body and transfers the water to be treated inside the contact column.
 - It has a 12 month warranty.
 - The maximum temperature of the pumped water is 35°C.
 - Certified Protection rating IP X4.
- The filter system runs on water at a maximum temperature of 40°C and a maximum pressure of 16 bar.
- All the components are suitable for use with drinking water.
- The electrical circuit is powered by a transformer (PRI 220V, SEC 24V, V50-VA) built to CEI 14/6 standards with automatic protection.
- It has a 12 month warranty.
- All the pipeline, valves and fittings are made from AISI 316 stainless steel and PVC and can be used up to PN10.



Reliability of the complete system:

* The complete system (generator, pumps, filters and contact column) guarantees the purification of around 3,000 or 9,000 l/hour of water, except when particular viruses are present (e.g. cholera) which can only be eliminated with longer water—ozone interaction times. (see contact times chart).

Special features:

- Safety, in particular the electrical aspects.
- Robustness, most important to guarantee safe shipping.
- Versatility, which mean it can be used in a wide range of environments.
- Less electrical consumption leading to lower management costs.
- High level of Ozone production, which means excellent water purification results in very little time, even without using Oxygen cylinders.

These annex documents provide copies of certifications, tests and extracts of articles published in sector press and online portals

Annex 1: Certificate of Efficiency

> **Ecologia Applicata S.r.l.** Servizi per l'Ecologia **Organizzazione Scientifica di Ricerche Ambientali** Convenzionata con l'Università degli Studi di Milano

Subject: production of ozone by an OZSY.M10 reactor – 4 reactors - supplied by STIA srl in Milan

Measurements were taken with a SCI-MUX type instrument supplied by In-USA, connected to a GFFOZ probe supplied by the same company and calibrated as indicated in the operating manual July 19th 2005

Measurements taken on Tuesday July 19th 2005 at the Ecologia Applicata S.r.l. headquarters in Busto Arsizio

Capacity	Ozone
l/min	production
	g/m ³
1.0	13.8
1.5	12.6
2.0	11.7
2.5	10.8
3.0	9.8
3.5	8.5
4.0	8.2
5.0	7.0
6.0	6.1
7.0	5.6
8.0	5.1
9.0	4.7
10.0	5.2
11.0	3.1
12.0	2.8
13.0	2.8

Ecologia Applicata S.r.l.

Via Porpora, 9 20131 Milano - Italy

Phone: (+39) 02 2895978 Fax: (+39) 02 2871159

Numero Anagrafe Nazionale delle Ricerche: 602910X9

N. Reg. Soc.2876/7334/26/MI N. Reg. Ditte 1294361 Part.IVA 09453070154 E-mail: <u>info@ecologia-applicata.it</u> ecologia-applicata@iol.it



Produzione Ozono - OZSY.M10 - 4 reattori

Note:

- The indicated measurement refers to that taken after about 40 minutes from startup and after resetting the instrument. The values measured a few minutes after start-up are markedly higher.

Milan, July 19th 2005

The Scientific Director

Dr. Paolo Broglio

Ecologia Applicata S.r.l.

Via Porpora, 9 20131 Milano - Italy

Phone: (+39) 02 2895978 Fax: (+39) 02 2871159

Numero Anagrafe Nazionale delle Ricerche: 602910X9

N. Reg. Soc.2876/7334/26/MI N. Reg. Ditte 1294361 Part.IVA 09453070154 E-mail: <u>info@ecologia-applicata.it</u> <u>ecologia-applicata@iol.it</u> Sanificazione Sanitisation

Impiego dell'ozono per la disinfezione di acque e superfici metalliche e in polistirene artificialmente contaminate

The use of ozone for the disinfection of artificially contaminated waters and of polystyrene and metal surfaces

M. Paola Previdi, Barbara Franceschini, Gabriele Forlini SSICA - Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari, V.le Tanara, 31/A - 43100 Parma (Italia)

Riassunto

In questo studio è stata valutata l'azione disinfettante di ozono sciolto in acqua e allo stato gassoso nei confronti di differenti specie microbiche (spore e cellule vegetative).

Sacoharomyces cerevisiae, Escherichia coli, Lactobacilus brevis, Pediococcus acidilactici e Listeria innocua sono risultati molto sensibili all'azione dell'ozono sciolto in acqua: in 30 s – 1 min di contatto con 0,6 ppm di O₃ si è ottenuta l'inattivazione completa delle cellule (da 4,4 a più di 7 D).

Le spore fungine presentano una maggiore resistenza: sono infatti necessari 5 e 10 min con una concentrazione di 1,5 ppm di O₃ per avere da 3 a più di 5 riduzioni decimali, rispettivamente. Risultati simili sono stati ottenuti per le spore di A. aaidaterrestris. Per le spore di B. subtilis, 20 min di contatto con 1 ppm di O₃ hanno determinato quattro riduzioni decimali.

L'impiego dell'ozono gassoso richiede tempi di contatto più lunghi (1-10 min per l'inattivazione completa delle cellule vegetative, sino a 60 min per le spore) e concentrazioni più elevate (35 ppm di O_g).

Si ritiene che l'ozono possa rappresentare una valida alternativa ai disinfettanti chimici per la disinfezione di acque, superfici e/o strumenti di lavoro con numerosi vantaggi a livello di spese di gestione, consumo d'acqua e costi di trattamento delle acque di scarico.

Abstract

This study is an evaluation of the disinfeoting action of ozone, dissolved in water and in a gaseous state, against several microbial species (spores and vegetative cells).

Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli, Lactobacillus brevis, Pediococcus acidilactici and Listeria innocua resulted as being extremely sensitive to the action of azone dissolved in water: in 30 s - 1 min of contact time with 0.6 ppm of O_3 the cells were completely inactivated (from 4.4 to over 7 D).

Fungal spores show greater resistance: in fact, it takes 5 and 10 min with a concentration of 1.5 ppm of O_3 to obtain from 3 to over 5 decimal reductions respectively. Similar results were obtained for the spores of A. acidoterrestris. For the spores of B. subtilis, 20 min of contact time with 1 ppm of O_3 gave rise to four decimal reductions.

The use of gaseous azone requires longer contact times (1-10 min for the complete inactivation of vegetative cells, up to 60 min for the spores) and higher concentrations (35 ppm of $O_{\rm s}$).

Ozone is considered to constitute a valid alternative to ohemical disinfectants for the disinfection of waters, and of work surfaces and/or instruments, with numerous advantages in terms of management costs, water consumption and costs of waste water treatment.

KEY WORDS: ozone, disinfection, sanitisation, wastewaters, surfaces

INDUSTRIA CONSERVE, N.1, anno 84, 2009 - 31

L'impiego dei disinfettanti è fondamentale per controllare i microrganismi contaminanti, soprattutto patogeni, nelle acque, negli ambienti, sulle superfici, sugli impianti dell'industria alimentare.

L'uso di alcuni prodotti è futtavia limitato in quanto rappresentano essi stessi un potenziale rischio per la salute umana.

Molto usato è il cloro, soprattutto come sale di ipociarito, per la sanifizzazione di utensili, impianti per l'industria alimentare, disinfezione di acque, lavaggio di frutta e verdura. I derivati del cloro sono disinfettanti efficaci e poco costosi; tuttavia presentano alcune controindicazioni che ne limitano l'uso; la clorazione può infatti determinare nelle acque o sulle superfici a contatto con gli alimenti la formazione di composti organici clorurati (trialometani) fossici [1]. Per ridurre tali rischi si studiano trattamenti alternativi.

L'azono può rappresentare una valida soluzione: è la forma allotropica dell'ossigeno (O.), prodotto tramite il passaggio di scariche elettriche o radiazioni ionizzanti in aria o ossigeno (2). È un potente ossidante, in grado di inattivare i microrganismi determinando la lisi della parete cellulare e dei rivestimenti esterni delle spore (coats) e degli enzimi cellulari (3); è in grado di trasformare molle sostanze organiche non biodegradabili in forme biodegradabili, determinando la formazione di aldeidi, chetoni o acidi carbossilici che non creano problemi per la salute (if), holtre la molecola di ozono si decompone spontoneamente in ossigeno; essendo una molecola instabile, deve essere generata direttamente nel punto di applicazione, non necessita quindi di mogazzinaggio.

Negli USA l'ozono è da anni considerata una sostanza sicura denominata "GRAS" (generally recognized as safe) [1].

In questo studio si è voluto verificare l'azione dell'azono nei contronti di differenti specie microbiche. Le prove sono state condotte utilizzando sia ozono sciolto in acqua sia allo stato gassoso. Sono state pertanto contaminate acqua e superfici plastiche e d'acciaio.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati i soguanti microrganismi:

Staphylococcus aureus AICC 25923
Listeria Innocua AICC 33090

Escherichia coll AFCC 25922
Saccharamyces cerevisiae SSICA Y69

Loctobacillus brevit SSICA [2]

- Clociosporium sp. (spore).

- Pediococcus acidilactici SSICA P1

Enterobacter aerogenes SSICA EA

Alcyclobacilus acidoterrestris SSICA 2633

Bocilus subrils vax globigi SSICA 85 (spore)
Aspergilus niger SSICA 6399 (spore)

Ciascun microrganismo è stato inoculato in 10 mL di brodo di

anicchimento (BHI, MRS broth o MEB broth) e incubato a 30 o

Dopo l'accrescimento le cellule sono state lavate mediante

Microrganismi

INTRODUCTION

The use of disinfectants is fundamental to the control of contaminating micro-arganisms, above all pathogenic ones, in waters and environments and on surfaces and equipment for the food industry.

The use of certain products is, however, limited, since they themselves are a potential risk for human health.

Chlorine is much used, above all as salt of hypochlorite, for the sanitisation of utensils and equipment for the food industry, the disinfection of waters and the washing of fluit and vegetables. Chlorine derivatives are efficacious and inexpensive disinfectants: however, they present certain contra-indications that ilm it their use: In fact, In waters or on surfaces in contact with foodstuffs, chlorination may give rise to the formation of faxic chlorinated organic compounds (trialomethanes) (1). To reduce these risks, alternative treatments are sought.

Ozone may provide a valid solution: It is the allohopic form of axygen (Og), produced by the passing of electric discharges or ionising radiations through air or oxygen (2). It is a potent axidant capable of inactivating micro-organisms by causing lysis of the cell wall, spore coats and cell enzymes (3); It can transform many non-biodegradable organic substances into biodegradable forms, giving rise to the formation of aldehydes, letones or carboxylic acids, which do not create problems for human health (4). Moreover, the azone molecule decomposes spontaneously in oxygen; being an unstable molecule, it must be generated directly at the point of application, and thus does not need staring.

in the USA, azone has for many years been considered a safe substance, recognised as a "GRAS" substance (generally recognized as safe) (1).

The aim of this study was to determine the action of ozone against various microbial species. The trials were conducted utilising both azone alsolved in water and azone in a gaseous state. Water and plastic and steel surfaces were contaminated for the purpose.

MATERIALS AND METHODS

Micro-organisms

- The following micro-organisms were used:
- Staphylococcus aureus ATCC 25923
- Listeria innocua ATCC 33090
- Escherichia coli AJCC 25922
- Saccharomyces cerevisiae SSICA Y69
- Loctobacillus brevis-SSICA (21
- Pediococcus acidilactici SSICA PI
- Enterobacter aerogenes SSICA EA
- Alicyclobacillus acidolemestris SSICA 2633
- Bacillus sublils var. globigi SSICA BS (spores)
- Aspergillus niger SSICA 6399 (spores)
- Cladosporlum sp. (spores).

Each micro-organism was inoculated in 10 mL of enrichment broth (BHL MRS broth or MEB broth) and incubated at 30 or 37°C for 24-68 hours depending on the species.

After growth, the cells were washed by centrifugation so as

32 - INDUSTRIA CONSERVE, N.1. anno 84, 2009

37ºC per 24-48 are a seconda della specie.

centritugazione al tine di evitare interterenza tra sostanza organicaredi ozono: il petiet ottenuto è stato sospeso in 10 mL di solutione fisiologica (SOF).

Per quanto riguarda mutte, Alcyclobacilius e Bacilius, si è proceduto a trattare direttamente la sospensione acquosa delle spore. Le spore di Bacilius ed Alcyclobacilius sono state preventivamente attivate mediante un trattamento ad 80° C per 10 min.

Terreni coltural

 baird Parker (Ovsid) incubato per 48 ore a 37°C per la ricerca di Staphylococcus aureus;

- Agar Listela Ottavini & Agost (Nolte) incubato per 2448 ore a 37°C per la ricerca di Listella Innocua;
- VRBGA Violet Red ble Glucose agar (Oxoid) incubato per24 ore a 37°C per la ricerca d £, colte £, aerogenes;
- MRS agar de man Rogota Sharpe (Oxoid) acidificato a p.H.

 5.7 con HCI 1.0 N incubato a 30°C per 40-72 ore per la itoerca di batteri lattici;

- M64 Matt Extract Agiar (Oxeld) additionto arpH 4.0 con acide atrice (50% p/p) inavbato a 30 e 25°C per 3-5 giorni per la ricerca di leviti e mutte, rispettivamente;
- YSG avente la reguente compositione (g/L): estratio al levito 20 g. glucoso 1,0 g. amida rok/bile 2,0 g. agar 15,0 g incubato a 50°C per 2-3 giorni per la ricerca al Alicyclobaciliu;
- PCA Plate Count Agar (Oxold) incubate a 30°C per 48-72 ore per la ricerca di Bacillu;
- MRS broth de man Rogora Sharpe (Oxoid) incubato a 30°C per 48 ore per i batter lattici;
- MB Mat Educt Iroth [Oxid] incubate a 30 e 25°C per 40 ore per itevit;
- BHI brain Heart InAxion (Oxoid) incubato a 37°C per 24ore per S aureur, L innocua, E coll, E aerogenes;
- SOF solutione fisiologica (NaCL8,5 g/L);

 SQLP solvatione thiological preptonata (NaCL8.5 g/L preptone 1 g/L)

Procedura sperimentale

Generatore di osono e impianto diffusore

È stato utilizzato un generatore di ozono modello OZSY-HI o della ditta STA Szi. (Egura 1) costituito da due reattori per la produzione di ozono direttamente dall'aria putitoata, con un voltaggio di 220 V/S0 Hz. Il raftreddamento avviene tramite atia prodotta grazie ad una ventola posta di Interno dello strumento.

tielle prove effettuate in acqua, l'ozono viene diffuso sotto torma di bolle attraverso un setto poroso posto sul fondo del contenitore nel quale è presente l'acqua da trattare (figura 2).

FIG. 1 - Generatore di ozono. 7/G. 1 - Ozone generator:



to avoid interference between the organic substance and the atone; the pellet obtained was suspended in 10 mL of physiological solution (SOF).

Concerningmoulds, Alcyclobackus anabacilus, the aqueous suspension of the spores was treated already. The spores of bacilus and Alcyclobacilus were activated beforehand by treatment at 80°C for 10 min.

Culture m edia

 Baild Patter (Diold: Incub atted for 48 hours at 37%) for the detection of Staphylococcus auteur;

- AgarListeda Ottavini & Agasti (Biolife) incubated for 24-48 hours at 37*C for the detection of Listeda innocua;
- VIBG A Violet Red Ble G lucose agar (Ovoid) incubated for 24 hours at 37°C for the detection of E coll and E derogenes;
- MRS agar de man Rogosa Sharpe (Oxold) acidifed to pH_S7 with 1.0 N HCL incubated at 30°C for 48-72 hours for the detection of lactic acid bacteria;
- MEA MainExtract Agar (Oxiolate acialities to pH 4.0 with citits acial (S0% p/p), incub ated at 30 and 23°C for 3-5 alays for the detection of yeasts and moulds, respectively.
- YSG with the following composition (g/U: 20 g yeast extract, 10 g glucose, 20 g soluble starch, 150 g agar, incubated at 30°C for 2-3 days for the detection of Alcyclobacillus;
- PCA Plate Count Ager (Oxoid) incubated at 30°C for 48-72 hours for the detection of Bacillus;
- MRS broth de man Rogosa Sharpe (Oxold) incub atted at 30 °C for 48 hours forlactic acid b acteria;

MEB MathExtractBroth (Choid) incubated at 30 and 25°C for 46 hours for years:

- BHI Srain Heart Infusion (Oxold) incubated at 37*C for 24 hours for 5 auteur, L innocua, E coll and E aerogenes;
- SCF physiological solution (NaCL& 5g/L).
- SOLP peptonated physiological solution (NaCL 8.5 g/L, peptone 1 g/U.

Experimental procedure

Ozone generator and dittution plant

A model OZSY410 cape generator by the film STA S.r.l. (Figure 1) was utilised, constiting of two reactors for the production of ozone directly from putfied air, with a voltage of 210 V/S0 Hz. Cooling takes places through production of air by a fan placed inside the instrument.

in the blab effected in water, the caone was gread in the form of bubbles through a porous septum placed on the bottom of the container holding the water to be treated (Figure 2).





INDUSTRIA CONSERVE, N.1, orvine 84 2009 - 33

verificare la concentrazione di ozono residua. Metodo colorimetrico con Indigo Principio del metodo In solutione acida. Findigo viene rapidamente decolorato dall'azono, la diminuzione dell'assorbanza è direttamente proporzionale all'aumento della concentrazione dell'ozono. Reagent Indigo soluzione madre: in un matraccio tarato da 1 L sono stati aggiunti 500 mL di acqua, 1 mL di acido fosforico concentrato e 770 mg di Polazsio indigo trisullonate, C., H.N. O., S.K., il tutto riportato a volume con acqua. La diluizione 1:100 aveva un'assorbanza di 0.20 ± 0.0010 a 600 nm. Indigo reagente l: in un matraccio da 1 L sono stati aggiunti 20 ml. di soluzione madre (a), 10 g di sodio di idrogeno fostato (NaH,PO,) e 7 mL di acido fosforico concentrato e portati a volume con acqua.

 Indigo reagente il: si è proceduto come per il reagente b (Indigo reagente i) ma sono stati aggiunti 100 mL di soluzione modre anziché 20 mL.

Una volta regolato il flusso d'aria si è proceduto alla defer-

minazione della concentrazione di ozono attraverso il metodo

"Standard Methods 4500-O, B Indigo Colorimetric". Tale deter-

minazione è stata ripetuta dopo ogni tempo di contatto per

Procedura spettrafatametrica

Per determinare le concentrazioni di O₂ utilizzate in questa esperienza, è stata utilizzata la procedura n. 3 del metodo utficiale 4500-O₂ 8 indigo Colorimetric. Si sono prelevati 25 ml. di campione di acqua ozonizzata, 10 ml. di soluzione di Indigo reagente II e portati a volume di 100 ml. con acqua didiliata; dopo agitazione è stata eseguita la lettura mediante spettrolotometro alla lunghezza d'onda di 600 nm.

Calcolo della concentrazione di O,

	100 x ΔA
mg O_A =	
	fxbxV

dove:

A # differenza in assorbanza tra il campione e il bianco (nm)

b = cammino offico (cm)

V = volume del campione (mL)

t = 0.42 coefficiente di assorbimento per l'azono acquoso.

Prove svolle in acqua

Sono stati addizionati 3 mil di ciascuna sospensione cellulare o sporale a 100 mil di acqua sterile sottoposta in continuo a trattamento di ozonizzazione.

Dopo tempi crescenti di contatto sono stati prelevati 5 mL di sospensione e addizionati a 0.5 mL di Na₂S₂O₆ 0.005 M per arrestare la recizione.

Il conteggio delle cellule o spore sopravvisarte è stato effettuato nei teneni specifici.

Condizioni operative: ciascun microrganismo è stato trattoto a tre diverse concentrazioni di azona; la concentrazione più bassa è stata ottenuta aumentando il flusso di aria. 1) $O_2 = 2.6$ ppre: flusso di aria = 6 L/mirc pressione = 0.65 baz. 2) $O_2 = 1.47$ ppre: flusso di aria = 6 L/mirc pressione = 0.65 baz. 3) $O_3 = 0.60$ ppre: flusso di aria = 10 L/mirc pressione = 0.65 baz.

34 – INDUSTRIA CONSERVE, N.1, anno 84, 2009

Once the air flow was regulated, the azone concentration was measured using the "Standard Methods 4500-O₂ B Indigo Colorimetric" method. The measurement was repeated after each contact time to check the concentration of residual azone.

Indigo colorimetric method Principle of the method

In acid solution, the indigo is rapidly also loured by the azone; the diminution of adsorbance is alrectly proportional to the increase in agone concentration.

Reagents

- Indigo stock solution: In a calibrated 1 L flask were placed 500 mL of water, 1 mL of concentrated phosphoric acid and 770 mg of Potassium Indigo trisulphonate, $C_{ij}H_jN_j O_{ij}S_jK_{gr}$ made up to volume. The allution 1:100 had an adsorbance of 0.20 ± 0.0010 at 600 nm.

 Indigo reagent t in a 1 L flask were placed 20 mL of stock solution (a), 10 g af sodium hydrogen phosphate (NaH_PO_) nd 7 mL of concentrated phosphoric acid and made up to volume with water.

 Indigo reagent it: the procedure was as for reagent b (indigo reagent i) but with 100 mL of stock-solution instead of 20 mL

Spectrophotometric procedure

To determine the concentrations of O_g utilized in this experiment, procedure no. 3 of the official 4500– O_g B indigo Colorimetric method was used. A 25 mL sample of azonised water was taken, with 10 mL of indigo reagent II solution, and made up to 100 mL with distilled water: after stiming, a spectrophotometric reading was taken at a wavelength of 600 nm.

Calculation of O., concentration

	100 x 4A
n.g O3/L =	100000000000000000000000000000000000000
	fxbxV
where:	

A A = difference in adsorbance between the sample and the blank (nm)

b = optical path (cm)

V = volume of sample (mL)

f = 0.42 coefficient of absorption for aqueous ozone.

Trials carried out in water

Three mL of each cell or spore suspension were added to 100 mL of sterile water undergoing continuous azonisation treatment.

After increasing contact times, S mL of suspension were taken and added to 0.5 mL of $Na_{g}S_{g}O_{g}$ 0.005 M to stop the reaction.

Surviving cells or spores were counted in the specific media.

Operating conditions: each micro-organism was treated at three differing azone concentrations: the lowest concentration was obtained by increasing the air flow. I) $O_g = 2.6 \text{ ppm}$; air flow = 6 L/min: pressure = 0.65 bar. 2) $O_g = 1.47 \text{ ppm}$; air flow = 6 L/min: pressure = 0.65 bar. 3) $O_g = 0.60 \text{ ppm}$; air flow = 10 L/min: pressure = 0.65 bar.

Prove svolle con azono gassoso

Cento µL di sospensione microbica lavata e opportunamenle diuita o di sospensione sporale sono stati distribuiti su piastre Petri vuote (diametro di 14 cm), o su piastre d'acciaio (5 x 5 cm). L'operazione è stata ettettuata sotto cappa a flusso lominare; il tempo di asciugatura è stato di circa mezz'ora. Le piastre sono state quindi poste in una camera chiusa del volume di circa 3 L con una umidità relativa (RH) superiore al 90% a temperatura ambiente e sottoposte ad un trattamento con 35,2 ppm di O₃ (flusso di ozono pari a 7 L/min, pressione di 0,65 bar). Dopo tempi crescenti di esposizione le piastre sono state totte dalla camera e si è proceduto al conteggio delle cellule o spore sopravvisute al trattamento.

Per le piastre Petri trattate, inoculate con basse concentrazioni microbiche (circa 10° ufc/piastra), è stato aggiunto direttamente il terreno colturale nelle stesse. Le piastre di acciaio, inoculate con alte concentrazioni microbiche (circa 10° o 10° ufc), dopo trattamento, sono state poste in sacchetti per stomacher a cui sono stati aggiunti 50 mL di soluzione lisiologica peptonata (SOLP) e manualmente "grattate" per risospendere le cellute o spore presenti. Si è quindi proceduto al conteggio dei sopravvissuti nei terreni coltural specifici.

In parallelo, come controllo, per verificare eventual inattivozioni microbiche dovute all'essiccazione o distacchi e allontonamenti di cellule e spore dovuti al tusso d'aria, si è proceduto al conteggio dei microrganismi presenti nelle piastre inoculate ed essiccate e nelle piastre inoculate, essiccate e sottoposte a flusso d'aria privo di ozono per gli stessi tempi di trattamento.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Prove con O, sciolto in ocqua

La solubilità dell'ozono in acqua è più di dieci volte quella dell'ossigeno, anche se l'ozono è solo parzialmente solubile: diventa pertanto di grande importanza l'efficienza del contatto ozono-acqua e la dittusione dell'ozono stesso.

Durante la fase di contatto la velocità di trasferimento dell'ozono dal gas al liquido è influenzata da diversi parametri: viscosità dell'acqua, temperatura, concentrazione di sostanze che consumano ozono (5).

Quanto più atta è la concentrazione di queste uttime, tanto più saranno veloci il trasferimento dell'ozono dalla fase gassosa all'acqua e il suo consumo nella fase liquida,

L'effetto dell'ozono sciolto in acqua sulle diverse specie microbiche (cellule vegetative e spore) è riportato nella labella 1. Come si evince chiaramente 5. cerevisioe, E. coli, L. brevis, P. acidilactici e L. innocuo sono molto sensibili all'ozono: bastano 30 s – 1 min di contatto con la concentrazione più bassa (0,6 ppm) per avere l'inattivazione completa delle cellule (da 4,4 a più di 7 D). Kim e Yousef (6) hanno trattato in acqua in presenza di 0,4 e 0,8 ppm di ozono L monocytogenes ottenendo in 30 secondi di contatto rispettivamente 4,6 e 5,7 riduzioni decimali. Restaino et al. (7) hanno ottenuto più di 4 riduzioni decimali istantaneamente, mettendo in contatto un ceppo di L monocytogenes con 0,188 ppm di ozono. Nelle prove svolte si è preferito utilizzare L innocua come microrganismo target al posto di L monocytogenes come già indi-

Trials carried out with gaseous azone

A hundred µL of microbial suspension, washed and diluted, or of spore suspension, were distributed on empty Petri plates (alameter 14 cm) or on steel plates (5 x 5 cm). The operation was carried out under a laminar flow hood; drying time was around haif an hour. The plates were then placed in a closed chamber with a volume of around 3 L with a relative humidity (RH) higher than 90% at room temperature, and were submitted to a treatment with 35.2 ppm of $O_{\rm p}$ (arone flow equal to 7 L/min, pressure 0.65 bar). After increasing exposure times, the plates were taken out of the chamber and the cells or spores surviving the treatment were counted.

For the Petri plates treated, inoculated with low microbial concentrations (around 10° cfu/plate), the culture medium was added directly to them. The steel plates, inoculated with high microbial concentrations (around 10° or 10° cfu), were placed after treatment in stamacher bags to which had been added 50 mL of peptonated physiological solution (SCLP), and were manually "scratched" to resuspend the cells or spores present. The survivors were then counted in the specific culture media.

As a control, at the same time, in order to detect any possible microbial inactivations due to drying ar detachment and removal of cells and spores because of the air flow, a count was taken of the micro-arganisms present in the inoculated and dried plates and in the inoculated, dried plates submitted to air flow with no azone for the same treatment filmes.

RESULTS AND DISCUSSION

Trials with O₂ dissolved in water

The solubility of azone in water is more than ten times that of anygen, although azone is only partially soluble; the efficiency of the azone-water contact and the althusion of the azone itself are thus extremely important.

During the contact phase, the speed of transfer of azone from a gas to a liquid state is influenced by various parameters: viscosity of the water, temperature and concentration of azone-consuming substances (5).

The higher the concentration of the latter, the quicker the transfer of ozone from the gaseous phase to water and its consumption at the liquid phase.

The effect of ozone dissolved in water on the various microbial species (vegetative cells and spores) is shown in Table 1. As can be clearly seen, S. cerevisiae, E. coli, L. brevis, P. acidilactici and L. innocua are extremely sensitive to ozone: 30 s - 1 min of contact with the lowest concentration (0.6 ppm) is enough for the complete inactivation of the cells (from 4,4 to more than 7 D), Kim and Yousef (6) freated L. monocytogenes in water in the presence of 0.4 and 0.8 ppm of azone, obtaining in 30 s of contact 4.6 and 5.7 decimal reductions respectively. Restaino et al. (7) obtained more than 4 decimal reductions instantaneously, by bringing into contact a strain of L. monocytogenes to 0.188 ppm of ozone. In the trials carried out, it was preferred to utilise L. innocua as target micro-organism instead of L. monocytogenes, as already stated in the literature (3, 8).

For S. aureus, from 1 to 5 min of contact with 0.6 ppm

INDUSTRIA CONSERVE, N.1, anno 84, 2009 - 35

cato in letteratura (3, 8).

Per S. oureus sono necessari da 1 a 5 min di contatto con 0,6 ppm di O₃ per ottenere 6 riduzioni decimali.

Solo il ceppo di E. aerogenes presenta una certa resistenza: sono necessari 10 min con 0.6 ppm di O₃ per avere 6,9 riduzioni decimali. Inoltre l'inattivazione è risultata maggiore con una concentrazione di O₃ inferiore: questo può essere dovuto al fatto che l'abbassamento di concentrazione si ottiene con un aumento del flusso. Tale aumento può avere favorito il contatto fra O₃ e la cellula microtzica.

Le spore fungine presentano una maggiore resistenza: sono infatti necessari 5 min e 10 min con una concentrazione di 1,5 ppm di O₂ per avere 3 e 4, 2 D per l'A, niger e 3,8 e >5,6 D per Cladosporium sp., rispettivamente,

Anche Restaino et al. [7], trattando in acqua azonizzata ditterenti specie di miceti, hanno notato una elevata sensibilità dei leviti quali Candida albicars e Zygosaccharamyces balli mentre hanno ottenuto meno di una riduzione decimale in 5 min di esposizione di spore di Aspergillus niger con 0,18 ppm di ozono.

Per le spore di A. acidaterrestris sono necessari 5 min e 10 min con 1,5 ppm di O₃ per avere rispettivamente 4,5 e 5,3 riduzioni decimali.

Per problemi tecnici le spore di E. subtilis sono state trattate solo con 1 e 0.55 ppm di O₃: dopo 20 min di contatto si sono ottenute rispettivamente 4,0 e 3,9 D. Anche in questo caso, utilizzando una concentrazione di O₃ dimezzata, l'aumento di flusso ha permesso di ottenere una inattivazione simile. Khadre e Youset (9) hanno trattato in acqua una sospensione di spore di E. subtilis per 1 min con 11 ppm di O₃ ottenendo da 1,3 a 6,1 D a seconda del ceppo batterico.

Nella Tabella 1 è riportato anche l'O₃ residuo nella soluzione dopo i vari tempi di contatto: si osserva una iniziale diminuzione della concentrazione in seguito all'aggiunta della sospensione microbica seguita da un ripristino della concentrazione iniziale ad opera del flusso in continuo di ozono. Un esempio di tale andamento è riportato nella Figura 3.

of O, are needed to obtain 6 decimal reductions.

Only the strain of E. aerogenes shows a certain amount of resistance: it requires 10 min with 0.6 ppm of O_3 to obtain 6.9 decimal reductions. In addition, inactivation proved higher with a lower concentration of O_3 ; this could be due to the fact that the lowering of the concentration is obtained with an increase in flow. The latter increase may have facilitated the contact between O_3 and the microbial cell.

The fungal spares show greater resistance: in fact, 5 min and 10 min with a concentration of 1.5 ppm of O_3 are needed to obtain 3 and 4.2 D for A, niger and 3.8 and >5.6 D for Cladospotium sp., respectively.

Restaine et al. (7), treating differing fungal species in azonised water, also noticed a high sensitivity of yeasts such as Candida albicans and Zygosaccharomyces baili, whereas they obtained less than one decimal reduction in 5 min of exposure of Aspergillus niger spores with 0.18 ppm of azone.

For A, acidoterrestris spores, it takes 5 min and 10 min with 1.5 ppm of O_{3} to obtain 4.5 and 5.3 decimal reductions respectively.

Owing to technical problems, the **B. sublits** spores were treated only with 1 and 0.55 ppm of O_{g}^{*} after 20 min of contact, 4.0 and 3.9 **D** were obtained respectively. Also in this case, when utilising a halved concentration of O_{g}^{*} the increased flow yielded a similar inactivation. Khadre and Yousef (9) treated a suspension of **B. sublits** spores in water for 1 min with 11 ppm of O_{g}^{*} obtaining from 1.3 to 6.1 **D** depending on the bacterial strain.

Table 1 also shows the residual O₃ in the solution after the various contact times: an initial diminution in the concentration is observed after the addition of the microbial suspension, followed by a restoration of the initial concentration thanks to the continuous azone flow. An example of this behaviour is shown in Figure 3.

36 - INDUSTRIA CONSERVE, N.I., anno 84, 2009



TABLE 1 - Number of decimal inductions (nD) of microbial cells and spores of several sitians treated with different concentrations of ozone dissolved in water for differing times.

Cappo Smik	oj ppm	t min	8.0×	oj residuo Residuot O,	o, opm	r min	ndr.	O, residue Ansiduer O,	o, pon	r miti	n0•	O, residuo Reciduar O,
S CORVERIE SINCA YOP	n 24	0,8 1 3 10	35.7 36.7 36.7 36.7	2,49 2,33 2,35		0.8 1 .5 10	143 143 143 143	137 137 14	64	0,5 1 5 10	42 147 157 157	8,46 8,41 8,34
Caropodim ip (geore)		0,8 1 5 10	2,9 2,9 3,0 4,4	1,75 1,76 8,91		0,8 1 8 10	8.2 0,0 0,8 15,0	134 140 141		0,\$ 1 5 10	0,7 1,5 0,3 0,5	0,52 0,54 0,64
A. 68/67 538(A.43977 (@.016)		0,6 1 5 10	0,4 1,2 3,3 3,5	0,5 9,26 9,27	1,3	0,5 1 5 10	0,1 1,1 3,0 4,2	0,31 1,3# 1,3#		0,3 1 5 10	0,03 0,2 2,4 3,5	0,54 0,54 0,58
E gemgenei Slichth		0,8 1 6 10	2.8 4,5 4,4 3,4	nd nd		8.0 1 8 10	1,8 1,9 1,8 2,8	1,48 1,41 1,55		0.5 1 5 10	3,4 40 53 42	0,63 6,45 9,58
8.008 AT C CESPES		0.8 1 5 10	>7,0 >7,0 >7,0 >7,0 +7,0	237 252 259		0,8 1 8 10	8,6 4,4 9,70 9,70	0.55 0.55 0.79		0,8 1 5 10	4.4 4.0 37,2 17,2	8,55 9,43 4,45
L envit SSICA (21		0,8 1 5 10	6.9 >7,8 >7,9 >7,9	1,5.4 1,7.8 9,0.7		0,6 1 5 10	4,8 >4,8 >6,8 >6,6	121 128 148		0,6 1 5 10	43 43 243 243	8,49 9,56 8,07
A soldinomi IDCAF1		0,5 1 6 10	5,4 4,9 >7,6 >7,8	nd nd		0.5 1 5 10	5,1 >7p >7p >7p	124 120 1,45		0,5 1 5 10	6.9 7/0 >7,4 >7,5	0.52 9,45 9,41
1. 040000 ALC 03000		0,8 1 8 10	\$.8 >5.5 >5.5 >8.5	2,17 9,22 9,27		0.8 1 1 10	2,3 8,5 4,0 3,7	121 1.32 128		0,8 1 8 10	>7# >7# >7# >7#	0,52 0,67 0,70
L conves ATC (2092)		0,6 1 5 10	3,9 3,4 37,1 37,1	1,79 1,4.7 1,8.2		0,6 1 5 10	4,5 6,9 4,8 >7\$	1,40 1,40		0,8 1 5 10	49 60 60 70	8,45 0,58 6,41
A SSC A 2523 Spore)		0.5 0.4 122 1 1.44 122 6 5.0 125 10 55.3 125		0,5 1 5 10	0,4 0,9 4,5 5,3	1.4 1,24 1,48		0,5 1 5 10	0,1 0,1 0,8 2,8	0.53 6,53 0,55		
4. sontin 11:CA El (Ipore)					1.8	4 10 14 20	0,7 2,9 3,4 4,0	0,51 0,87 0,99 1,0	0,65	4 10 15 20	19 17 23 22	0,48 6,81 0,55 0,54

*I valori o tienuti sono il risultato della media di due o tre prove: nd = non determinato The values obtained are the result of the mean of two or three tiab; nd = not determined

RG.3 - Andamento della concentrazione di ozono (mg/L) in funzione dei tempo in presenza o asienza di microrganismi. 16.3 - Time-course of the atone concentration (mg/L) in the presence or absence of micro-organisms.



INDUSTRIA CONSERVE, H.1, anno 84 2009 - 37

L'impiego dell'ozono gassoso come disintettante richiede concentrazioni più elevate e tempi di contatto più lunghi rispetto all'applicazione di ozono in acqua (tino a 4 ore) (10-11) ed una umidità relativa elevata (RH = 90-95%); infatti è stato constatato che con un valore di RH inferiore al 50% non si ha alcun effetto inattivante (12).

In letteratura non sono numerosi i lavori svotti con ozono gassoso: in alcuni casi i trattamenti sono stati etfettuati con basse concentrazioni di O₂ e tempi molto lunghi di contatto (4, 13, 14), in altri casi si è preferito utilizzare alte concentrazioni con tempi ridotti di trattamento [15].

Nelle prove svolte, essendo il trattamento rivolto a supertici e non a diretto contatto con alimenti, è stata utilizzata una concentrazione elevata (35,2 ppm di O₂) per tempi brevi di contatto (1-10 min per le cellule vegetative, sino a 60 min per le spore).

Plastre Petri in polistirene

Nella Tabella 2 sono riportati i risuttati ottenuti insuttando O₃ gassoso su piastre Petri vuote inoculate. Poiché dopo il trattamento è stato aggiunto direttamente il terreno colturale, l'inoculo è stato fatto con basse concentrazioni cellulari o sporali per poter poi contare direttamente le colonie.

Per il ceppo di S. cerevisiae non è stato possibile eseguire la prova in quanto l'essiccazione dell'inoculo e soprattutto il flusso d'aria (privo di O₃) inattivavano e aliontanavano completamente le cellule dalla superficie. Data l'elevata volatilità delle spore fungine, non sono stati trattafi A. niger e Ciodosporium sp.

Anche le cellule di E. cerogenes venivano in parte allontanate dal tusso d'aria: in questo caso le riduzioni decimali dovute all'O₂ sono state ottenute per differenza. Non sono stati riportati i risultati ottenuti con E. coli in quanto molto diversi tra loro, e fortemente influenzati dal tusso d'aria.

In generale i risultati ottenuti sono molto buoni: in 5 min di trattamento si ottiene l'inattivazione totale dell'intero inoculo di cellule vegetative.

Nella Tabella 2 sono riportati i risultati di tre prove distinte per ciascun microrganismo: benché i risultati siano molto simili, non è stato ricavato il valore medio, in quanto le condizioni operative (concentrazione microbica iniziale, umidità relativa) non erano sempre uguali.

Per quanto riguarda le spore batteriche, è stata osservata una maggiore resistenza delle spore di A. acidoterrestris rispetto alle spore di B. subtilis: queste ultime vengono completamente inattivate dopo 45-60 min di contatto, mentre per le spore di A. acidoterrestris si ottengono al massimo 1,6D dopo 60 min; dopo 30 min si ottiene già più di una riduzione decimale.

Un diverso comportamento all'azione dell'ozono da parte di ditterenti specie di spore batteriche era già stato osservato da P. M. Foegeding (76) che aveva verificato un'ozono-resistenza variabile non soltanto tra spore appartenenti a specie microbiche diverse ma anche all'interno della stessa specie.

La diversa resistenza sembra dovuta a differenze genetiche come le componenti strutturali della spora ed a parametri ambientali presenti durante il processo di sporulazione come la disponibilità di nutrienti (16).

38 - INDUSTRIA CONSERVE, N.1, anno 84, 2009

Trials carried out with gaseous O₂

The use of gaseous azone as a disinfectant requires higher concentrations and longer contact times than with the application of azone in water (up to 4 hours) (10-11) and a high relative humidity (RH = 90-95%); in fact, it has been ascertained that with an RH value lower than 50% no inactivation takes place (12).

Not many studies carried out using gaseous azone are reported in the literature: in some cases treatments were effected with low concentrations of O₂ and very long contact times (4, 13, 14), whereas in other cases it was preferred to utilise high concentrations with reduced treatment times (15).

In the trials here carried out, since the treatment was designed for surfaces and not in direct contact with foodstuffs, a high concentration was used (35.2 ppm of O₂) for short contact times (1-10 min for vegetative cells and up to 60 min for the spores).

Polystyrene Petri plates

Table 2 shows the results obtained by insufficiting gaseous O₂ on empty inoculated Petri plates. Since after treatment the culture medium was added directly, the inoculum was done with low cell or spore concentrations so as to be able to count the colonies directly.

For the S. correvision strain, If was not possible to carry out the trial since the drying of the inoculum and above all the air flaw (lacking in O) inactivate and completely separate the cells from the surface. Given the high volatility of fungal spores, A. niger and Cladosportum sp. were not treated.

The E. aerogenes cells were also partly removed by air flow: In this case the decimal reductions due to O₃ were obtained by difference. The results obtained with E. coll are not reported, since they differ greatly among themselves and are strongly influenced by the air flow.

In general, the results obtained are very good: 5 min of treatment achieved total inactivation of the entire inoculum of vegetative cells.

Table 2 shows the results of three separate trials for each micro-organism: although the results are very similar, the mean value was not obtained since the operating conditions (initial microbial concentration, relative humidity) were not always the same.

Regarding the bacterial spores, a greater resistance was observed of the A, acidotemestris spores than of those of B, subtilis: the latter are completely inactivated after 45-60 min of contact, whereas for the A, acidotemestris spores at most 1.6 D was attained after 60 min; after 30 min there was already more than one decimal reduction.

A differing behaviour towards the action of azone on the part of different species of bacterial spores had already been observed by P. M. Faegeding (16), who had noticed a variable azone resistance not only among spores belonging to differing microbial species but also within the same species.

This differing resistance appears to be due to genetic differences such as the structural components of the spore and to environmental parameters present during the process of sparulation, such as the availability of nutrients (16).

TAB. 2 - Numero di riduzioni decimali (nC) di cellule microbiche e spore di differenti ceppi inoculati su piastre Petri vuole trattate con 35,2 ppm di ozono gassoso per tempi diversi (tlusso ozono = 7 L/min; pressione di 0,65 bar; umidità relativa RH 290%).

TABLE 2 - Number of decimal reductions (nD) of microbial cells and spores of different strains inoculated on empty Petri plates treated with 35.2 ppm of gaseous azone for differing times (azone flaw = 7 L/mins pressure 0.65 bar, relative humidity RH 290%).

Ceppo Strain	Tempo (min) Time (min)	Prova 1 Trial I nD	Prova 2 Trial 2 nD	Prova 3 Trial 3 nD
P. ocidiloctici SSICA P1	1 5 10	0,82 2,3 ≫4,0	0, 6 2,3 3,0	1,0 >2,82 >2,82
L brevis SSICA L21	1 5 10	0.99 >2.69 >2.69	0.99 2.6 >2.6	0.11 1.4 >2.5
S. aureus ATCC25923	1 5 10	1,3 2,4 2,8	1,5 >2,3 >2,3	1,5 >2,5 >2,5
E. gerogenes SSICA EA	1 5 10	1,6 >1,8 >1,4	0,5 0,8 >1,9	0.7 1,1 1,9
L innocua ATCC33090	1 5 10	0,99 >2,8 >2,8	0,98 >2,8 >2,8	0,94 >2,8 >2,8
A. ocidoterrestris SSICA 2633 (spore)	15 30 45 60	0.92 1.31 1.9 1.3	0,82 1,1 1,3 1,6	0.7 1,1 1,3 1,6
& subrills SSICA BS (spore)	15 30 45 60	1,6 2,5 2,6 >3,2	0,85 1,7 >3,4 >3,4	1,3 2,0 2,3 >2,6

Piastre metalliche

Nella Tabella 3 sono riportati i risultati delle prove eseguite con piastre metalliche. Gli inoculi sono stati fatti con elevate concentrazioni cellulari o sporali.

Anche in questo caso 5 – 10 min di contatto determinano l'inattivazione completa delle cellule vegetative (4-5 riduzioni decimali). Come per le prove precedenti, anche con le piastre d'acciaio abbiamo riscontrato l'allontanamento di cellule di E. aerogenes da parte del solo flusso d'aria: il valore riportato è la differenza tra numero di riduzioni decimali (nD) dovute all'ozono e quelle determinate dall'aria.

In riterimento alle spore batteriche, l'inattivazione è simile a quella ottenuta su piastre Petri: da 0,9 a 2,1 D per l'A, acidoterrestris e da 2,5 a 3,5 D per 8, subtilis in 60 min.

Ishizaki et al. [17] invece, trattando spore batteriche su filtri di fibra di vetro o di carta con ozono gassoso, hanno riscontrato una diversa resistenza a seconda del materiale di supporto: le spore sono più resistenti se trattate su fibra di vetro.

In letteratura (4, 13) sono riportati i risultati di prove fatte con basse concentrazioni di O₃ gassoso (2 ppm) su superfici metalliche inoculate con cellule vegetative di E. coli, Serratio liquefaciens, S. aureus, L. Innocua e Rodotharula rubro; in questi casi sono state necessarie 4 ore per ottenere da 2,4 a 7,56 riduzioni decimali.

Occorre sottolineare che le prove, sia con piastre Petri

Metal plates

Table 3 shows the results of the trials carried out with metal plates. The inocula were done with high concentrations of cells or spores.

Also in this case 5 – 10 min of contact led to the total inactivation of the vegetative cells (4-5 decimal reductions). As in the preceding trials, also with steel plates we witnessed the separation of **E. aerogeness** cells only by the air flow; the value reported is the difference between the number of decimal reductions (n**D**) due to the azone and that caused by the air.

With reference to bacterial spores, their inactivation is similar to that obtained on Petri plates: from 0.9 to 2.1 D for A, acidotemestris and from 2.5 to 3.5 D for B, subtilis in 60 min.

Ishizaki at al. (17), however, treating bacterial spores on glass fiber or paper filters with gaseous azone, found a differing resistance depending on the support material: the spores are more resistant when treated on glass fiber.

The literature (4, 13) reports the results of trials carried out with law concentrations of gaseous O_g (2 ppm) on metal surfaces inoculated with vegetative cells of E. coll. Sematica liquetaciens. S. aureus, L. innocua and Rodolhorula rubra: in these cases it took 4 hours to obtain from 2.41 to 7.56 decimal reductions.

It must be emphasized that the triab using Petri plates and thase using steel plates were conducted on clean surfaces lacking in organic substances or biofilm; this condition considerably increased the inactivating action of the

INDUSTRIA CONSERVE, N.1, anno 84, 2009 - 39

TA8. 3 - Numero di riduzioni decimali (nC) di cellule microbiche e spore di differenti ceppi inoculati su piastre d'acciaio e trattate con 35,2 ppm di ozono gassoso per tempi diversi (tusso ozono = 7 L/mirc pressione di 0,65 bar: umidità relativa RH 290%).

TABLE 3 - Number of decimal reductions (nD) of microbial cells and spores of different strains inoculated on steel plates and treated with 35.2 ppm of gaseous azone for different times (azone flaw = 7 L/mirc pressure 0.65 bar; relative humidity RH 29050.

Ceppo Strain	Tempo (min) Time (min)	Prova 1 Triar I nD	Prova 2 Trial 2 nD	Prova 3 Trial 3 nD
L brevis SSICA 121	1 5 10	0,9 >5,5 >5,5	1.7 >4.7 >4.7	2.1 ≻5.4 ≻5.4
S. aureus AICC25923	1 5 10	1.9 3.4 >4.9	1.1 3.4 >5.9	1,5 4,1 5,8
E. gerogenes SSICA EA	1 5 10	1.2 >4,9 >4,7	1.6 >4.3 >4.3	1.0 3.0 ≽4,2
L innocua AICC33090	1 5 10	1,5 2,5 >5,1	1.1 >4.0 >4.0	1,0 >4,5 >4,5
P. ocidiloctici SSICA P1	1 5 10	1.2 2.2 >4.8	1.2 3,3 3,7	1,5 3,0 >4,9
A. acidoterrestris SSICA 2633 (spore)	15 30 45 60	0.4 0.9 0.99 1,0	0.4 0.6 0.88 0.9	0,4 1,0 1,5 2,1
B. subfils SSICA BS [spore]	15 30 45 60	1,2 2,4 2,5 3,5	1.2 1.8 1.3 2.6	1,2 2,1 2,4 2,5

sia con piastre d'acciaio, sono state condotte su superfici pulle, prive di sostanza organica e biotim: questa condizione ha aumentato notevolmente l'azione inattivante dell'ozono. Tuttavia Greene et al. [18] in prove simili avevano constatato che la presenza di latte su superfici d'acciaio non intuiva sull'azione inattivante dell'ozono acquoso nei contronti di Pseudomonas fuorescens e Alcaligenes faecalis. Altri autori (13) hanno rilevato invece che la presenza di un brodo a base di came riduceva notevolmente l'efficacia dell'ozono gassoso su superfici d'acciaio, anche se il numero di Gram-negativi sopravviventi era significativamente interiore rispetto a quello ottenuto in prove condotte in assenza di ozono.

Pertanto per aumentare il potere inattivante dell'ozono è di fondamentale importanza una adeguata pulkia preliminare degli impianti, superfici, attrezzature.

CONCLUSIONI

Le prove svolte, sia con ozono sciotto in acqua sia con ozono allo stato gassoso, hanno dimostrato un forte potere inattivante con tempi di contatto molto brevi soprattutto nei contronti di microrganismi d'atterazione (L. brevis, P. acialiactici e S. cerevisiae), di contaminanti fecali (E. aerogenes, E. col), di patogoni (S. oureus) e di contaminanti ambientati (L. Innocuo).

Si riliene quindi che l'ozono possa rappresentare una va-

40 - INDUSTRIA CONSERVE, N.1, anno 84, 2009

ozone. However, Greene et al. (18) had observed in similar Mals that the presence of milk on steel surfaces ald not influence the inactivating action of aqueous ozone against Pseudomonas fluorescens or Alcaligenes faecalis. Other authors (13), however, saw that the presence of a meat-based broth considerably reduced the efficacy of gaseous ozone on steel surfaces, although the number of Gram-negative survivors was significantly lower than that of trials conducted in the absence of ozone.

Thus In order to increase the inactivating power of ozone it is of pivotal importance to ensure adequate preliminary cleaning of machinery, surfaces and equipment.

CONCLUSIONS

The trials conducted both with ozone dissolved in water and with ozone in a gaseous state revealed a strong inactivating power with very short contact times, above all against contaminating micro-organisms (L. brevis, P. acidilactici and S. cerevisiae), faecal contaminants (E. aerogenes, E. colij, pathogens (S. aureus) and environmental contaminants (L. innocua).

It is thus maintained that azone may constitute a valid

I vantaggi dell'impiego dell'ozono sono generalmente sottostimati.

Le operazioni di sanifizzazione sono essenziali per garantire e mantenere condizioni igieniche durante i processi produttivi. Come è noto queste operazioni hanno un forte impatto ambientale in termini di consumi d'acqua, d'energia e depurazione delle acque di scarico.

I costi di investimento per i sistemi di ozonizzazione sono superiori rispetto all'impiego di altri disintettanti quali il cloro o altri prodotti chimici; tuttavia le spese di gestione sono molto basse: occorre energia solo per produrre ozono (l'utilizzo avviene a basse temperature), i consumi d'acqua sono ridotti, come pure i costi per il trattamento delle acque di scarico. Decomponendosi rapidamente in ossigeno, infatti, l'ozono non lascia residui indesiderati tossici, ed è pertanto vantaggioso sia dal punto di vista deila sicurezza dell'alimento (non è necessario un risciacquo del prodotto) sia per la qualità delle acque refue; inoltre la sostituzione di prodotti chimici con l'ozono abbassa la concentrazione di soli e di conseguenza la conducibilità elettrica degli ettuenti (10).

L'acqua ozonizzata implegata per la disinfezione può essere riutilizzata per le fasi iniziali di lavaggio sia direttamente sia dopo ulteriore ozonizzazione, riducendo così i consumi di acqua.

Inoltre l'ossigenazione delle acque retive (dovuta alla conversione dell'ozono) migliora l'efficacia dei processi biologici necessari per lo smaltimento e riduce lo sviluppo di cattivi odori.

Infine, datmomento che l'ozono viene prodotto in situ, si evita il magazzinaggio di sostanze chimiche pericolose.

La spesa iniziale viene così ammorfizzata nel tempo.

L'azono gassoso a bassa concentrazione può essere impiegato per sanitizzare ambienti di lavorazione durante le soste notturne o settimanait: alle concentrazioni sono invece utili all'interno di cappe o "cabine" chiuse per sanificare attrezi e strumenti di lavorazione (lame, coltetti, vassoi ecc.).

Parma. 28 novembre 2006

BIBLIOGRAFIA

- J. G. Kim, A. E. Yousel, S. Dave, J. Food Protect., 62, 1071 (1999).
- M. Graham, Food Technol., 51, 72 (1997).
- M. A. Khadre, A. E. Yousel, J. G. Kim, J. Food Sci., 66, 1242 (2001).
- A. Pascual I. Llorca, A. Canet, Trends in Food Sci. & Technol., 18, 529 (2007).
- 5. D. M. Graham, Food Technol, 51, 72 (1997).
- 6. J. G. Kim, A. E. Yousel, J. Food Sci., 65, 521 (2000).
- L. Restaino, E. W. Frampton, J. 8. Hemphill, P. Palnikas, Appl. Environ. Microbiol, 61, 3471 (1993).
- R. Gervilla, M. Capellas, V. Ferragut, B. Guarnis, J. Food Protect., 60, 33 (1997).
- M. A. Khodre, A. E. Youset, Int. J. Food Microbiol, 71, 131 (2001).
- A. Pascual I, Llorca, A. Canut, Trends in Food Sci. & Technol., 18, 529 (2007).

alternative to chemical disinfectants for the disinfection of waters, surfaces and/or work instruments.

The advantages of the use of ozone are generally underestimated.

Sanitisation is essential to guarantee and maintain hygienic conditions during production processes. As is well known, these operations have a considerable environmental impact in terms of water and energy consumption and waste water treatment.

Investment costs for ozonisation systems are higher than those of the use of other disinfectants such as chlorine or other chemical products; however, management costs are very low; energy is needed only to produce ozone (It is used at low temperatures), and water consumption is reduced, as are the costs of the treatment of waste waters. In fact, since it decomposes rapidly in anygen, azone leaves no unwanted taxic residues, and is thus advantageous from the viewpoint of both food safety (the product does not need to be tristed) and quality of the waste waters: mareover, the substitution of chemical products with ozone lowers the concentration of safts and consequently the electric conductivity of the effuents (10).

Ozonised water employed for disinfection can be reused for the initial washing phases both also directly and after further ozonisation, hence reducing water consumption.

Furthermore, the anygenation of refuent waters (due to the conversion of azone) improves the efficacy of the biological processes necessary for disposal and reduces the onset of off- adours.

Finally, since azone is produced in situ, the storage of hazardous chemical substances is avoided.

The Initial outiay is thus recouped with time.

Gaseous azone at low concentration can be utilised to sanitise work environments during night or weekly stops; high concentrations can be used on the inside of hoods or closed "cabins" to sanitise work tools and instruments (blades, knives, trays etc.).

- M. V. Selma, A. M. Ibànez, M. Cantwell, T. Suslow, Food Microbiol., 25, 558 (2008).
- K. Ishizaki, N. Shinriki, H. Matsuyama, J. Appl. Bacterial, 60, 68 (1986).
- G. Moore, C. Griffilh, A. Peters, J. Food Protect., 63, 1100 (2000).
- 14. M. Y. Akbass, M. Ozdemir, Food Microbiol, 25, 386 (2008).
- E. Das, G. C. Gurakan, A. Baymdirly, Food Microbiol, 23, 430 (2006).
- 16. P. M. Foegeding, Food Microbiol, 2, 123 (1985).
- K. Ishizaki, N. Shinriki, H. Matsuyama, J. Appl. Bacteriol., 60, 68 (1986).
- A. K. Greene, B. K. Few, J. C. Serofini, J. Doly Sci., 76, 3617 (1993).

INDUSTRIA CONSERVE, N.1, anno 84, 2009 - 41