

NORM UNE 13697:2015 – bakterizide Wirkung
NORM UNE 13697:2015 – fungizide Wirkung
NORM UNE 14476:2014 + A1 – viruzide Wirkung

Team: AVATAR by Ecofrog



Versuchsdurchführung: 11.11.2020 und 20.11.2020
Analysebericht: 22897/20

Ziel

Diese Versuche wurden durchgeführt, um **die bakterizide, fungizide und virizide Wirkung** des durch das untersuchte Gerät vor Ort produzierten ozonisierten Wassers in Übereinstimmung mit folgenden Normen **zu beurteilen und zu zertifizieren**:

- Norm UNE 13697:2015 - Quantitativer Versuch auf nicht poröser Oberfläche zur Beurteilung der bakteriziden bzw. fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel, die für Lebensmittel, in der Industrie, im Haushalt und von der Gemeinschaft verwendet werden.
- Norm UNE 14476:2014 + A1 - Quantitativer virizider Suspensionsversuch zu im humanmedizinischen Bereich eingesetzten Antiseptika und chemischen Desinfektionsmitteln. In diesen Versuch wurde zusätzlich der humane Papillomavirus integriert.

Das untersuchte Gerät war das Modell **AVATAR by Ecofrog** (Seriennummer: W04 20/06/0002846) von **Servipro 2.0. S.L.**

Methodologie

Das in der genannten Norm vorgeschriebene Verfahren zur Beurteilung der bakteriziden und fungiziden Wirkung des ozonisierten Wassers auf Oberflächen basiert auf der Feststellung der Anzahl überlebender Mikroorganismen, nachdem das ozonisierte Wasser auf einer vorher kontaminierten Fläche angewandt wurde.

Dazu wird eine Lösung mit Bakterien und Pilzen zusammen mit Störsubstanzen vorbereitet, die auf eine Edelstahlfläche aufgebracht wird und einen Film bildet, der anschließend trocknet.

Anschließend wird das ozonisierte Wasser, das Gegenstand dieser Untersuchung ist, in verschiedenen Konzentrationen so aufgebracht, dass der trockene Film unter Beibehaltung einer spezifischen Temperatur und über einen definierten Zeitraum vom Wasser bedeckt ist. Der Versuch wurde mit folgenden Konzentrationen durchgeführt: 100%, 95% und 90%.

Der nächste Schritt besteht darin, das Material auf der Fläche in ein vorab validiertes Neutralisationsmedium so zu übertragen, dass die desinfizierende Wirkung des ozonisierten Wasser unmittelbar neutralisiert wird. Dadurch kann die Anzahl der überlebenden Mikroorganismen festgestellt werden, die von der Fläche wiedergewonnen werden kann. V

VERSUCH ZUR BAKTERIZIDEN und FUNGIZIDEN WIRKUNG Norm UNE 13697:2015

Parallel dazu wird auch die Anzahl der Bakterien und Pilze auf einer mit hartem (300mg/kg CaCo₃) statt ozonisiertem Wasser behandelten Fläche festgestellt, und es wird nach Verringerung der dem Produkt zuzuschreibenden überlebenden Zellen die Differenz berechnet.

Die eingesetzte Störsubstanz ist eine wässrige Lösung bovines Eiweißes (3g/l), die die Verunreinigung simuliert, die sich auf einer augenscheinlich sauberen und zu desinfizierenden Oberfläche befinden kann.

Die eingesetzten Neutralisatoren waren Lecithin (3g/l); Tween 80 (30ml/l); Natriumthiosulfat (5g/l); L-Histidin (1g/l); in Phosphatpuffer 0,0025N.

Folgende Bakterien- und Pilzstämmen wurden verwendet:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15 442
- *Escherichia coli* ATCC 10 536
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6 538
- *Enterococcus hirae* ATCC 10 541
- *Candida albicans* ATCC 10 231
- *Aspergillus niger* ATCC 16 404

Der Versuch wurde bei einer Temperatur von 18°C ± 1°C bis 25°C ± 1°C durchgeführt.

Die Kontaktzeiten waren im Fall der Bakterienstämmen 5 Minuten ± 10 Sekunden und die Inkubationstemperaturen 37°C ± 1°C.

Im Fall der Pilzstämmen waren die Kontaktzeiten 15 Minuten ± 10 Sekunden und die Inkubationstemperaturen 30°C ± 1°C.

Ergebnisse und Schlussfolgerung

Die folgenden Tabellen enthalten die **Versuchsergebnisse**:

Microorganismo	Suspensión fungicida	Ensayo validación		Control agua Nc	Procedimiento de ensayo a la concentración %		
		NT	NC		1	3	4
Candida albicans ATCC 10 231	(10-5) 255,25 (10-6) 26,22 N:5,76	(10-3) 117,12 (10-4) 12,12 NT:6,05	(10-3) 100,10 (10-4) 12,10 NT: 5,86	10-3 88,87 10-4 7, 6 10-5 0, 0 Nc: 5,93 Nts: >100	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 5,83	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 5,83	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 5,83
	Aspergillus niger ATCC 16 404	(10-5) 255,25 (10-6) 24,20 N:5,8	(10-3) 117,12 (10-4) 12,12 NT:6,08	(10-3) 100,10 (10-4) 9,13 NT:6,01	10-3 86, 84 10-4 8, 8 10-5 0, 0 Nc: 5,93 Nts: >100	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 5,83	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 5,83

Microorganismo	Suspensión bacteriana	Ensayo validación		Control agua Nc	Procedimiento de ensayo a la concentración %		
		NT	NC		1	3	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15 442	(10-6) 236,23 (10-7) 23,19 N:6,77	(10-3) 102,10 (10-4) 10,14 10-5 0, 0 NT:6,01	(10-3) 113,11 (10-4) 10,11 10-5 0, 0 NT:6,05	10-3 >300, >300 10-4 135, 122 10-5 13, 13 Nc: 7,11 Nts: >100	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,01	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,01	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,01
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10 536	(10-6) 219,22 (10-7) 21,21 N:6,74	(10-3) 124,12 (10-4) 9,12 10-5 0, 0 NT:6,1	(10-3) 109,10 (10-4) 13,14 10-5 0, 0 NT:6,04	10-3 >300, >300 10-4 152, 157 10-5 15,14 Nc: 7,19 Nts: >100	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,09	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,09	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,09
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6 538	(10-6) 224,22 (10-7) 21,21 N:6,75	(10-3) 118,11 (10-4) 13,16 10-5 0, 0 NT:6,07	(10-3) 124,12 (10-4) 12,9 10-5 0, 0 NT:6,09	10-3 >300, >300 10-4 163, 162 10-5 15, 14 Nc: 7,21 Nts: >100	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,11	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,11	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,11
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10 541	(10-6) 229,23 (10-7) 20,16 N:6,75	(10-3) 98,98 (10-4) 13,16 10-5 0, 0 NT:5,99	(10-3) 114,11 (10-4) 10,12 10-5 0, 0 NT:6,05	10-3 >300, >300 10-4 148, 145 10-5 13, 13 Nc: 7,16 Nts: >100	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,06	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,06	10-0 0, 0 10-1 0, 0 10-2 0, 0 Nd: < 0,10 Nts: 0 R: > 7,06

N: Dekadischer Logarithmus der Anzahl KBE pro 0,05 ml der Versuchssuspension.

NT: Dekadischer Logarithmus der Anzahl KBE pro Versuchsfläche des

Neutralisationsversuches. NC: Dekadischer Logarithmus der Anzahl KBE pro

Versuchsfläche der Neutralisationskontrolle. Nc: Dekadischer Logarithmus der Anzahl KBE

pro Versuchsfläche für die Wasserkontrolle. Nd: Dekadischer Logarithmus der Anzahl KBE

pro Versuchsfläche für den Versuch des Desinfektionsmittels. R: Mikrobizide Wirkung.

Als **Schlussfolgerung** kann festgehalten werden, dass das ozonisierte Wasser des untersuchten Geräts

- die Norm UNE-EN-13697 (bakterizide Wirkung) unter schmutzigen Bedingungen mit Konzentrationen von 100%, 95% und 90% und einer Kontaktzeit von fünf Minuten gegenüber *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Enterococcus hirae* erfüllt.
- die Norm UNE-EN-13697 (fungizide Wirkung) unter verunreinigten Bedingungen mit Konzentrationen von 100%, 95% und 90% und einer Kontaktzeit von 15 Minuten gegenüber *Gandida albicans* und *Aspergillus niger* erfüllt.

VERSUCH ZUR VIRIZIDEN WIRKUNG Norm UNE 14476:2014 + A1

Methodologie

Das in der genannten Norm vorgeschriebene Verfahren zur Beurteilung der viriziden Wirkung des ozonisierten Wassers basiert auf der berechneten Verringerung der Infektiosität verschiedener Viren, die der Wirkung des ozonisierten Wassers ausgesetzt wurden.

Dazu wird eine Lösung mit verschiedenen Virenarten zusammen mit Störsubstanzen vorbereitet, die auf die Probe reinen ozonisierten bzw. mit hartem Wasser verdünnten Wassers (300mg/kg CaCO_3) zur Anwendung kommt. Der Versuch wurde mit folgenden Konzentrationen durchgeführt: 100%, 95% und 90%.

Die Mischung wird mit einer spezifischen Temperatur und über einen definierten Zeitraum beibehalten. Nach Ablauf der Kontaktzeit wird ein aliquoter Teil der Mischung entnommen, und die virizide Wirkung des ozonisierten Wassers wird unmittelbar unter Anwendung eines gültigen Verfahrens (Verdünnung der Probe in einem zellerhaltenden Medium unter Eistemperatur) neutralisiert.

Die verschiedenen Verdünnungen werden auf Zellkulturen (Petrischalen, Reagenzgläser oder Vertiefungen der Mikrotiterplatten) als Einsicht oder Zellsuspension übertragen. Die Infektiositätsversuche werden als Plattenversuche oder Mengenversuche durchgeführt.

Nach der Inkubation und Verwendung des Spearman-Kärber-Verfahrens oder Zählung auf den Platten werden die Infektiositätstiter berechnet und beurteilt.

Die Verringerung der Infektiosität der Viren wird anhand der Differenzen der Logarithmen der Virentiter vor (Viruskontrolle) und nach der Behandlung mit ozonisiertem Wasser berechnet.

Die eingesetzte Störsubstanz ist eine wässrige Lösung bovines Eiweißes (3g/l), die die Verunreinigung simuliert, die sich auf dem zu desinfizierenden Objekt mit den aufgetragenen Viren befinden.

Der Versuch wurde bei einer Temperatur von $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ bis $70^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Die Kontaktzeiten waren 5, 15, 30 und 60 Minuten ± 10 Sekunden. Die

Inkubationstemperaturen waren $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ und $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Ergebnisse

Das ozonisierte Wasser des erwähnten Geräts erfüllt die Norm EN-14476:2014 + A1 für folgende Konzentrationen und Einwirkzeiten:

> Unter sauberen Bedingungen für:

- ECHO-Virus 100% 5 min.
- Rotavirus 100% 15 min.
- Vacciniavirus 100% 5 min.
- Polyomavirus SV 40 100% 5 min.
- Bakteriophage für Lactobacillus 95% 15min.
- Poliovirus 95% 5 min.
- Adenovirus 100% 5 min.
- Norovirus 100% 5 min.
- Hepatitis B(HBV) 100% 5 min.

> Unter verunreinigten Bedingungen für:

- Influenza A (H7N9) 100% 15 min.
- Coronavirus 100% 5 min
- Humane Papilomavirus (HPV): 100% 5min

Oviedo, 23. November 2020

A blue ink signature scribble over the inoQua logo.

Sara Aguirre Bastarrica

Absolventin des Studiums der Veterinärmedizin - Ärztekammermitglied 33/1616
inoQua | *Instituto de Salud Alimentaria* (Institut für Lebensmittelsicherheit)

Anmerkungen:

- Die Ergebnisse dieser Studie stellen nur einen Nachweis bezüglich der untersuchten Proben dar.
- Ohne vorheriges schriftliches Einverständnis der Autorin darf dieser Bericht weder ganz noch teilweise vervielfältigt werden.
- Die Proben wurden in einem von der *Consejería de Salud y Servicios Sanitarios* (Gesundheitsbehörde) der Region Asturien als privates unabhängiges Labor für die Analyse und sanitäre Kontrolle von Lebensmitteln, Wasser und Getränken untersucht. Es hat seit Februar 1997 die Registernummer 05/0 und ist von der Nationalen Akkreditierungsstelle ENAC (*Entidad Nacional de Acreditación*) in Übereinstimmung mit der Norm UNE-EN ISO/IEC 17025 für die Durchführung von Versuche im Umweltbereich zugelassen. Dies geht aus der Zulassung Nr. 780/LE1514 vom März 2010 hervor. Darüber hinaus wird mit der Wasserwirtschaftsverwaltung bei der Kontrolle und Überwachung der Wasserqualität und dem Abwassermanagement im öffentlichen Bereich im Rahmen der Anordnung MAM/985/2006 zusammengearbeitet.