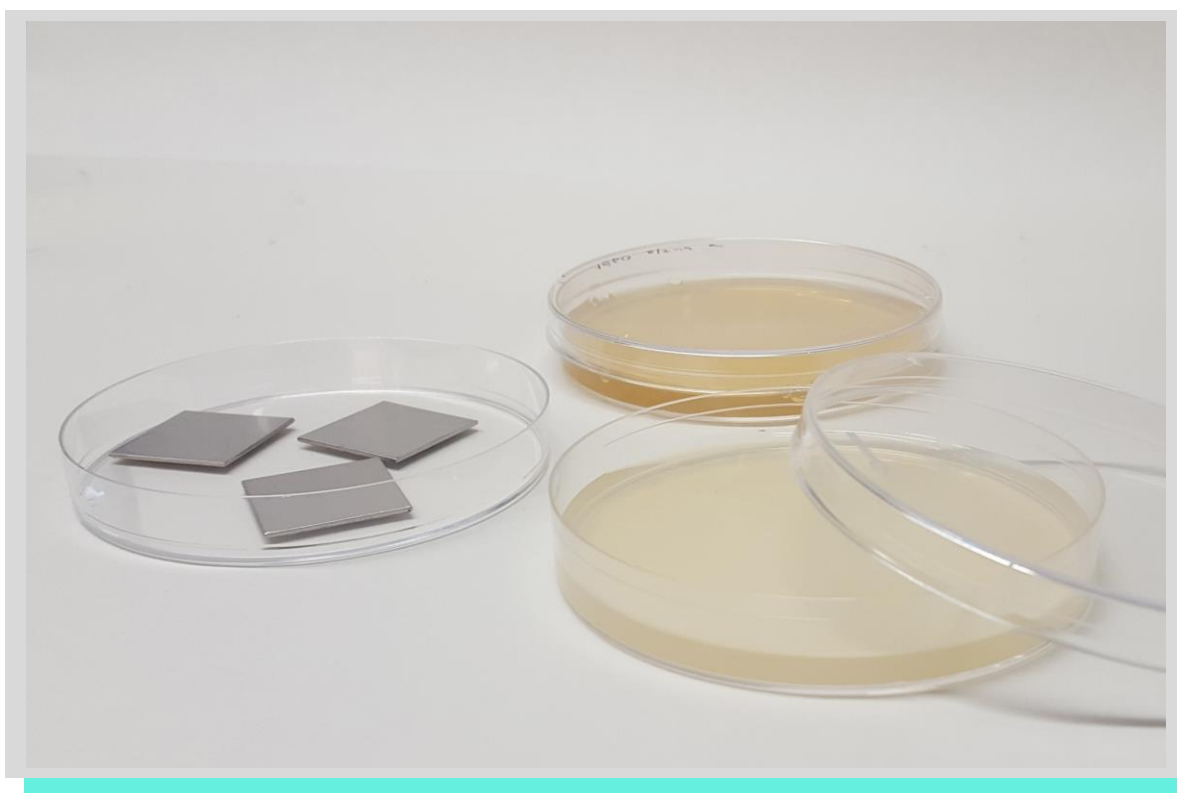


Undersøkelse av antimikrobiell effekt på overflate og i luft ved bruk av ActivePure-teknologi

Anne Vatland Krøvel og Elin Austerheim



Prosjekttittel: VRI- Ventitech
Prosjektnummer: 101264
Institusjon: NORCE Miljø- Industriell biotek
Oppdragsgiver(e): Ventitech AS

Gradering: Konfidensiell
Rapportnr.: 1-2019 NORCE Miljø
ISBN: [ISBN]
ISSN: [ISSN]
Antall sider: 14
Publiseringsmnd.: 06
Sitering: Krøvel og Austerheim (2019), Undersøkelse av antimikrobiell effekt på overflate og i luft ved bruk av ActivePure-teknologi, Rapport 1-2019 NORCE Miljø
[Fritekst]

Revisjoner

| Rev. | Dato | Forfatter | Kontrollert av | Godkjent av | Årsak til revisjon |
|------|------|-----------|----------------|-------------|--------------------|
|------|------|-----------|----------------|-------------|--------------------|

Stavanger, 24.06.2019



Anne Vatland Krøvel
Prosjektleder



Catherine Boccadoro
Kvalitetssikrer

Innholdsfortegnelse

| | |
|--|----|
| Oppsummering | 3 |
| 1. Introduksjon | 4 |
| 2. Material og Metode | 5 |
| 2.1 Testorganismer og vekstmedier..... | 5 |
| 2.2 Testdesign antimikrobiell effekt på overflate | 5 |
| 2.3 Bestemmelse av mikroorganismer i luft | 7 |
| 3. Resultater | 8 |
| 3.1 Antimikrobiell effekt av ActivePure-teknologien på overflate | 8 |
| 3.2 Reduksjon av mikroorganismer i luft ved hjelp av ActivePure-teknologi..... | 9 |
| 3.3 Utslipp O ₃ fra Ventibox mini..... | 12 |
| 4. Konklusjon | 13 |
| 5. Referanser | 14 |

Oppsummering

ActivePure-teknologien har som mål å redusere mikroorganismer i luft og på overflater ved hjelp av reaktive oksygenforbindelser som hydrogenperoksid (H_2O_2), hydroksylradikaler (OH^\cdot), superoksid (O_2^\cdot) og ozon (O_3).

Målet med dette VRI-prosjektet har vært 1) å reprodusere resultatene fra internasjonale studier gjennom kontrollerte laboratorieeksperimenter i delvis kontrollerte omgivelser; 2) å dokumentere at utslipp av ozon fra Ventibox mini ikke overstiger grenseverdi for hva som anses som trygt.

Vi har ikke klart å fullt ut reprodusere resultatene på antimikrobiell effekt av ActivePure-teknologi på overflater. Ved relativ luftfuktighet over 30% ser vi en tendens mot at ActivePure-teknologi gir en høyere reduksjon i antall testorganismer sammenlignet med kontrollgruppen. Forskjellen er ikke signifikant, noe som sannsynligvis skyldes få målinger. Når man gjør målinger av antall mikroorganismer i luften i ikke-kontrollert miljø viser resultatet en reduksjon i antall mikroorganismer på ca. 40% etter 4 døgn med ActivePure-teknologi. Målinger av utslipp av O_3 fra Ventibox mini viser at nivået av O_3 er innenfor grenseverdiene av det som anbefales som trygt dersom rommet er tilstrekkelig ventilert.

1. Introduksjon

ActivePure-teknologien har som mål å redusere mikroorganismer i luft og på overflater. Teknologien baserer seg på RCI-teknologi (Radiant Catalytic Ionization). RCI omdanner fuktighet i luften til reaktive oksygenforbindelser som H_2O_2 , OH^- , O_2^- O_3 , gjennom det som kalles en fotokatalytisk prosess. Slike reaktive oksygenforbindelsene er vist å kunne ha en antimikrobiell effekt [1].

Ventitech AS har utviklet et produkt basert på ActivePure-teknologien hvor formålet med produktet er å skape et bedre innemiljø og redusere infeksjonsfare, primært til bruk i helsesektoren [2]. Det finnes noe dokumentasjon tilgjengelig på antimikrobiell effekt av RCI-teknologien [3-6]. Blant annet har Ortega et al [6] vist at RCI-teknologi reduserte mengden av en rekke mikroorganismer med over 90% i løpet av 24 timer. Men så vidt oss bekjent finnes det ikke tilgjengelig dokumentasjon fra Norge. Som forhandler av ActivePure-teknologi i Norge ønsker Ventitech en verifisering av tidligere resultat, både på antimikrobiell effekt og at produktet ikke slipper ut O_3 over tillatt nivå til bruk i markedsføring av produktet i Norge.

Målet med dette VRI-prosjektet er:

- 1) å reprodusere resultatene fra tidligere internasjonal forskning gjennom delvis kontrollerte laboratorieeksperimenter.
- 2) å dokumentere at utslipp av Ozon (O_3) fra Ventibox mini ikke overstiger oppgitte grenseverdier fra Folkehelseinstituttet og Miljødirektoratet.

2. Material og Metode

2.1 Testorganismer og vekstmedier

Testorganismer ble valgt fra vår microbank basert på en kombinasjon av relevans for bruksområde (dvs. helsesrelatert) og overflateegenskaper hos mikroorganismen.

Tabell 2.1: Testorganismer

| Mikroorganisme | Type/egenskap | Vekstmedia |
|---------------------|------------------------------------|------------|
| <i>E. coli</i> | Gram-negativ tarmbakterie, patogen | LB |
| <i>L. plantarum</i> | Gram-positiv bakterie | MRS |
| <i>C. albicans</i> | Gjær, patogen | YEPD |

Tabell 2.2: Vekstmedier

| Vekstmedium | Type mikroorganisme | Forhandler |
|-------------|---------------------------------------|--------------|
| MRS | <i>Lactobacillus</i> | Oxoid CMO359 |
| LB | Generelt for bakterier, næringsrikt | Sigma L3522 |
| WPC | Generelt for bakterier, næringsfattig | Oxoid CM1012 |
| YEPD | For gjær | Sigma Y1395 |

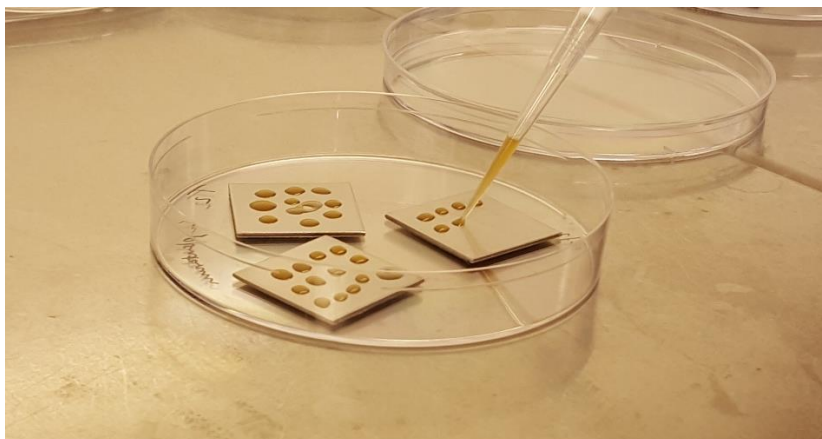
2.2 Testdesign antimikrobiell effekt på overflate

Selve testdesignet er basert på oppsett fra Ortega et al [6] og Kim [4]. To ulike behandlingsgrupper ble testet.

- 1) Ingen behandling
- 2) Behandling med ActivePure-teknologi

Lengden på behandling i testen var 0, 2, 6 og 24 timer.

Organismene benyttet for å teste effekten av ActivePure-teknologien i testen ble individuelt dyrket til midt-til-sen eksponentiell fase i egnet vekstmedium og inokulert på 2,5x2,5 cm sterile kuponger i rustfritt stål, se figur 2.1.



Figur 2.1: Inokulering av kuponger i rustfritt stål med mikrobiell kultur.

Tre paralleller ble laget for hvert tidspunkt for hver type behandling.

Hver av kupongene ble inokulert med 50 μ l mikrobiell kultur til en sluttkonsentrasjon mellom 10^5 - 10^6 organismer og lufttørket i sterilbenk.

Deretter ble kuponger med mikroorganismer plassert i et delvis kontrollert miljø, dvs. rom på 11,3 m² med like lysforhold og ventilasjon mellom 80-105 m³/time. Det ble dedikert 1 rom pr. behandling. Ventilasjonen er fullt operativ mellom 06.00 og 18.00 i bygget, mellom 18.00 og 06.00 reduseres den med 90%. Temperatur var romtemperatur, dvs. 22-23°C. Relativ luftfuktighet varierte med været i testperioden, men var typisk mellom 24-31%.

Dersom ikke annet er sagt, ble ActivePure-teknologien startet 24 timer før test-kupongene ble satt inn i rommet. Kupongene ble plassert i en avstand på 2 meter fra teknologien.

Ved tid 0, ble tre kuponger samlet i separate rør som inneholdt 10 ml 0,1 % peptonvann, se figur 2.2, uten at de hadde vært utsatt for noen behandling. Dette utgjorde nullpunktet for alle behandlinger. De andre kupongene ble samlet etter de ulike behandlingene etter 2, 6 og eventuelt 24 timer.



Figur 2.2: Sampling av mikroorganismer i 0,1% peptonvann.

De ulike prøvene ble fortynnet med 0,1 % peptonvann, strøket ut på plater med passende vekstmedium og dyrket ved 37 °C i 2-3 dager.

2.3 Bestemmelse av mikroorganismer i luft

Antall mikroorganismer i luft ble analysert ved at det ble satt ut dyrknings-skåler med ulike typer vekstmedier; to generelle for bakterier med henholdsvis høyt og lavt næringsinnhold (LB og WPC) og et som er mer egnet for å dyrke sopp (YEPA). Skålene sto åpne uten lokk i 4 timer, før lokk ble satt på og skålene fraktet tilbake til laboratoriet hvor de ble dyrket ved 37°C. Dyrknings-skålene ble avlest etter 1 og 3 dager.

2.4 Måling av O₃

Ozon (O₃) i luft ble målt vha EZ-1z Ecozone Ozon måler fra ECO sensors Inc. Instrumentet ble brukt i henhold til instruksjonene når det gjelder oppvarmingstid og responstid. Se tabell 2.3 for kalibrering.

Tabell 2.3: Kalibrering Ecozone Ozon måler

| Strek | Ozon (PPM) |
|---------------|------------|
| 1ste grønne | På |
| 2ndre grønne | 0,02 |
| 3dje grønne | 0,03 |
| 4de grønne | 0,04 |
| 1ste oransje | 0,05 |
| 2ndre oransje | 0,07 |
| 3dje oransje | 0,08 |
| 1ste røde | 0,10 |
| 2ndre røde | 0,12 |
| 3dje røde | 0,14 |

3. Resultater

3.1 Antimikrobiell effekt av ActivePure-teknologien på overflate

3.1.1. Innledende forsøk

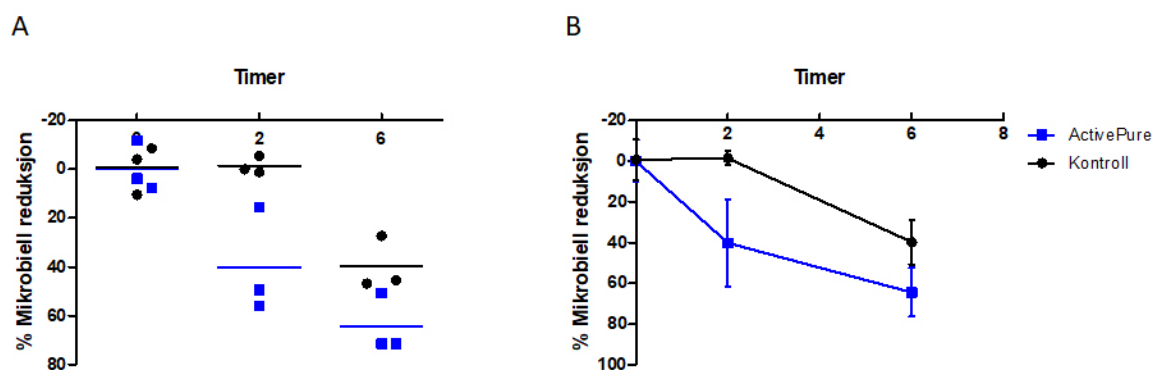
For å teste den antimikrobielle effekten av ActivePure-teknologien på overflate ble det designet et test-oppsett for å måle effekten på en kontrollert mengde av utvalgte mikroorganismer på en overflate i et delvis kontrollert miljø, se 2.1 og 2.2.

Resultatet av dette eksperimentet var at det var veldig liten forskjell på hvor fort testorganismene dør i testgruppen og kontrollgruppen. Etter nærmere undersøkelse av parametere i tidligere tester, diskusjon med oppdragsgiver og leverandør av teknologi i USA, ble ventilasjon og luftfuktighet identifisert som to faktorer som skilte seg vesentlig fra tidligere gjennomførte testforsøk [5, 6]. For eksempel gjennomførte Ortega et al [6] forsøkene under kontrollert luftgjennomstrømning og konstant luftfuktighet på 46%. Det ble også stilt spørsmål om aktive komponenter fra ActivePure-teknologi kunne følge ventilasjonssystemet fra rom behandlet med ActivePure-teknologi til rommet som fungerte som kontroll. Derfor ble det bestemt å gjennomføre ny test med kontrollert relativ luftfuktighet med en av testorganismene. For å unngå eventuell «forurensing» av rommet brukt til kontroll fra rom med ActivePure-teknologi ble rom brukt til kontroll flyttet til en annen del av bygget.

3.1.2 Eksponeringseksperiment med kontrollert relativ fuktighet

På bakgrunn av innledende forsøk ble *C.albicans* brukt som testorganisme. Det ble benyttet en kultur i eksponentiell fase som ble platet ut i en konsentrasjon på $2.16E+05$ cfu/cm² på sterile kuponger i rustfritt stål. For å sikre at %RH var over 30% for alle tre testgruppene ble det brukt luftfukter. Både luftfukter og ActivePure-teknologi ble startet 2,5 timer før kupongene ble satt inn i rommet. %RH var ikke under 30% på noe tidspunkt av eksperimentet. Kontrollgruppen ble testet i rom i en annen del av bygget for å hindre eventuelle overføring av aktive komponenter via ventilasjonssystemet.

Tallene er gjennomsnitt av tre paralleller. I figur 3.1 ser vi at det er ganske stor variasjon mellom parallellene for de ulike behandlingene på de ulike tidspunktene. Reduksjon i antall mikroorganismer er målt opp mot kontroll T₀. Forskjellen mellom behandlingene på de ulike tidspunktene er analysert ved hjelp av en ikke-parametrisk tosidig statistisk test (Mann-Whitney). Resultatet av den statistiske analysen viser en P-verdi =0,1, dvs. at det ikke er signifikant forskjell mellom medianen for de to gruppene.



Figur 3.1: Mikrobiell reduksjon i % som følge av ActivePure-teknologi sammenlignet med kontroll. A) viser datapunktene og B) viser trendlinjen med standardavvik. Forskjellen mellom behandlingene på de ulike tidspunktene er analysert ved hjelp av Mann Whitney test, $P=0,1$, $n=3$.

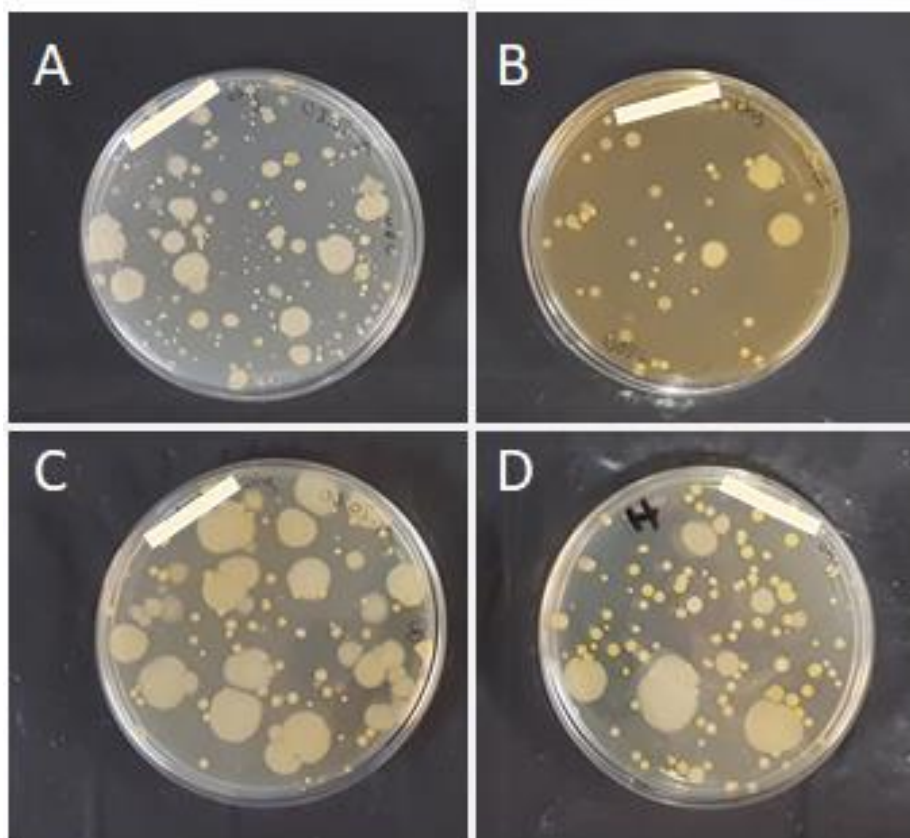
Tabell 3.1: Resultat antimikrobiell reduksjon etter behandling med ActivePure-teknologi, vist som gjennomsnitt av tre målinger pr. behandling pr. tidspunkt.

| Timer | Kontroll | | ActivePure | |
|-------|----------|-------------|------------|-------------|
| | cfu/ml | % reduksjon | cfu/ml | % reduksjon |
| 0 | 1,54E+06 | | | - |
| 2 | 1,52E+06 | 1,3 | 9,20E+05 | 40,3 |
| 6 | 9,72E+05 | 39,8 | 5,47E+05 | 64,5 |

En foreløpig konklusjon av dataene er at det ikke er forskjell mellom kontroll og *C.albicans* behandlet med ActivePure-teknologi. Videre ser det ut til å være en trend mot at det er forskjell ved behandling med ActivePure-teknologi etter 2 og 6 timer, men forskjellen er ikke signifikant, mest sannsynlig pga. få målinger og stor variasjon mellom parallellene.

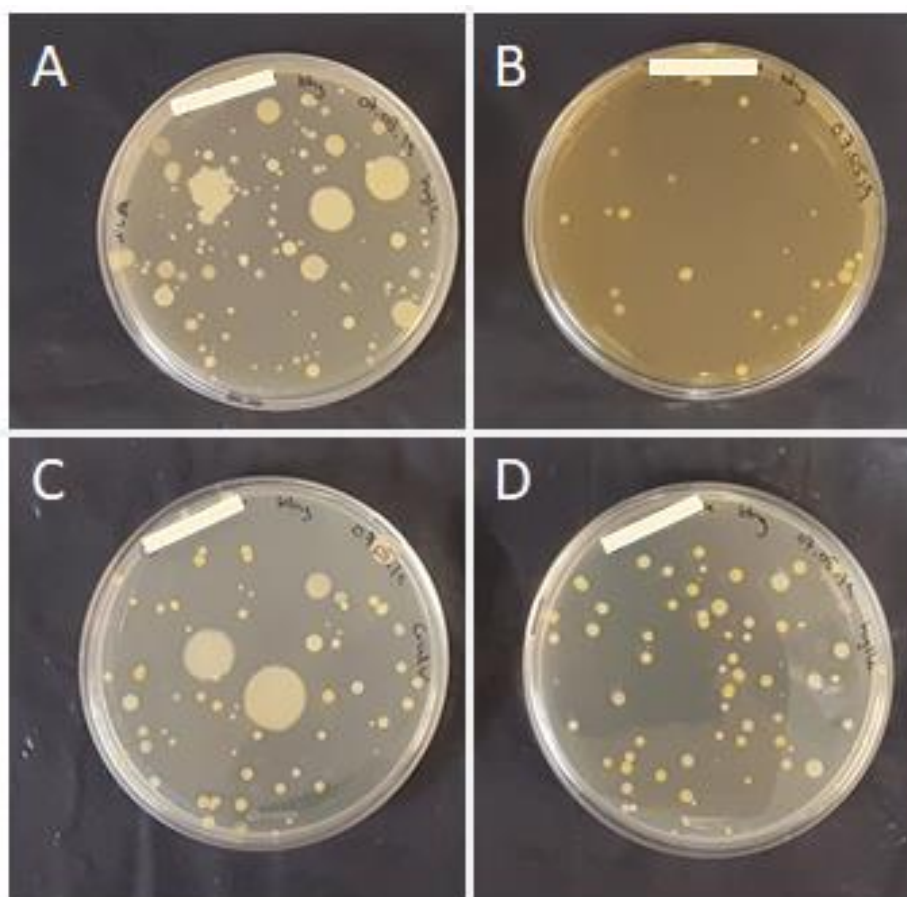
3.2 Reduksjon av mikroorganismer i luft ved hjelp av ActivePure-teknologi

ActivePure-teknologi har blitt installert i stellerrommet i en barnehage i Stavanger. For å se på effekten av teknologien på antall mikroorganismer i luft i et ikke-kontrollert miljø, dvs ute i felt og ikke under kontrollerte laboratoriebetingelser, ble teknologien skrudd av 12.04.2019. Etter 3 uker ble antall mikroorganismer bestemt som beskrevet i punkt 2.3, se figur 3.2.



Figur 3.2: Resultat vekst luftprøver fra stellerom i en barnehage uten behandling med ActivePure-teknologi. Vekstmediene er WPC (A), YEPD (B) og LB (C&D). Skål C ble samlet på gulvet under stellebenk mens de tre andre ble samlet på hyller ved stellebenk.

Deretter ble ActivePure-teknologien aktivert igjen og ny prøvetaking etter samme prosedyre (se punkt 2.3) ble gjennomført etter 4 dager. Resultatet av dyrkningsprøvene fra disse luftprøvene er vist i figur 3.3.



Figur 3.3: Resultat vekst luftprøver fra stellerom i en barnehage behandlet med ActivePure-teknologi i 4 dager. Vekstmediene er WPC (A), YEPD (B) og LB (C&D). Skål C ble samlet på gulvet under stellebenk mens de tre andre ble samlet på hyller ved stellebenk.

Tabell 3.2: Resultat luftprøver stellerom i barnehage for og etter behandling med ActivePure-teknologi.

| Dyrkingsmedium | Før behandling (cfu) | Etter behandling (cfu) | % Reduksjon |
|--------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| WPC hylle på vegg | 147 | 90 | 38,8 |
| YEPD hylle på vegg | 47 | 24 | 48,9 |
| LB gulv | 96 | 61 | 36,5 |
| LB hylle på vegg | 109 | 61 | 44,0 |
| ATP måling* | 13869 | 446 | 96,8 |

* Prøve tatt på overflate stellebenk samme dag som skåler sto ute, utført av Ventitech.

Dette ene prøvesettet fra ett stellerom i en barnehage er at behandling med ActivePure-teknologi gir reduksjon i antall mikroorganismer med et snitt på ca. 40% på de tre typene dyrkningskåler som er testet. Siden testen er gjort i et ikke-kontrollert miljø der rommet

vil få tilførsel av ulike nivå av mikroorganismer gjennom f.eks. ventilasjon og mengde aktivitet i rommet, gjenspeiler resultatene situasjonen i prøvetakingstidsperioden. For å få et mer sikkert og konsekvent resultat for teknologien må det tas prøver flere steder og over lengre tid.

3.3 Utslipp O₃ fra Ventibox mini

Det er vist at eksponering for ozon kan føre til helseskader og derfor har Folkehelseinstituttet og Miljødirektoratet fastsatt grenseverdier for hvilke nivåer som er trygge for de fleste [7]. Grenseverdi for eksponering av ozon er 100 µg/m³ i en time eller 80 µg/m³ i 8 timer. Måleinstrumentet EZ-1z Ecozone Ozone måler ozon i luft og under 0,05 ppm= 64,6 µg/m³ ansees som trygt område [8]. Dette instrumentet ble brukt for å dokumentere nivå av ozon fra Ventibox mini med ActivePure-teknologi.

Målingen ble gjennomført i flere omganger. I første runde ble måleinstrumentet plassert i en avstand på ca. 50 cm fra utslippsområdet på Ventibox mini og ozon-nivået ble målt kontinuerlig i ca. 50 timer.

Resultatet av målingene var at ozonnivået er innenfor akseptabelt «grønt nivå» dvs. under 0,05 ppm eller lavere ved alle målinger unntatt en, som var oransje (0,07 ppm/90,5 µg/m³). Denne målingen ble gjort tidlig om morgenen og skyldes mest sannsynlig redusert ventilasjon i løpet av kvelden/natten. Så snart ventilasjonen hadde gått på normalt nivå en liten stund var ozon-nivået nede under 0,05 igjen, se tabell 3.3.

Tabell 3.3: Resultat målinger utslipp av O₃ fra Ventibox mini med O₃. Instrumentet gir resultat innen tre kategorier; Grønn, oransje og rød.

| Dato | Tid | Grønn <0,05 | Oransje0,05- 0,1 | Rød >0,10 | Kommentar |
|----------|-------|----------------|---------------------|--------------|--|
| 13.03.19 | 07:48 | x | | | Teknologi startet |
| | 13:30 | x | | | |
| | 16:42 | x | | | |
| 14.03.19 | 10:20 | x | | | |
| | 11:20 | x | | | |
| | 12:40 | x | | | |
| | 15:20 | x | | | |
| | 16:40 | x | | | |
| 15.03.19 | 06:45 | | x (0,07) | | Ventilasjon redusert fra 18.00 til 06.00 |
| | 09:20 | x | | | |
| | 10:43 | x | | | |

Fordi O₃ ikke nødvendigvis fordeler seg uniformt i et rom men danner lommer, ble det også gjort en utvidet måling over to dager hvor det ble målt ulike steder i rommet hvor

Ventibox er plassert. Da så vi at i dette rommet, ventilert som kontor, ble det en ansamling av ozon i forkant av Ventibox mini som overstiger akseptabelt nivå etter ca. 24 timer.

Samme eksperimentet ble gjennomført i en damegarderobe med 1 dusj, som har en ventilasjon som kanskje vil være mer lik typiske bruksområder for ActivePure-teknologien. Det ble igjen gjort målinger over, ved siden av og under Ventibox mini, se tabell 3.4.

Tabell 3.4: Resultat utvidete målinger på utslipp av O₃ fra Ventibox mini. Målingene er gjort i en damegarderobe med 1 dusj. Målepunkt er henholdsvis 1) over 2) til høyre for 3) rett fremfor 4) til venstre for og 5) under utslippssted for O₃ fra Ventibox mini. Måleresultat er oppgitt i ppm.

| Dato | Tid | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Kommentar |
|----------|-------|---|---|------|---|---|---|
| 17.06.19 | 12:30 | | | | | | EcoZone og ActivePure-teknologi startet |
| 18.06.19 | 07:50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 12:45 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | |
| 19.06.19 | 08:40 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | |
| | 12:15 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | |
| 20.06.19 | 08:30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 13:45 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | |
| 21.06.19 | 13:00 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | |
| 24.06.19 | 10:15 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | |

Resultatet av disse målingene viser at utslippene av O₃ fra Ventibox mini ligger på innenfor grønt område i hele måleperioden. Det er litt forhøyet måling (0,03 ppm) rett ved utslippssted fra Ventibox mini, mens de andre målestedene ikke gir utslag på instrumentet. Konklusjonen på disse testene er at så lenge rommet er tilstrekkelig ventilert er nivåene av O₃ innenfor akseptabelt nivå.

4. Konklusjon

Målet med dette VRI-prosjektet har vært 1) å reprodusere resultatene fra tidligere studier gjennom kontrollerte laboratorieeksperimenter i delvis kontrollerte omgivelser og 2) å dokumentere at utslipp av Ozon (O₃) fra Ventibox mini ikke overstiger grenseverdi for hva som anses som trygt.

Vi har ikke klart å fullt ut reprodusere resultatene på antimikrobiell effekt av ActivePure-teknologi på overflater. Ved relativ luftfuktighet til over 30% ser vi en tendens mot at ActivePure-teknologi gir en høyere reduksjon i antall mikroorganismer sammenlignet med kontrollgruppen. Forskjellen er ikke signifikant (P=0,1), noe som sannsynligvis skyldes få

målinger og stor variasjon mellom parallellene. Når man gjør målinger av antall mikroorganismer i luften i et ikke-kontrollert miljø viser resultatet en reduksjon i antall mikroorganismer på ca. 40% etter 4 døgn med ActivePure-teknologi. Målinger av utslipp av O₃ fra Ventibox mini viser at nivået av O₃ er innenfor grenseverdiene av det som anbefales som trygt dersom rommet er tilstrekkelig ventilert.

5. Referanser

1. Vatansever, F., et al., *Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond* FEMS Microbiology reviews, 2013. **37**(6): p. 955-989.
2. Ventitech. 2019 [cited 2019 11.06]; Available from: <https://www.ventitech.no/>.
3. Grinshpun, S.S., et al., *Control of aerosol contaminants in indoor air: combining the particle concentration reduction with microbial inactivation*. Environmental science and technology, 2007.
4. Kim, J.H., *Testing the Inactivation and Surface Kill of Legionella pneumophila Using Fresh Air with ActivePure by Aerus/Vollara*. 2015, Research Triangle Institute: RTI International.
5. Messina, G., et al., *Radio catalytic ionization: an innovative approach for indoors disinfection*. European Journal of Public Health, 2015. **25**(3).
6. Ortega, M.T., et al., *Efficacy of Ecoquest radiant catalytic ionization cell and breeze at ozon generator at reducing microbial populations on stainless steel surfaces*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2007. **15**(4): p. 359-368.
7. Folkehelseinstituttet. *Ozon*. 2019; Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/luftkvalitet/ozon/ozon/>.
8. ECO sensor Inc. *Instructions for use*. 2019 [cited 2019 11.06]; Available from: <http://www.ecosensors.com/wp-content/uploads/2012/09/EZ1X.pdf>.



NORCE Norwegian Research Centre AS
www.norceresearch.no