

**DETERMINAZIONE *in vitro* DELL'ATTIVITÀ  
BATTERICIDA O BACTERIOSTATICA  
E DELL'ATTIVITÀ FUNGICIDA**

COD. LAB.: 1805032
Data emissione: 20/06/2018
Rev. 1: 10/11/2018
Efficacia microbica <i>in vitro</i>

**Committente / Customer:**

**NAMIPROJECT S.r.l. s**

Dr.ssa Patrizia Krisia

Sede produzione P.M.A. SRL  
Via Vendri n.16 – 37142 VERONA  
P.IVA 06692210963  
Tel. 3476519597 - 3483019067  
@: [nami@namidetergente.it](mailto:nami@namidetergente.it)  
@: [info@namiorganic.com](mailto:info@namiorganic.com)  
[www.namidetergente.it](http://www.namidetergente.it)  
[www.namiorganic.com](http://www.namiorganic.com)

**Prodotto / Test Sample:**

**DETERGENTE NAMI 200 ml**  
**Detergente Biologico per Ambienti**

Data ricevimento campione / *Reception date:* 03/05/2018

Periodo di analisi: *Period of analysis:*

Data inizio analisi / *Date of testing:* 20/05/2018

Data fine analisi / *End Date test:* 20/06/2018

## **INTRODUZIONE**

### **REGRESSIONE LINEARE / D-VALUE METHOD**

#### **1-SCOPO DEL TEST / PURPOSE OF THE TEST**

Il metodo della regressione lineare è un metodo rapido adeguato per la valutazione dell'efficacia antimicrobica di un prodotto ad attività di inibizione microbica.

Il metodo si basa sulla determinazione del valore D, definito come il tempo necessario ad abbattere di 1 logaritmo (del 90% quindi) la carica microbica inocolata standard.

L'inoculo viene effettuato singolarmente con i più diffusi microrganismi patogeni e a tempi diversi ma molto ravvicinati, viene determinata la carica microbica residua per ogni ceppo microbico, fino a 7 giorni dall'inoculo. Questi dati consentono di descrivere una curva, che permette di calcolare il valore D per ogni ceppo microbico.

Valutando tale valore in base ai criteri di accettabilità definiti per la metodica, si determina l'efficacia microbica.

*The D-value method is a rapid method for estimating microbicidal efficacy.*

*The linear regression method is an appropriate rapid method for assessing the antimicrobial efficacy of a product with antimicrobial activity.*

*The method is based on the determination of the D value, defined as the time, expressed in hours, necessary to reduce by 1 logarithm (of 90% therefore) the inoculated microbial load.*

*The inoculum is carried out individually with the most common pathogenic microorganisms and at different times but very close together, the residual microbial charge for each microbial strain is determined, up to 7 days after inoculation. These data allow to describe a curve, which allows to calculate the D value for each microbial strain.*

*By evaluating this value based on the acceptability criteria defined for the method, microbial efficacy is determined.*

#### **2-FASI DEL TEST REGRESSIONE LINEARE / LINEAR REGRESSION TEST STEPS**

Le fasi procedurali consistono in:

- ✓ Conta microbica preliminare sui campioni da esaminare
- ✓ Preparazione dei microrganismi per l'inoculo
- ✓ Inoculo dei campioni
- ✓ Controlli ad intervalli prestabiliti della sopravvivenza dei microrganismi
- ✓ Valutazione dei risultati

*Linear regression test steps the following:*

- ✓ Preliminary microbial count on test samples
- ✓ Preparation of microorganisms for the inoculum
- ✓ Inoculation of samples
- ✓ Check of microorganism survival at pre-determined intervals
- ✓ Evaluation of the results

### 3-MICRORGANISMI UTILIZZATI / MICROORGANISMS USED:

#### Microrganismi utilizzati ATCC\*

ATCC\* microorganisms for antibacterial testing:

\*ATCC (American Type Collection Control)

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC* 6538	G + bacteria	Microbiologics Lotto 485-422-1 Exp. 09/2018	4.9x10 <sup>6</sup> cfu/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC* 9027	G - bacteria	Microbiologics Lotto 484-789-1 Exp. 11/2018	5.3x10 <sup>6</sup> cfu/g
<i>Escherichia coli</i>	ATCC* 8739	G - bacteria	Microbiologics Lotto 483-684-1 Exp. 05/2019	6.6x10 <sup>6</sup> cfu/g
<i>Candida albicans</i>	ATCC*10231	Lievito / Yeast	Microbiologics Lotto 443-753-1 Exp. 04/2019	4.1x10 <sup>5</sup> cfu/g
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC*16404	Muffa/ Molds	Microbiologics Lotto 392-647-1 Exp. 12/2018	3.8x10 <sup>5</sup> cfu/g

Customer: Microbiologics (BIOLIFE):

Fornitura di ceppi titolati per l'inoculum al tempo 0 / Delivery of titrated strains for inoculation at time 0.

#### TERRENI DI COLTURA / MEDIUM:

✓ Tryptone Soya Agar (TSA) per il metodo di semina in inclusione in piastra Petri.  
Neutralizzante: Lethen Broth.

✓ *Tryptone Soya Agar (TSA) for plate-count method.*  
*Neutralizing: Lethen Broth should inactivate the preservative and allow for unrestrained microbial growth.*

#### METODO /METHOD:

Si utilizza il metodo di inclusione in medium agar. Il prodotto inoculato viene conservato a temperatura ambiente e al buio per tutta la durata del test.

*Plate-count method; plating is done in duplicate using medium agar. The inoculated samples are incubated at room temperature.*

#### TEMPI DI VERIFICA / EVALUATION OF TEST TIME:

La determinazione dei microrganismi sopravvissuti viene svolta alla diluizione pari a 50 ml in 10 l di acqua ai seguenti tempi di contatto:

tempo prima dell'inoculo (= t<sub>0</sub> inoculo iniziale); dopo 2 giorni (= t<sub>1</sub> (2 gg.)), dopo 4 giorni (= t<sub>2</sub> (4 gg.)), dopo 7 giorni (= t<sub>3</sub> (7 gg.)) e dopo 14 giorni (= t<sub>4</sub> (14 gg.))

*The determination of the surviving microorganisms is carried out at the dilution of 50 ml in 10 l of water at the following contact times:*

*time before inoculation (= t<sub>0</sub> initial inoculum); after 2 days (= t<sub>1</sub> (2 days)), after 4 days (= t<sub>2</sub> (4 days)), after 7 days (= t<sub>3</sub> (7 days)) and after 14 days (= t<sub>4</sub> (14 days)).*

*A neutralizer should be incorporated un the plated agar when recovering bacteria by streaking plates.*

---

## 5- LIMITI DI ACCETTABILITÀ: VALORE D / ACCEPTABILITY LIMITS : D VALUE

Il valore D è il valore che definisce i limiti di accettabilità: tempo di inattivazione dei microrganismi contaminanti in esame.

Il valore **D** per i batteri patogeni deve corrispondere a  $\leq 4$  ore almeno dopo 24 ore dal tempo dell'inoculo iniziale, cioè deve essere dimostrata una riduzione di almeno 1 logaritmo (pari al 90% dell'inoculo iniziale) ogni 4 ore.

## 8-VALUTAZIONE E CALCOLO DEI RISULTATI / EVALUATION AND RECKONING OF THE RESULTS

Nel certificato di analisi sono riportati i valori cfu (unità formanti colonia) / gr dei singoli microrganismi negli intervalli di tempo programmati.

*The certificate of analysis reports cfu (colony forming units)/gr values for each bacterium during the established control intervals.*

## 9- BIBLIOGRAFIA /

- ✓ D.S. Orth. Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. *J Soc Cosmet Chem* 30: 321-332 (1979).

## RISULTATI

**Committente / Customer:**

**NAMIPROJECT S.r.l. s**  
Dr.ssa Patrizia Krisia

**Prodotto di prova / Test Sample:**

**DETERGENTE NAMI 200 ml**  
**Detergente Biologico per Ambienti**

Data ricevimento campione / *Reception date:* 03/05/2018

Periodo di analisi: *Period of analysis:*

Data inizio analisi / *Date of testing:* 20/05/2018

Data fine analisi / *End Date test:* 20/06/2018

**Tabella 1:** Risultati espressi in cfu/ml / *Table 1: Results expressed in cfu/ml*

<b>Tempo (giorni)</b>	<b><i>E.coli</i></b>	<b><i>P.aeruginosa</i></b>	<b><i>S.aureus</i></b>	<b><i>C.albicans</i></b>	<b><i>Asp.brasiliensis</i></b>
<b>0</b>	2,1,E+05	1,9,E+05	2,3,E+05	1,6,E+04	1,4,E+04
<b>2</b>	2,0,E+04	5,0,E+04	2,4,E+04	1,0,E+04	1,0,E+04
<b>4</b>	6,5,E+03	1,0,E+04	5,7,E+03	7,0,E+03	8,2,E+03
<b>7</b>	2,8,E+03	3,9,E+03	1,7,E+03	3,8,E+02	6,0,E+02
<b>14</b>	1,0,E+02	2,0,E+02	1,0,E+02	1,0,E+02	1,0,E+02

Cfu / ml: Unità formanti colonia relative ad 1 ml di prodotto; h= intervallo di tempo di analisi in ore.

E= valore esponenziale.

*Cfu/ml* : colony forming units relative to a mL of product; *h*: hours time of analysis.

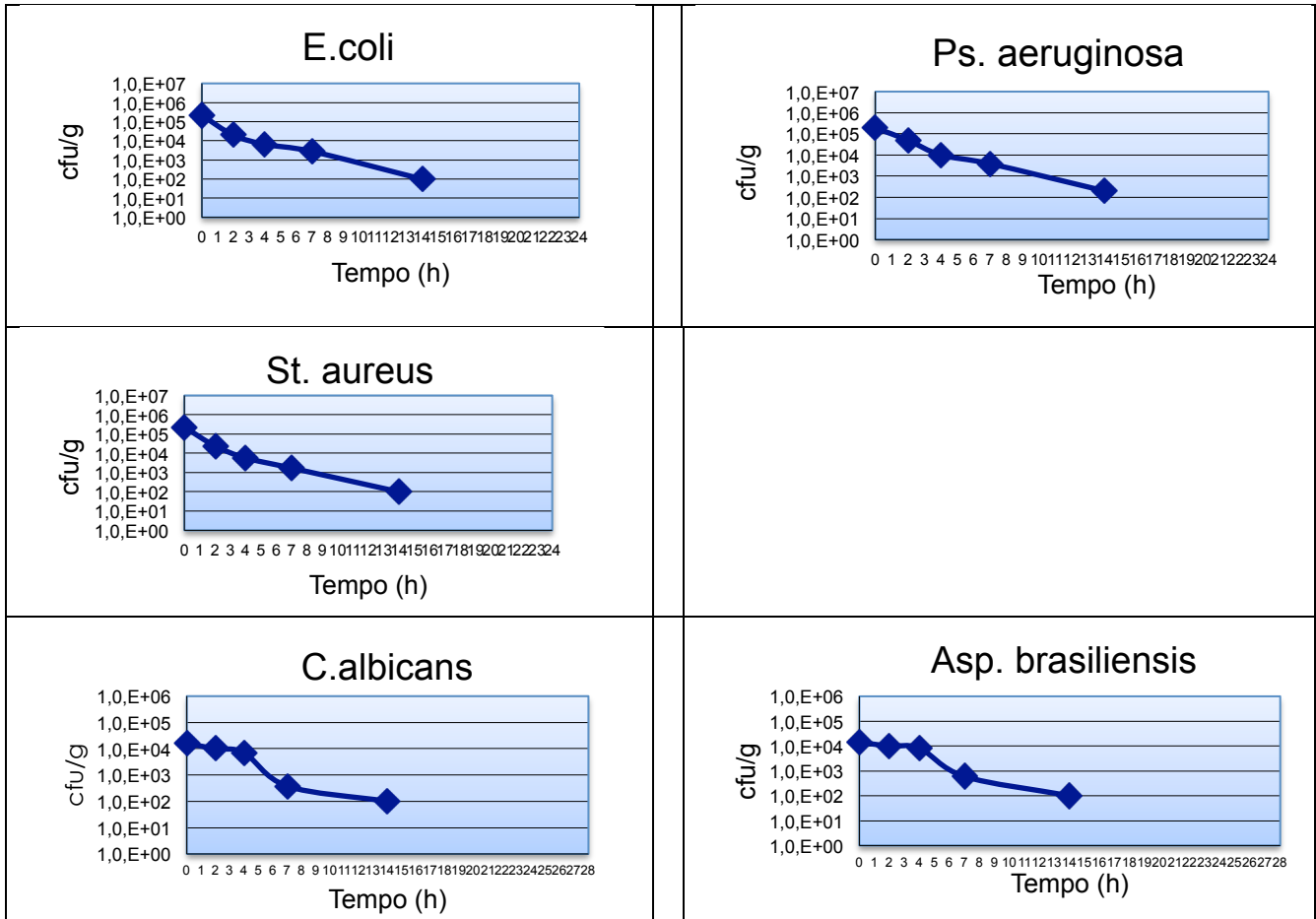
E= exponential value.

**Tabella 3:** Valore **RIDUZIONE MICROBICA (%)**:

*Table 3: Microbial Reduction Value (%)*:

<b>Tempo (gg)</b>	<b><i>E.coli</i></b>	<b><i>P.aeruginosa</i></b>	<b><i>S.aureus</i></b>	<b><i>C.albicans</i></b>	<b><i>Asp. Niger</i></b>
<b>2</b>	90,48%	73,68%	89,57%	37,50%	28,57%
<b>4</b>	96,90%	94,74%	97,52%	56,25%	41,43%
<b>7</b>	98,67%	97,95%	99,26%	97,63%	95,71%
<b>14</b>	99,952%	99,895%	99,957%	99,38%	99,29%

**Grafico / Graph:**



---

## CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

---

In base ai risultati ottenuti dal metodo della Regressione Lineare e dal calcolo del valore D si rileva una riduzione nei confronti dei microrganismi utilizzati superiore al 90% dopo differenti tempi di contatto dall'inoculo iniziale.

Il prodotto denominato / *According to the obtained results the product called:*

**Committente / Customer:**

**NAMIPROJECT S.r.l. s**  
Dr.ssa Patrizia Krisia

**Prodotto di prova / Test Sample:**

**DETERGENTE NAMI 200 ml**  
**Detergente Biologico per Ambienti**

presenta una attività di inibizione microbica "in vitro" dopo 2 giorni di contatto nei confronti dei batteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* rispettivamente una riduzione pari a 96,9%, 94,74% e 97,52%, e una attività di inibizione microbica "in vitro" dopo 7 giorni di contatto nei confronti dei miceti, quali *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*, rispettivamente pari ad una riduzione del 97,63 e 95,71%.

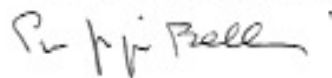
Osservando l'inibizione microbica della formulazione Nami Detergente biologico a base di probiotici presenta una significativa riduzione microbica, indotta principalmente dalle caratteristiche della composizione microbica e dall'azione di "exclusion competition" nei confronti dei ceppi standard patogeni utilizzati per eseguire questo test di efficacia in vitro

---

Data report: 20/06/2018



(Firma / Signature) Dr.ssa Alberta Vandini  
n. AA\_039993 O.N.B.)



in collaborazione con Prof. Pier Giorgio Balboni (Firma / Signature) docente  
incaricato di insegnamento (MED/07) come cultore della materia "Microbiologia"  
Sezione di Microbiologia – Università di Ferrara