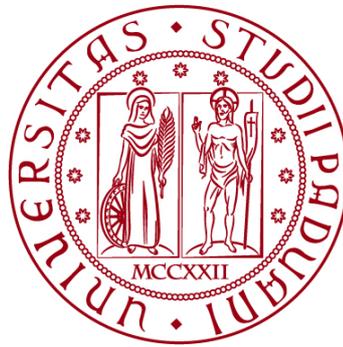


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**IMPIEGO DI TECNOLOGIA UV LED PER LA  
DISINFEZIONE: VALUTAZIONE DELL' EFFICACIA  
BATTERICIDA**

**Tutor: Prof.ssa Claudia Del Vecchio  
Dipartimento di Medicina Molecolare**

**Laureanda: Ilaria Nicoletti**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



# Indice

<b>1. ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUZIONE.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Pandemia e disinfezione.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Principali microrganismi patogeni.....</b>	<b>2</b>
<b>2.3 Approcci di sanificazione.....</b>	<b>3</b>
2.3.1 Calore.....	3
2.3.2 Agenti chimici.....	4
2.3.3 Plasma freddo.....	4
2.3.4 Radiazioni .....	5
<b>3. SCOPO TESI.....</b>	<b>6</b>
<b>4. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>7</b>
<b>4.1 Materiali.....</b>	<b>7</b>
4.1.1 Ceppi batterici.....	7
4.1.2 Terreni di coltura.....	7
4.1.3 Dispositivo .....	7
4.1.4 Programmi elaborazione dati .....	7
<b>4.2 Metodi .....</b>	<b>7</b>
4.2.1 Preparazione della sospensione batterica .....	7
4.2.2 Determinazione del titolo batterico attraverso diluizioni seriali .....	8
4.2.3 Preparazione dei carriers e fase di esposizione .....	8
4.2.4 Recupero dei batteri e enumerazione delle colonie.....	8
<b>5. RISULTATI.....</b>	<b>9</b>
<b>5.1 Set up sperimentale.....</b>	<b>9</b>
<b>5.2 Effetto delle sorgenti LED su una sospensione di <i>E. coli</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>5.3 Effetto delle sorgenti LED su una sospensione di <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....</b>	<b>17</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>18</b>



## 1. ABSTRACT

La recente pandemia di COVID-19 ha dimostrato l'importanza di una corretta disinfezione degli ambienti, fondamentale come misura di prevenzione nei confronti della diffusione di agenti patogeni. Ha inoltre portato ad una maggiore attenzione e ricerca relativa alle tecniche di disinfezione tradizionalmente utilizzate e allo sviluppo di nuovi approcci più efficaci e sostenibili.

Uno dei metodi oggi maggiormente utilizzato consiste nell'impiego di radiazioni ultraviolette, ed in particolare degli UV-C. A fronte della loro grande efficacia battericida e virucida, sono in grado, infatti, di determinare danni agli acidi nucleici e uccidere quindi l'agente patogeno, bisogna tenere in considerazione che non possono essere utilizzati in presenza poiché possono provocare gravi danni soprattutto ad occhi e cute. Inoltre, è appurato che gli UV-C siano cancerogeni per l'uomo.

Alla luce di queste considerazioni, negli ultimi anni si stanno studiando nuovi approcci che utilizzino una lunghezza d'onda più vicina al visibile, più sicura, quindi, per l'uomo.

Durante il progetto di tirocinio è stata testata l'efficacia battericida di un dispositivo messo a punto da un team di ingegneri dell'Università di Padova che utilizza proprio diverse lunghezze d'onda comprese tra gli UV e il visibile.

In particolare, il dispositivo è stato testato nei confronti di *E. coli* e *S. aureus*.

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 Pandemia e disinfezione

L'importanza e l'attenzione relativa alle tecniche di sterilizzazione e disinfezione è aumentata notevolmente dopo la pandemia di COVID-19. La pandemia è stata causata dal virus SARS-CoV-2 appartenente alla famiglia dei Coronaviridae e in particolare al genere dei betacoronavirus. I primi casi sono emersi nella città di Wuhan in Cina verso la fine del 2019 seguiti poi da una rapida diffusione su scala globale che ha portato l'OMS nel marzo del 2020 a dichiarare lo stato di pandemia. Secondo i dati riportati dall'OMS il COVID ha determinato più di 7 milioni di morti nel mondo.

La facilità e rapidità con cui il virus è in grado di trasmettersi, ed in particolare, la sua capacità di resistere a lungo sulle superfici, ha richiesto l'attuazione di misure di disinfezione per cercare di ridurre la trasmissione e contenere la pandemia.

L'efficace disinfezione delle superfici ambientali è infatti un passo fondamentale nella prevenzione della diffusione di agenti infettivi. Prima della pandemia veniva eseguita per lo più attraverso una pulizia manuale essenziale per garantire un'adeguata eliminazione della contaminazione, tuttavia risultava spesso subottimale. [1] Per questo è fondamentale affiancare o sostituire la pulizia manuale con altre strategie. Si è quindi iniziato a studiare vantaggi e svantaggi delle tecniche di sterilizzazione e disinfezione tradizionalmente utilizzate al fine di implementarle e migliorarle e contemporaneamente a cercare di sviluppare nuove metodologie.

Per sterilizzazione si intende il processo utilizzato per l'eradicazione di tutti i microrganismi vitali e dei loro elementi germinativi come spore, endospore e uova attraverso procedure chimiche e/o fisiche, per disinfezione un trattamento che riduce sensibilmente la carica microbica fino a livelli di sicurezza per l'uomo e che ha un'azione puntuale e circoscritta.

### 2.2 Principali microrganismi patogeni

Sviluppare e dimostrare l'efficacia di nuove tecnologie di disinfezione per la protezione contro virus e batteri patogeni rilevanti per la salute umana riveste oggi grande interesse. [2]

In particolare, tra i virus annoveriamo i virus respiratori, quali coronavirus e influenza, per la loro rapidità di trasmissione e capacità di resistere a lungo sulle superfici. I virus respiratori si trasmettono infatti attraverso droplet e aerosol o per contatto con superfici infette e costituiscono un problema di sanità pubblica rilevante per la loro ubiquità, elevata contagiosità e per la tendenza a mutare rapidamente eludendo il sistema immunitario.

Tra i principali batteri patogeni rientrano invece batteri Gram-negativi quali *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* seguiti da batteri Gram-positivi quali *Staphylococcus aureus* e *Clostridium difficile*.

*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e in generale i batteri multiresistenti (MDR) sono i principali responsabili delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria (ICA). Sono infatti batteri in grado di rimanere a lungo su diverse superfici quali letti, comodini, pulsanti di chiamata, maniglie delle porte e

rubinetti da cui possono facilmente trasmettersi ad altri pazienti che entrano in contatto con tali superfici contaminate. Il Ministero della Salute stima che in Italia si verifichi un'infezione correlata all'assistenza sanitaria nel 4-7% dei ricoveri e che circa il 50% di queste siano prevedibili attuando un'attenta attività di prevenzione, misure che prevedono in particolare un maggior investimento e potenziamento delle tecniche di sanificazione.

Un altro batterio patogeno rilevante è *Legionella pneumophila*, batterio Gram-negativo, responsabile dell'85% dei casi di legionellosi. Si trova principalmente nelle torri di raffreddamento degli impianti di aria condizionata e in biofilm negli impianti idrici.

Nei confronti della legionellosi, è importante attuare una corretta sanificazione negli impianti di condizionamento in quanto il batterio può essere inalato con aerosol dall'aria condizionata come, pure, risulta necessario il trattamento delle acque dove il batterio può sopravvivere come biofilm o come parassita nelle amebe e trasmettersi all'uomo attraverso l'inalazione di acque contaminate. [3]

Tale batterio è rilevante anche negli ormai sempre più diffusi distributori di acqua che possono risultare terreno fertile per la sua proliferazione e divenire, quindi, siti di infezione. Sarebbe quindi opportuno dotarli di sistemi, quale, ad esempio, l'irradiazione UV-C, che possano contribuire ad eliminare i batteri presenti.

## **2.3 Approcci di sanificazione**

La sanificazione è definita dalla normativa vigente come il complesso di procedimenti e operazioni di pulizia e/o disinfezione necessarie a rendere salubri ambienti e superfici tramite l'eliminazione di agenti patogeni e contaminanti che non riescono ad essere rimossi attraverso la pulizia e la deterzione ordinaria per ripristinare la sicurezza microbiologica.

Intervenire in ambito ospedaliero attraverso un potenziamento del processo di sanificazione permetterebbe di ridurre la trasmissione di agenti patogeni che sono significativamente legati ad un aumento della mortalità e morbilità. Numerose sono le metodologie di sanificazione che possono essere utilizzate; differiscono a seconda della tecnologia utilizzata, del principio attivo, dei prodotti e della modalità di erogazione. Ogni metodo presenta delle caratteristiche che lo rendono più o meno adatto a determinati contesti. I più utilizzati sono: il calore, gli agenti chimici, il plasma freddo e le radiazioni.

### **2.3.1 Calore**

Il calore è riconosciuto come metodo di sterilizzazione e disinfezione da secoli, la sua attività microbica è stata dimostrata per la prima volta nel 1832. Esistono due tipi di calore: il calore umido e il calore secco.

Il calore umido include l'uso diretto del vapore, l'immersione in acqua calda e il riscaldamento. Sotto forma di vapore è ampiamente usato in tecniche di sterilizzazione/disinfezione, è non tossico, economico, sporicida e rapidamente microbica. La sterilizzazione a vapore si basa sull'uso di un'autoclave e ha una maggiore capacità di trasferire il calore su una superficie rispetto al calore secco.

Il calore secco è un processo di sterilizzazione che contiene acqua sotto forma di gas o liquidi, può essere utilizzato nel processo di disinfezione ma a temperature inferiori a 140°C. È ampiamente utilizzato per quei materiali che potrebbero

essere danneggiati dal vapore o che sono densi per il vapore come polveri, strumenti affilati e prodotti petroliferi. Il forno è la fonte più semplice per la sterilizzazione a calore secco. [4]

### 2.3.2 Agenti chimici

Vari tipi di agenti chimici liquidi come alcoli, composti del cloro, aldeidi, formalina, glutaraldeide, fenoli, perossido di idrogeno, composti di ammonio quaternario sono utilizzati per le tecniche di sterilizzazione/disinfezione.

L'azione antimicrobica degli alcoli consiste nella denaturazione delle proteine e il loro utilizzo per la pulizia delle superfici può essere considerato la scelta migliore perché si asciugano immediatamente dopo il trattamento. In particolare, l'alcol etilico è l'alcol più efficace per uccidere i microrganismi utilizzando una concentrazione superiore al 60%.

Il perossido di idrogeno è noto per i suoi usi versatili come disinfettante, sterilizzante, fumigante e antisettico. Viene impiegato nella sanificazione sotto forma di vapore o nebulizzato. Ossida la porzione esterna del batterio o del virus danneggiando la superficie esterna e il suo utilizzo è ecologico vista la sua completa degradazione in ossigeno e acqua.

L'efficacia della sterilizzazione dei disinfettanti contro i microrganismi e la concentrazione da utilizzare dipendono da una serie di fattori, alcuni sono relativi all'ambiente chimico e fisico, altri a proprietà intrinseche del microrganismo. Ad esempio, le spore sono resistenti ai disinfettanti perché il rivestimento e la corteccia fungono da barriera, i micobatteri hanno una parete cellulare cerosa che ne impedisce l'ingresso e i batteri Gram-negativi possiedono una membrana esterna che funge da barriera all'assorbimento.

L'utilizzo di agenti chimici liquidi presenta una certa pericolosità essendo corrosivi per la pelle e nocivi se ingeriti o inalati; inoltre possono essere dannosi per l'ambiente.

Tra gli agenti chimici riveste oggi grande importanza l'ozono. Il trattamento con l'ozono consiste nella sterilizzazione dell'ambiente attraverso la sua diffusione ma deve essere obbligatoriamente eseguito in ambienti chiusi e in assenza di persone.

L'ozono ( $O_3$ ) è una molecola costituita da tre atomi di ossigeno, la sua struttura chimica lo rende un gas estremamente reattivo ed è dotato di proprietà ossidanti. Il peso, pari a 12 volte quello dell'aria, gli permette di penetrare in profondità senza arrecare danni ai tessuti e alle superfici sui quali viene applicato.

Le molecole di ozono si legano con i microrganismi presenti nell'aria dando origine alla reazione di ossidazione e durante la decomposizione dell'ozono si formano radicali liberi che sono principalmente responsabili della sua attività microbica. Al termine del trattamento l'ozono non rilascia residui in quanto si degrada completamente.

Bisogna ricordare che l'ozono se utilizzato ad alte concentrazioni può essere corrosivo specificamente contro leghe di fusione tra cui zinco e ferro e ha una certa tossicità: in caso di frequente esposizione può provocare irritazioni alle mucose orali, con conseguenti disturbi respiratori fino a nausea e mal di testa. [4]

### 2.3.3 Plasma freddo

Il plasma è uno stato della materia costituito da un gas estremamente reattivo composto da elettroni liberi, ad alta energia, ioni e particelle neutre. Diversi tipi di

gas come azoto, ossigeno, elio, argon, xeno e aria sono utilizzati come fonte di plasma e vari metodi sono applicati per la sua produzione.

Il plasma può essere classificato come plasma a bassa temperatura e ad alta temperatura. Per la pulizia, la decontaminazione e la sterilizzazione le basse temperature sono ampiamente utilizzate.

Il plasma freddo è impiegato per l'inattivazione di microrganismi in quanto elimina i composti organici volatili (composti pericolosi per la salute umana) e le membrane proteiche dei virus. In particolare, riesce a caricare elettricamente le particelle d'aria a temperatura ambiente trasformandole in un gas ionizzato che agisce sui composti organici volatili disaggregando e riducendo la carica virale di eventuali agenti patogeni mediante un processo chimico naturale, senza l'apporto di sostanze disinfettanti o igienizzanti dannose, anche, per l'ambiente. È, inoltre, una tecnologia economica, utilizza, infatti, apparecchi a basso costo che non necessitano di frequente manutenzione e che vengono installati velocemente. Può essere utilizzato in presenza di persone; è stato infatti osservato che, oltre a non essere dannoso per la salute umana, comporta dei benefici in quanto determina un miglioramento delle prestazioni cognitive e aiuta a ridurre gli stati di depressione. [4]

#### 2.3.4 Radiazioni

La radiazione ad alta energia è usata come agente disinfettante ed è considerata penetrante ed efficace. La radiazione si genera da un processo naturale in cui un atomo instabile (isotopo) di un elemento irradia energia in eccesso sotto forma di particelle o onde elettromagnetiche.

La disinfezione viene effettuata con raggi ultravioletti e in particolare con la breve lunghezza d'onda UV o UV-C nella gamma di 200-280 nm poiché si è scoperto che non tutte le lunghezze d'onda sono attive contro i microrganismi. Tali UV-C sono considerati più efficaci per uccidere i microrganismi in quanto o distruggono direttamente l'acido nucleico dei microrganismi o agiscono sulle pirimidine nel DNA interrompendone la struttura a doppia elica. Pertanto, l'irradiazione ultravioletta fa sì che l'acido nucleico microbico perda le proprie proprietà strutturali, fisiche e chimiche, inibisce la produzione di metaboliti per la crescita microbica e previene la replicazione degli acidi nucleici, portando alla morte dei microrganismi. [5]

Questo metodo ha diverse applicazioni, quali la disinfezione di alimenti, di acqua potabile e acque reflue e la sterilizzazione di dispositivi medici, elettrodomestici e superfici.

Oltre alla potenza della luce UV-C, il tempo di esposizione delle superfici influisce sull'esito del trattamento. Infatti, se le superfici vengono esposte a una radiazione non abbastanza intensa o per tempi troppo brevi, la disinfezione potrebbe risultare compromessa e inadeguata.

Inizialmente questa tecnologia veniva sfruttata con l'impiego di lampade a mercurio, strumento ingombrante e con il rischio di contaminazione da mercurio per rottura accidentale della lampada. In seguito, come potenziale alternativa è stata proposta l'irradiazione UV utilizzando diodi a emissione di luce (LED). I LED UV sono più piccoli, più leggeri e meno fragili delle lampade UV a mercurio. Offrono anche il vantaggio di poter essere accesi e spenti istantaneamente, mentre le lampade a mercurio richiedono diverso tempo per riscaldarsi.

Uno dei maggiori vantaggi dell'uso dei LED UV è la loro capacità di emettere radiazioni a lunghezze d'onda specifiche, consentendo idealmente di indirizzare la radiazione nei confronti di diversi componenti del microrganismo. Per esempio: 260 nm è il picco di assorbimento del DNA, circa 280 nm è un picco secondario di assorbimento delle proteine ed è anche efficace per l'acido nucleico. [3]

Questa tecnologia viene oggi molto utilizzata nella disinfezione degli ambienti ospedalieri accanto alla pulizia manuale standard spesso insufficiente nei confronti di patogeni multiresistenti.

È opportuno ricordare, però, che i raggi ultravioletti possono essere utilizzati in sicurezza solo in ambienti chiusi e in assenza di persone poiché non sono percepibili dall'essere umano ma in base alla lunghezza d'onda, all'intensità e alla durata di esposizione determinano gravi danni soprattutto ad occhi e cute. Inoltre, è appurato che la radiazione UV-C sia cancerogena per l'uomo. [4]

### **3. SCOPO TESI**

Alla luce dell'efficacia della radiazione ultravioletta per la disinfezione ma anche dei suoi limiti, quali la capacità di degradare i polimeri e soprattutto l'impossibilità di utilizzo in presenza dell'uomo a causa della fototossicità, crescente è l'interesse nei confronti dello sviluppo di sistemi basati su lunghezze d'onda più lunghe, come la luce visibile, caratterizzate da minore energia di irradiazione e quindi più sicure per l'uomo.

In questo elaborato viene analizzato l'effetto del dispositivo messo a punto da un team di ingegneri dell'Università di Padova che sfrutta proprio lunghezze d'onda comprese tra gli UV e il visibile con l'obiettivo di verificarne la capacità di disinfezione e in particolare l'efficacia battericida nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi.

Lo strumento è stato testato nei confronti di due diversi batteri: *E. coli* e *S. aureus*.

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1 Materiali

#### 4.1.1 Ceppi batterici

-*E. coli* (ATCC 25922): ceppo di *E. coli* depositato presso l'American Type Culture Collection (ATCC), isolato clinico. Trova applicazione nei test di suscettibilità antimicrobica, dei supporti, degli alimenti e su terreni, nel controllo di qualità e in bioinformatica. Per la conservazione richiede una temperatura compresa tra 2°C e 8°C; necessita di un BSL1 (Laboratorio di Biosicurezza Livello 1).

-*S. aureus* (ATCC 29213): ceppo di *S. aureus* depositato presso l'American Type Culture Collection (ATCC), isolato da una ferita. Trova applicazione nei test di sensibilità, nel controllo di qualità, nello sviluppo di farmaci, in bioinformatica, nella ricerca sulle malattie enteriche e infettive. Per la conservazione richiede una temperatura compresa tra 2°C e 8°C; necessita di un BSL2 (Laboratorio di Biosicurezza Livello 2).

#### 4.1.2 Terreni di coltura

-Tryptone Soy Agar (TSA): terreno per colture batteriche.

Composizione: peptone, digerito pancreatico di caseina 15,0 g/L; Soia peptone, digerito pancreatico di semi di soia 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Agar 15,0 g/L.

Sterilizzato in autoclave a 121°C, 2 bar per 20'; pH finale 7,2±0,2 a (20±1)°C.

#### 4.1.3 Dispositivo

Dispositivo mobile costituito da 4 cupole (identificate rispettivamente come cupola 1, 2, 10 e 16) ciascuna delle quali rappresenta una sorgente LED con una diversa lunghezza d'onda. Le lunghezze d'onda sono comprese nel range da 259.7 nm a 285.5 nm. In particolare, la cupola 1 ha  $\lambda = 270.3$  nm, la cupola 2  $\lambda = 285.5$  nm, la cupola 10  $\lambda = 259.7$  nm e la cupola 16  $\lambda = 277.8$  nm.

#### 4.1.4 Programmi elaborazione dati

Per l'elaborazione dei dati raccolti è stato utilizzato Excel, per la visualizzazione grafica è stato utilizzato Graphpad Prism 9.

## 4.2 Metodi

### 4.2.1 Preparazione della sospensione batterica

Per preparare la sospensione batterica (sia per *E. coli* che per *S. aureus*) è stata prelevata, con l'utilizzo di un puntale, una singola colonia da una coltura pura e stemperata in un volume di 10 ml di TSA, incubata a 37°C al fine di raggiungere un titolo compreso tra  $10^7$  e  $10^9$  CFU/ml poiché, secondo la vigente norma europea relativa alla "disinfezione ambientale mediante metodi automatici", il titolo iniziale della sospensione batterica deve essere compreso tra  $5 \times 10^7$  e  $2 \times 10^9$  CFU/ml. [7]

#### 4.2.2 Determinazione del titolo batterico attraverso diluizioni seriali

Per la determinazione del titolo batterico, sono state preparate le diluizioni seriali da  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  per *E. coli* e da  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$  per *S. aureus* utilizzando 100  $\mu$ l di sospensione batterica e 900  $\mu$ l di soluzione fisiologica (diluizioni 1:10) in piastre da 24 pozzetti. Le ultime quattro diluizioni sono state seminate su piastre Petri contenenti terreno TSA, le piastre sono state in seguito incubate per 12 ore a 37°C. Trascorse le 12 ore sono state contate le colonie presenti in ogni piastra al fine di determinare il titolo della sospensione batterica.

#### 4.2.3 Preparazione dei carriers e fase di esposizione

Come carriers sono state impiegate piastre Petri sterili di diametro 10 cm in quanto le cupole del dispositivo utilizzato hanno una circonferenza tale da coprire in maniera precisa una piastra. Sia i carriers esposti all'azione del dispositivo LED che i carriers di controllo sono stati preparati ponendo 100  $\mu$ l di soluzione batterica al centro della piastra. Sono stati lasciati asciugare prestando attenzione che non si seccassero.

Successivamente, quattro carriers sono stati posizionati ciascuno sotto ad una delle quattro cupole del dispositivo; il carrier di controllo è stato lasciato vicino al dispositivo con il coperchio della piastra Petri chiuso.

Terminata la fase di esposizione si è proceduto con il recupero dei batteri.

#### 4.2.4 Recupero dei batteri e enumerazione delle colonie

Per recuperare i batteri, tutti i carriers (trattati e controllo) sono stati eluiti con 900  $\mu$ l di soluzione fisiologica. Successivamente i carriers sono stati sottoposti a scraping per un minuto e la soluzione raccolta è stata inserita in tubi a vite da 2 ml.

Sono state poi eseguite diluizioni seriali da  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  per *E. coli* e da  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  per *S. aureus* utilizzando piastre da 24 pozzetti. In particolare, 100  $\mu$ l di batteri precedentemente recuperati sono stati diluiti in 900  $\mu$ l di soluzione fisiologica (diluizione 1:10). Le ultime diluizioni sono state seminate in piastre Petri contenenti terreno TSA, le piastre sono state poi incubate overnight a 37°C.

Si è proceduto, infine, con il conteggio delle colonie cresciute in ogni piastra, al fine di determinare il titolo dei carriers esposti e del carrier di controllo.

## 5. RISULTATI

Nel presente lavoro di tesi è stata valutata l'efficacia disinfettante di sorgenti LED caratterizzate da diverse lunghezze d'onda nei confronti di *E. coli* e *S. aureus*. Questi due batteri sono stati selezionati poiché sono frequentemente associati ad infezioni ospedaliere e per ottenere un confronto relativo all'efficacia battericida del dispositivo nei confronti di batteri Gram-positivi (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativi (*Escherichia coli*) che differiscono nell'organizzazione della parete. I batteri Gram-positivi presentano una parete molto più polare e permeabile a molecole idrofiliche costituita principalmente da uno spesso e rigido strato di peptidoglicano che rappresenta il 40-80% del peso secco della cellula, acidi teicoici e proteine; i batteri Gram-negativi presentano, invece, un sottile strato di peptidoglicano che rappresenta il 10% del peso secco della cellula e non presentano acidi teicoici. [6]

### 5.1 Set up sperimentale



FIG 1: Set sperimentale

L'esperimento è stato interamente eseguito sotto cappa a flusso laminare. Inizialmente è stato determinato il titolo della sospensione batterica, come descritto nel Paragrafo 4.2.2, che è risultato pari a  $6,1 \times 10^8$  CFU/ml per *E. coli* e  $4 \times 10^{10}$  CFU/ml per *S. aureus*.

Successivamente sono stati preparati i carriers come descritto sopra.

Il dispositivo utilizzato è costituito da un corpo centrale a cui vengono collegate le cupole che rappresentano ciascuna una sorgente LED a diversa lunghezza d'onda.

Dopo aver collegato ogni cupola alla corrispondente porta del dispositivo, i quattro carriers sono stati posizionati ciascuno sotto ad una cupola, mentre il carrier di controllo è stato chiuso e mantenuto sotto cappa. I tempi di esposizione sono pari a 5'-10'-20'.

Trascorso il tempo di incubazione si è proceduto con il recupero dei batteri come descritto nel Paragrafo 4.2.4.

## 5.2 Effetto delle sorgenti LED su una sospensione di *E. coli*

Di seguito sono riportati i risultati dell'esposizione di una sospensione titolata di *E. coli* alle diverse lunghezze d'onda e a tempi di esposizione diversi.

		TITOLO (CFU/ml)								
		Prima Prova			Seconda Prova			Terza Prova		
diluizione	tempo di esposizione	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06
5'	Controllo	2,00E+07	3,10E+07	5,60E+07	2,68E+07	6,00E+07	2,00E+07	3,10E+07	5,60E+07	2,68E+07
	Trattato	1,40E+06	5,90E+06	8,00E+06	1,00E+06	9,00E+06	9,00E+06	4,10E+07	3,40E+07	3,00E+07
10'	Controllo	3,15E+07	4,10E+07	1,50E+07	5,60E+06	3,60E+07	2,40E+08	3,15E+08	3,50E+08	2,80E+08
	Trattato	5,50E+06	5,90E+06	9,00E+05	5,90E+06	4,00E+06	1,00E+06	4,00E+07	1,00E+07	1,00E+07
20'	Controllo	2,54E+07	3,70E+07	3,15E+07	5,60E+07	2,00E+07	3,78E+07	9,90E+07	3,70E+07	5,70E+07
	Trattato	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 1: Cupola 1 - LED con lunghezza d'onda 270.3 nm – *E. coli*

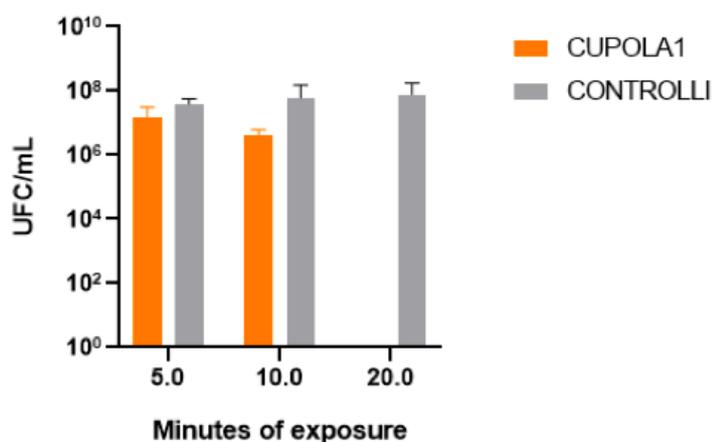


FIG 2: Grafico Cupola 1 - LED con lunghezza d'onda 270.3 nm – *E. coli*

		TITOLO (CFU/ml)								
		Prima Prova			Seconda Prova			Terza Prova		
diluizione tempo di esposizione		1,00.E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00.E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00.E-04	1,00E-05	1,00E-06
	5'	Controllo	2,00E+07	3,10E+07	5,60E+07	2,68E+07	6,00E+07	2,00E+07	3,10E+07	5,60E+07
Trattato		1,02E+07	1,17E+07	9,30E+06	1,00E+07	2,20E+07	1,00E+07	3,00E+07	6,00E+07	6,00E+07
10'	Controllo	3,15E+07	4,10E+07	1,50E+07	5,60E+06	3,60E+07	2,40E+08	3,15E+08	3,50E+08	2,80E+08
	Trattato	3,90E+06	5,50E+06	8,30E+06	9,00E+06	8,00E+06	1,50E+07	6,00E+07	2,00E+07	3,00E+07
20'	Controllo	2,54E+07	3,70E+07	3,15E+07	5,60E+07	2,00E+07	3,78E+07	9,90E+07	3,70E+07	5,70E+07
	Trattato	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 2: Cupola 2 - LED con lunghezza d'onda 285.5 nm – E. coli

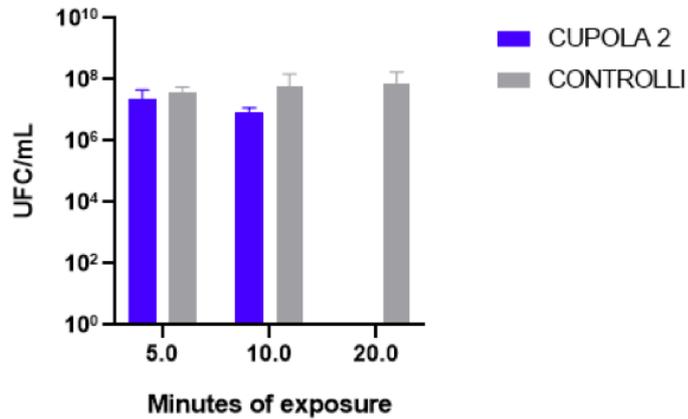


FIG 3: Grafico Cupola 2 - LED con lunghezza d'onda 285.5 nm – E. coli

		TITOLO (CFU/ml)								
		Prima Prova			Seconda Prova			Terza Prova		
diluizione tempo di esposizione		1,00.E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00.E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00.E-04	1,00E-05	1,00E-06
	5'	Controllo	2,00E+07	3,10E+07	5,60E+07	2,68E+07	6,00E+07	2,00E+07	3,10E+07	5,60E+07
Trattato		6,40E+07	7,20E+06	5,40E+06	8,00E+06	1,80E+07	3,00E+06	2,00E+07	6,00E+07	5,00E+07
10'	Controllo	3,15E+07	4,10E+07	1,50E+07	5,60E+06	3,60E+07	2,40E+08	3,15E+08	3,50E+08	2,80E+08
	Trattato	6,00E+05	1,60E+06	2,00E+06	4,00E+06	3,00E+06	2,00E+06	8,00E+07	1,00E+07	0
20'	Controllo	2,54E+07	3,70E+07	3,15E+07	5,60E+07	2,00E+07	3,78E+07	9,90E+07	3,70E+07	5,70E+07
	Trattato	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 3: Cupola 10 - LED con lunghezza d'onda 259.7 nm – E. coli

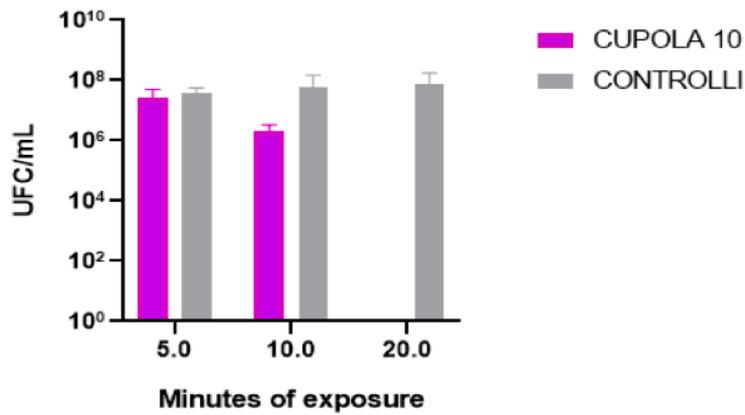


FIG 4: Grafico Cupola 10 - LED con lunghezza d'onda 259.7 nm – E. coli

		TITOLO (CFU/ml)								
		Prima Prova			Seconda Prova			Terza Prova		
diluzione	tempo di esposizione	1,00.E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00.E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00.E-04	1,00E-05	1,00E-06
5'	Controllo	2,00E+07	3,10E+07	5,60E+07	2,68E+07	6,00E+07	2,00E+07	3,10E+07	5,60E+07	2,68E+07
	Trattato	8,00E+06	5,70E+06	1,34E+07	4,00E+06	2,00E+07	2,50E+07	5,00E+07	3,00E+07	3,00E+07
10'	Controllo	3,15E+07	4,10E+07	1,50E+07	5,60E+06	3,60E+07	2,40E+08	3,15E+08	3,50E+08	2,80E+08
	Trattato	2,00E+05	3,30E+06	3,80E+06	1,40E+07	2,10E+07	5,00E+06	9,00E+07	2,00E+07	0
20'	Controllo	2,54E+07	3,70E+07	3,15E+07	5,60E+07	2,00E+07	3,78E+07	9,90E+07	3,70E+07	5,70E+07
	Trattato	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 4: Cupola 16 - LED con lunghezza d'onda 277.8 nm – E. coli

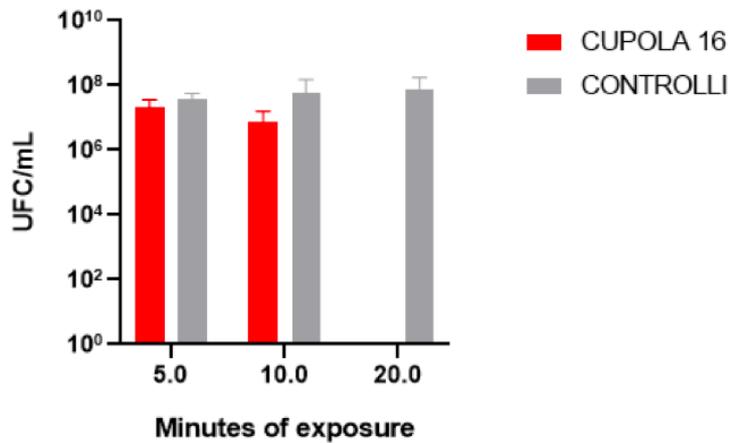


FIG 5: Grafico Cupola 16 - LED con lunghezza d'onda 277.8 nm – E. coli

Dall'analisi dei risultati ottenuti si nota come si verifichi in generale una riduzione del titolo dei carriers trattati con l'aumentare del tempo di esposizione a fronte del controllo che rimane invece costante, nei limiti delle variazioni biologiche sperimentali.

In particolare, per tutte le sorgenti il tempo di esposizione pari a 5' non causa una riduzione significativa del titolo batterico. Aumentando, il tempo di esposizione a 10' si osserva invece una riduzione del titolo dei carriers trattati più significativa fino ad arrivare con il tempo di esposizione di 20' a un'inibizione totale della crescita dei batteri; inibizione che si verifica per tutte le lunghezze d'onda testate. Confrontando tra loro le diverse cupole, quella che risulta avere un'efficacia maggiore è la cupola 10, risultato atteso in quanto è la sorgente LED con la lunghezza d'onda più corta ( $\lambda = 259.7 \text{ nm}$ ), che appartiene al range degli UV-C, la cui efficacia battericida è ampiamente riconosciuta. La cupola 2, il cui LED ha la lunghezza d'onda più lunga tra le lunghezze testate, è quindi la più vicina al visibile, risulta essere la meno efficace per il tempo di esposizione di 10', ma porta, ugualmente alle altre cupole, all'inibizione totale della crescita batterica per il tempo di esposizione di 20'.

### 5.3 Effetto delle sorgenti LED su una sospensione di *S. aureus*

Di seguito sono riportati i risultati dell'esposizione di una sospensione titolata di *S. aureus* alle diverse lunghezze d'onda e a tempi di esposizione diversi.

		TITOLO (CFU/ml)								
		Prima Prova			Seconda Prova			Terza Prova		
tempo di esposizione	diluizione	1,00,E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00,E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00,E-07	1,00E-08	
	5'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10	1,20E+09	1,30E+09
Trattato		4,70E+10	5,40E+10	3,30E+10	9,00E+10	7,00E+10	8,00E+10	1,10E+09	4,00E+09	
10'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10		1,20E+09	1,30E+09	2,30E+09	4,00E+09	
	Trattato	1,00E+09	0	0		1,00E+08	0	1,00E+08	0	
20'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10		7,10E+09	5,40E+09	4,20E+09	6,00E+09	
	Trattato	0	0	0		0	0	0	0	

Tabella 5: Cupola 1 - LED con lunghezza d'onda 270.3 nm – *S. aureus*

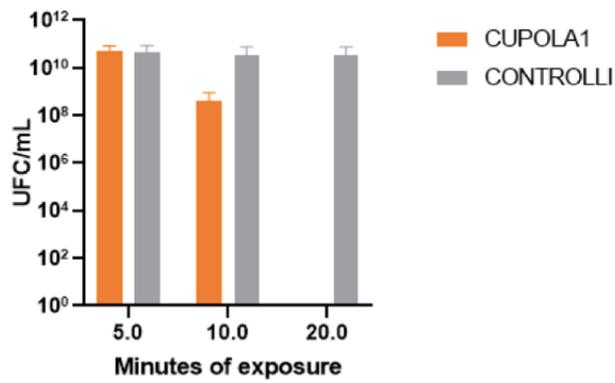


FIG 6: Grafico Cupola 1 - LED con lunghezza d'onda 270.3 nm – S. aureus

		TITOLO (CFU/ml)							
		Prima Prova			Seconda Prova			Terza Prova	
tempo di esposizione	diluizione	1,00,E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00,E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00,E-07	1,00E-08
	5'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10	1,20E+09
Trattato		6,40E+10	5,50E+10	3,90E+10	8,90E+10	5,00E+10	4,00E+10	1,20E+09	6,00E+09
10'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10		1,20E+09	1,30E+09	2,30E+09	4,00E+09
	Trattato	1,00E+09	0	0		4,00E+08	0	6,00E+08	0
20'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10		7,10E+09	5,40E+09	4,20E+09	6,00E+09
	Trattato	0	0	0		0	0	0	0

Tabella 6: Cupola 2 - LED con lunghezza d'onda 285.5 nm – S. aureus

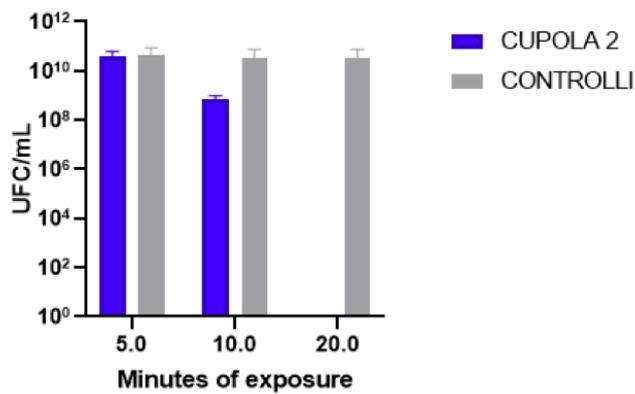


FIG 7: Grafico Cupola 2 - LED con lunghezza d'onda 285.5 nm – S. aureus

		TITOLO (CFU/ml)							
		Prima prova			Seconda Prova			Terza Prova	
diluzione	tempo di esposizione	1,00,E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00,E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00,E-07	1,00E-08
5'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10	1,20E+09	1,30E+09
	Trattato	3,30E+10	2,90E+10	5,20E+10	3,00E+10	3,00E+10	9,00E+10	1,00E+09	3,00E+09
10'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10		1,20E+09	1,30E+09	2,30E+09	4,00E+09
	Trattato	0	0	0		0	0	0	0
20'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10		7,10E+09	5,40E+09	4,20E+09	6,00E+09
	Trattato	0	0	0		0	0	0	0

Tabella 7: Cupola 10 - LED con lunghezza d'onda 259.7 nm – *S. aureus*

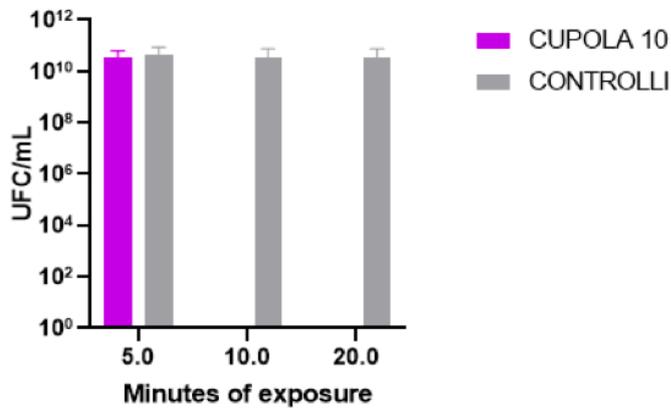


FIG 8: Grafico Cupola 10 - LED con lunghezza d'onda 259.7 nm – *S. aureus*

		TITOLO (CFU/ml)							
		Prima Prova			Seconda Prova			Terza Prova	
diluzione	tempo di esposizione	1,00,E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00,E-06	1,00E-07	1,00E-08	1,00,E-07	1,00E-08
5'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10	1,20E+09	1,30E+09
	Trattato	4,40E+10	5,00E+10	4,70E+10	5,00E+10	4,00E+10	6,00E+10	1,30E+09	1,00E+09
10'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10		1,20E+09	1,30E+09	2,30E+09	4,00E+09
	Trattato	0	0	0		0	0	0	0
20'	Controllo	9,00E+10	7,40E+10	6,70E+10		7,10E+09	5,40E+09	4,20E+09	6,00E+09
	Trattato	0	0	0		0	0	0	0

Tabella 8: Cupola 16 - LED con lunghezza d'onda 277.8 nm – *S. aureus*

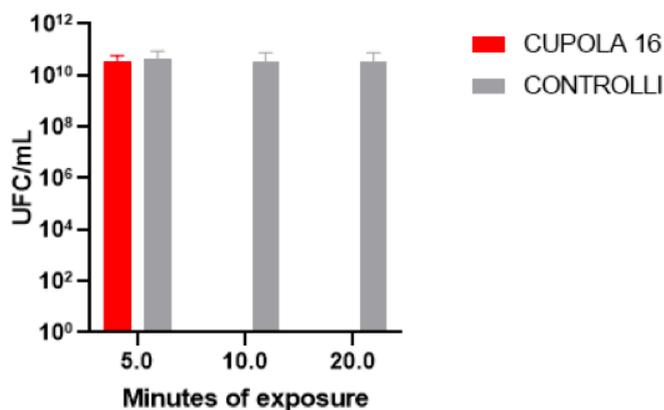


FIG 9: Grafico Cupola 16 - LED con lunghezza d'onda 277.8 nm – *S. aureus*

Dall'analisi dei risultati ottenuti si nota come si verifichi in generale una riduzione del titolo dei carriers trattati con l'aumentare del tempo di esposizione a fronte del controllo che rimane invece costante, nei limiti delle variazioni biologiche sperimentali.

In dettaglio, per tutte le sorgenti il tempo di esposizione pari a 5' non causa una riduzione significativa del titolo batterico. Per il tempo di esposizione pari a 10' l'andamento è variabile a seconda della cupola analizzata. In particolare, si osserva per la cupola 1 una riduzione media del titolo dei carriers trattati di 2 logaritmi rispetto al controllo, per la cupola 2 una lieve riduzione di un logaritmo rispetto al controllo, per le cupole 10 e 16 si osserva invece una completa inibizione della crescita batterica.

Per il tempo di esposizione 20' si osserva per tutte le cupole l'inibizione totale della crescita batterica.

Confrontando tra loro le diverse cupole, risultano più efficaci la cupola 10 e la 16; queste determinano, infatti, la completa inibizione della crescita batterica già con una esposizione di 10'. Si tratta di un risultato atteso per la cupola 10 in quanto è la sorgente LED con la lunghezza d'onda più corta ( $\lambda=259.7$  nm), lunghezza d'onda che appartiene al range degli UV-C la cui efficacia battericida è ampiamente riconosciuta.

Al contrario delle aspettative, invece, è risultata più efficace la cupola 16 ( $\lambda = 277.8$  nm) rispetto alla cupola 1 ( $\lambda= 270.3$  nm) nonostante la lunghezza d'onda leggermente più lunga. Si tratta, tuttavia, di una differenza di lunghezza d'onda molto lieve così come lieve è la differenza di efficienza: per la cupola 16 nessuna colonia è cresciuta negli esperimenti eseguiti, per la cupola 1 in cinque degli otto esperimenti eseguiti non sono cresciute colonie in tre è cresciuta una sola colonia.

La cupola 2, il cui LED ha la lunghezza d'onda più lunga tra le lunghezze testate, è quindi la più vicina al visibile, risulta essere la meno efficace per il tempo di esposizione di 10', ma porta, ugualmente alle altre cupole, all'inibizione totale della crescita batterica per il tempo di esposizione di 20'.

## 6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'analisi sperimentale è stata condotta con l'obiettivo di verificare l'efficacia disinfettante del dispositivo per differenti lunghezze d'onda e per diversi tempi di esposizione.

Si può concludere che il dispositivo ha un'attività disinfettante per tutte le lunghezze d'onda dei LED testati secondo i criteri imposti dalla norma EN 17272 quando viene applicato con un tempo di esposizione di 20' sia nei confronti di *E. coli* che di *S. aureus*. La norma europea EN 17272 relativa alla "disinfezione ambientale mediante metodi automatici" stabilisce infatti che affinché un dispositivo abbia un'attività disinfettante è necessario dimostrare che il suo utilizzo comporti una riduzione del titolo espresso come unità formanti colonie (CFU) di almeno quattro logaritmi rispetto al controllo. [7]

Per entrambi i batteri testati si è verificata una riduzione del titolo dei carriers trattati rispetto al controllo. In particolare, la riduzione rispetto al controllo è di 7 logaritmi per *E. coli* e di 10 logaritmi per *S. aureus* quando questi vengono esposti per un tempo pari a 20'. L'efficacia disinfettante è dimostrata anche, per le cupole 10 e 16, nei confronti di *S. aureus* con un tempo di esposizione di 10' dove si è riscontrata una riduzione del titolo dei carriers trattati di 10 logaritmi.

L'analisi sperimentale ha anche dimostrato che, oltre alla lunghezza d'onda del LED, un altro parametro fondamentale da tenere in considerazione è il tempo di esposizione. Infatti, il tempo di esposizione pari a 5' non è sufficiente mentre esposizioni più lunghe risultano più efficaci. Infatti, per tutte le lunghezze d'onda e per entrambe le specie si è verificata l'inibizione totale della crescita batterica con il tempo di esposizione pari a 20'.

L'efficacia microbica delle diverse sorgenti LED è risultata maggiore nei confronti di *S. aureus* rispetto a *E. coli*, in linea con quanto riportato in letteratura. [8,9]

Questo diverso comportamento è probabilmente dovuto alla diversa attivazione dei meccanismi di riparo dei danni al DNA, meccanismi che in *E. coli* vengono attivati consentendo la riparazione dei danni prima che la cellula si divida mentre non vengono attivati in *S. aureus*. [8]

In conclusione, lo studio ha dimostrato l'attività disinfettante delle diverse sorgenti LED. Questo risultato può incentivare lo sviluppo di sistemi per la disinfezione basati su lunghezze d'onda più lunghe rispetto ai tradizionali dispositivi che utilizzano radiazioni ultraviolette, al fine di renderli più sicuri e utilizzabili anche in presenza di persone.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Inagaki H, Goto Y, Sugiyama H, Saito A, Okabayashi T, Watanabe K, Fujimoto S. Usefulness of a new DUV-LED device for the control of infection by *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, mycobacteria and spore-forming bacteria. *Front Public Health*. 2022 Dec 5;10:1053729. doi: 10.3389/fpubh.2022.1053729. PMID: 36544797; PMCID: PMC9760979.
- [2] Matsumoto T, Tatsuno I, Yoshida Y, Tomita M, Hasegawa T. Time-dose reciprocity mechanism for the inactivation of *Escherichia coli* explained by a stochastic process with two inactivation effects. *Sci Rep*. 2022 Dec 30;12(1):22588. doi: 10.1038/s41598-022-26783-x. PMID: 36585428; PMCID: PMC9801147.
- [3] Oh Y, Sangsanont J, Woo H, Boczek LA, Linden KG, Ryu H. Inactivation efficacy and mechanisms of wavelength-specific UV sources for various strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Sci Total Environ*. 2024 Jan 10;907:167781. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.167781. Epub 2023 Oct 14. PMID: 37844643.
- [4] Bharti B, Li H, Ren Z, Zhu R, Zhu Z. Recent advances in sterilization and disinfection technology: A review. *Chemosphere*. 2022 Dec;308(Pt 3):136404. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136404. Epub 2022 Sep 19. PMID: 36165840.
- [5] Kim HJ, Yoon HW, Lee MA, Kim YH, Lee CJ. Impact of UV-C Irradiation on Bacterial Disinfection in a Drinking Water Purification System. *J Microbiol Biotechnol*. 2023 Jan 28;33(1):106-113. doi: 10.4014/jmb.2211.11027. Epub 2022 Nov 30. PMID: 36474325; PMCID: PMC9895992.
- [6] G. Antonelli, M. Clementi, G. Pozzi, GM Rosolini *Principi di Microbiologia Medica*, Editore: CEA.
- [7] UNI EN 12272 “Disinfettanti chimici ed antisettici- Metodo per la disinfezione ambientale mediante processi automatici- Determinazione dell’attività battericida, micobattericida, sporicida, fungicida e levuricida, virucida e fagocitocida”. Aprile 2020.
- [8] Sandri A, Tessari A, Giannetti D, Cetti A, Lleo MM, Boschi F. UV-A Radiation: Safe Human Exposure and Antibacterial Activity. *Int J Mol Sci*. 2023 May 5; 24(9):8331. doi: 10.3390/ijms24098331. PMID: 37176038; PMCID: PMC10179708.
- [9] Lu Zhiwei, Li Xiaoling, Wei Jinxiu, Cai Miao, Yang, Daoguo, Zhang Guoqi “Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by using a UVC-LED module with a multi-wavelength setting” February 02 2022 doi:10.1109/ICEPT56209.2022.9872629.