



**Politecnico
di Torino**

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di laurea magistrale

**Sanificazione dell'acqua
tramite radiazioni UVC e blu**

Relatori

Prof. Gianni COPPA

Prof. Guido PERRONE

Candidata

Ritjola KULLURI

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Abstract

Access to safe drinking water is something we take for granted, but it is not the case for a significant portion of the world's population. Indeed, according to the World Health Organization (WHO) about two billion people still use drinking water contaminated with fecal matter, which is the cause of more than 500,000 cases of death each year. Water is one of the most important vehicles responsible for indirect transmission of bacterial and viral pathogens, leading to serious diseases such as cholera, dysentery and typhoid. Therefore, to reduce the likelihood of contracting such diseases and improve the health of the world's population, adequate investments in water and sanitation interventions are needed, thereby also reducing the costs of treating diseases. One of the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs) aim to ensure universal access to safe and affordable drinking water for all by 2030, thereby decreasing pollution and release of hazardous chemicals and increasing recycling and safe reuse of water globally. There are multiple methods used for water purification; among the most common are mechanical, thermal, and chemical techniques. In recent years there has been an increasing interest in using light radiation – particularly in the shortest ultraviolet (UVC) and blue regions – for disinfection. This trend has been also stimulated by investments related to measures to combat the COVID. These short wavelength radiations allow the DNA or RNA of bacteria and viruses to be broken through direct or indirect mechanisms. The main advantages of such approach are the possibility of integration into existing systems to ensure an optimal antimicrobial effect, the low costs and the absence of production of hazardous waste material. The main objective of this thesis work was therefore to design a prototype of a disinfection system based on light radiation that can be integrated into common faucets. *Escherichia coli* was considered as a typical contaminant. To achieve the goal, as a first step, experiments were carried out to find the minimum dose sufficient for the abatement of these bacteria through the use of UVC or blue LEDs. From the experimental work it emerged that it is possible to obtain a bacterial reduction greater than 90% by using UVC LEDs with doses of about 10 mJ/cm^2 . The blue LEDs, on the other hand, have a lower efficacy which makes them unsuitable for this kind of applications where the exposure time to perform the disinfection is very limited. In the second phase of the work, a mathematical-physical model based on Lambertian source theory was

created in order to study the radiation doses obtained from different configurations of UVC LEDs. The model was then used for the design of a sanitizing tube prototype capable of ensuring a bacterial count reduction of the water flowing through it of at least 99%.

Keywords: *UVC, blue, Water sanitation, Water sanitization, Water disinfection, Antimicrobial, Lambertian source, Dose, Escherichia Coli, Enterobacteriaceae, UVC LED, blue LED, UVC radiation, blue radiation, sanitization, bacterial abatement*

Sommario

L'accesso all'acqua potabile sicura è un qualcosa che diamo per scontato, ma non è così per una significativa porzione della popolazione mondiale. Infatti, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ancora oggi circa due miliardi di persone usano acqua potabile contaminata da materiale fecale, che è la causa di oltre 500 mila casi di morte ogni anno. L'acqua è uno dei più importanti veicoli responsabili della trasmissione indiretta di agenti patogeni batterici e virali, portando a gravi malattie come colera, dissenteria e tifo. Per ridurre la probabilità di contrarre tali epidemie e migliorare la salute della popolazione mondiale sono quindi necessari adeguati investimenti per interventi idrici e igienico-sanitari, riducendo così anche i costi per il trattamento delle patologie. Uno degli Obiettivi di Sviluppo Sostenibile (SDG) posti dalle Nazioni Unite mira a garantire l'accesso universale all'acqua potabile sicura ed economica per tutti entro il 2030, diminuendo quindi l'inquinamento e il rilascio di sostanze chimiche pericolose e aumentando il riciclaggio e il riutilizzo sicuro dell'acqua a livello globale. Esistono molteplici metodi utilizzati per la potabilizzazione dell'acqua; tra le più diffuse vi sono tecniche meccaniche, termiche e chimiche. In questi anni, spinta anche dagli investimenti legati alle misure per contrastare la pandemia di COVID, sta crescendo sempre più l'interesse per la disinfezione utilizzando la radiazione luminosa, in particolare nella regione ultravioletti più corti (UVC) e del blu. Queste radiazioni, infatti, tramite dei meccanismi diretti o indiretti, consentono la rottura del DNA o dell'RNA dei batteri e dei virus, impedendone la proliferazione. I principali vantaggi di questo approccio sono la possibilità di integrazione in sistemi già esistenti garantendo un effetto antimicrobico ottimale, i bassi costi e l'assenza di produzione di materiale di scarto pericoloso. L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è stato quindi quello di progettare un prototipo di un sistema di sanificazione basato sulla radiazione luminosa da poter integrare nei comuni rubinetti. Come contaminante tipo si è considerata l'*Escherichia coli*. Per raggiungere l'obiettivo prefissato, come prima cosa sono stati svolti degli esperimenti volti a trovare una dose minima sufficiente per l'abbattimento di tali batteri sia tramite l'utilizzo di LED UVC che di LED blu. Dal lavoro sperimentale è emerso che è possibile ottenere un abbattimento batterico maggiore del 90% utilizzando dei LED UVC con dosi di circa 10 mJ/cm^2 . I LED blu, invece, hanno una efficacia minore che li rende poco adatti per questo genere di applicazioni in cui il tempo di esposizione per eseguire la disinfezione è molto limitato. Nella seconda fase del lavoro, è stato creato un modello matematico-fisico basato sulla teoria delle sorgenti Lambertiane allo scopo di studiare le dosi di radiazione ottenute da diverse configurazioni di LED UVC. Il modello è stato quindi utilizzato per il progetto di un prototipo di tubo sanificante capace di garantire un abbattimento della carica batterica dell'acqua che lo attraversa di almeno il 99%.

Keywords: *UVC, blu, Sanificazione acqua, Disinfezione acqua, Antimicrobico, Sorgente Lambertiana, Dose, Escherichia Coli, Enterobacteriaceae, LED UVC, LED blu, radiazione UVC, radiazione blu, sanificazione, abbattimento batterico*

Indice

| | |
|--|----|
| Elenco delle tabelle | v |
| Elenco delle figure | vi |
| 1 Introduzione | 3 |
| 1.1 Acqua | 7 |
| 2 Radiazioni UVC e blu | 11 |
| 2.1 La natura della luce | 11 |
| 2.2 Introduzione alle radiazioni | 12 |
| 2.3 UVC | 15 |
| 2.4 Luce blu | 18 |
| 2.4.1 Disinfezione con la luce blu e stato dell'arte | 19 |
| 3 Determinazione della dose per l'abbattimento dell'<i>Escherichia coli</i> | 21 |
| 3.1 Materiale e Metodi | 21 |
| 3.1.1 Materiale | 21 |
| 3.1.2 Metodi | 24 |
| 3.2 Risultati sperimentali | 26 |
| 3.2.1 Sanificazione tramite LED UVC | 26 |
| 3.2.2 Sanificazione tramite LED blu | 43 |
| 4 Progettazione di un prototipo di sistema di sanificazione | 55 |
| 4.1 Radiometria | 55 |
| 4.1.1 Definizioni: | 56 |
| 4.1.2 Sorgente lambertiana | 56 |
| 4.2 Simulazione delle configurazioni | 58 |
| 4.2.1 Due sorgenti in due piani paralleli | 58 |
| 4.2.2 Quattro sorgenti intorno a una superficie circolare | 61 |
| 4.2.3 Modello di quattro sorgenti su una superficie cilindrica | 66 |
| 4.2.4 Modello di tre sorgenti su una superficie cilindrica | 70 |
| 4.3 Progettazione del prototipo | 74 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.1 Test del prototipo sanificante | 76 |
| 5 Conclusioni | 81 |
| Bibliografia | 83 |

Elenco delle tabelle

| | | |
|-----|---|----|
| 3.1 | Numero di colonie batteriche nelle contact slide di controllo e nei test A,B,C. | 33 |
| 3.2 | Numero di colonie batteriche nelle contact slide di controllo e nei test A,B,C. | 36 |
| 3.3 | Numero di colonie batteriche nelle contact slide di controllo e nei test A,B,C del latte diluito. | 41 |
| 4.1 | Massimi valori di E raggiunti per le diverse distanze h | 64 |
| 4.2 | Minimi valori di E raggiunti per le diverse distanze h | 65 |

Elenco delle figure

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Sixth Sustainable Development Goal. | 7 |
| 2.1 | Spettro elettromagnetico [1]. | 14 |
| 2.2 | Spettro UV. | 15 |
| 2.3 | Effetto battericida della radiazione UV [2]. | 16 |
| 2.4 | Danneggiamento del DNA dovuto alle radiazioni UVC [3]. | 17 |
| 2.5 | Dose UV per <i>E. coli</i> [4] | 18 |
| 2.6 | Meccanismo di azione della luce blu sui batteri [5]. | 19 |
| 3.1 | (a) LED UVC, (b) LED blu,(c) Incubatore, (d) Contact slide. | 22 |
| 3.2 | Circuito con LED integrati. | 22 |
| 3.3 | Set-up sperimentale. | 24 |
| 3.4 | Contact slide di controllo. | 27 |
| 3.5 | Contact slide test1 (a), test2 (b), test3 (c). | 28 |
| 3.6 | Abbattimento batterico. | 29 |
| 3.7 | Esempio di diluizione seriale [6]. | 30 |
| 3.8 | Contact slide dei controlli a diversi livelli di diluizione. | 31 |
| 3.9 | (a) Contact slide testA, (b) Contact slide testB,(c) Contact slide testC. | 32 |
| 3.10 | Abbattimento batterico. | 33 |
| 3.11 | Contact slide di controllo. | 35 |
| 3.12 | Contact slide testA(a), testB(b), testC(c) | 35 |
| 3.13 | Abbattimento batterico. | 36 |
| 3.14 | Contact slide di controllo del latte diluito. | 39 |
| 3.15 | Contact slide testA(a), testB(b), testC(c). | 40 |
| 3.16 | Abbattimento batterico. | 41 |
| 3.17 | Controllo del latte non diluito e risultati ottenuti con diversi tempi di esposizione con il LED blu. | 42 |
| 3.18 | Contact slide di controllo. | 44 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.19 | Contact slide di tutti i campioni irradiati con un LED blu.(a) Campione irradiato per 10 s. (b) Campione irradiato per 30 s. (c) Campione irradiato per 60 s. (d) Contact slide del campione irradiato per 90 s. (e) Campione irradiato per 120 s. (f) Campione irradiato per 150 s. | 45 |
| 3.20 | Abbattimento batterico. | 46 |
| 3.21 | Contact slide di tutti i campioni irradiati con un LED blu.(a) Campione di controllo a sinistra, campione irradiato per 3 min al centro e campione irradiato per 6 min a destra. (b) Campione irradiato per 12 min a sinistra, campione irradiato per 20 min al centro e campione irradiato per 30 min a destra. | 47 |
| 3.22 | Abbattimento batterico. | 48 |
| 3.23 | Contact slide di controllo. | 49 |
| 3.24 | Contact slide di tutti i campioni irradiati con un LED blu.(a)Campioni irradiati per 6 min a sinistra e campioni irradiati per 10 min a destra. (b) Campioni irradiati per 15 min a sinistra e campioni irradiati per 20 min a destra. | 50 |
| 3.25 | Abbattimento batterico. | 51 |
| 3.26 | Tutte le contact slide dell'esperimento 4. | 52 |
| 3.27 | Abbattimento batterico. | 53 |
| 4.1 | Sorgente circolare lambertiana che irradia un piano. w è il diametro della sorgente circolare, h è la distanza tra la sorgente e il piano contenente il punto X , r è la distanza tra il punto X e la normale tra la sorgente e il piano irradiato. | 57 |
| 4.2 | Modello con due sorgenti. | 58 |
| 4.3 | (a) Surface plot dell'irradianza del modello di due sorgenti poste su due piani distanti 10 cm, (b) Surface plot dell'irradianza del modello di due sorgenti poste su due piani distanti 5 cm, (c)Surface plot dell'irradianza del modello di due sorgenti poste su due piani distanti 2 cm. | 60 |
| 4.4 | Modello con quattro sorgenti attorno ad un cilindro. | 61 |
| 4.5 | Modello con quattro sorgenti attorno ad un piano circolare. | 62 |
| 4.6 | Irradianze massime dei quattro LED a diverse distanze LED-superficie in funzione del raggio. | 63 |
| 4.7 | Irradianze minime dei quattro LED a diverse distanze LED-superficie in funzione del raggio. | 64 |
| 4.8 | (a) Vista frontale del modello cilindrico con 4 LED, (b) Vista laterale del modello cilindrico con 4 LED. | 67 |
| 4.9 | Irradianza del modello di quattro sorgenti su una superficie cilindrica. | 68 |
| 4.10 | Dosi massime raggiungibili tramite il del modello cilindrico con 4 LED. | 68 |
| 4.11 | Dosi minime raggiungibili tramite il del modello cilindrico con 4 LED. | 69 |

| | |
|---|----|
| 4.12 (a) Vista frontale del modello cilindrico con 3 LED, (b) Vista laterale del modello cilindrico con 3 LED. | 71 |
| 4.13 Irradianza del modello di tre sorgenti su una superficie cilindrica. | 72 |
| 4.14 Dosi massime raggiungibili tramite il del modello cilindrico con 3 LED. | 73 |
| 4.15 Dosi minime raggiungibili tramite il del modello cilindrico con 3 LED. | 73 |
| 4.16 Vista frontale del prototipo di tubo sanificante. | 74 |
| 4.17 Prototipo di tubo sanificante. | 75 |
| 4.18 Prototipo di tubo sanificante. | 75 |
| 4.19 (a) Vista frontale del tubo con i LED accesi. (b) Vista del circuito. | 76 |
| 4.20 Sulla sinistra, contact slide di riferimento dell'acqua contaminata. Sulla destra, contact slide del campione sanificato con il prototipo. | 78 |
| 4.21 Abbattimento batterico ottenuto con il prototipo | 79 |

Obiettivo e quadro generale della tesi

In questo progetto viene analizzata l'efficacia della sanificazione dell'acqua attraverso l'applicazione di radiazioni ultraviolette a corta lunghezza d'onda (UVC) e delle radiazioni blu, ponendosi come obiettivo principale la progettazione di un prototipo di sistema di sanificazione basato sulla radiazione luminosa da poter integrare nel sistema di distribuzione idrico, fino ai rubinetti degli utenti finali.

Per raggiungere tale obiettivo, l'attività è stata organizzata nelle seguenti fasi:

1. Ricerca di una dose di radiazione UVC e di radiazione blu sufficiente per l'abbattimento (almeno del 99%) dell'*Escherichia coli*, batterio preso come riferimento per dimostrare le capacità di disinfezione.
2. Creazione di un modello fisico-matematico attraverso il quale studiare le dosi di radiazione ottenute da diverse configurazioni di LED UVC.
3. Progettazione di un prototipo di dispositivo per la sanificazione e sua successiva validazione.

La tesi è composta dai seguenti capitoli:

- **Capitolo 1:** descrive gli obiettivi e la struttura della tesi.
- **Capitolo 2:** fornisce le motivazioni che hanno spinto alla realizzazione di questo progetto.
- **Capitolo 3:** introduce i concetti della radiazione, soffermandosi maggiormente sulle proprietà delle radiazioni UVC e delle radiazioni blu, sul loro meccanismo di disinfezione e sul loro stato dell'arte.
- **Capitolo 4:** include tutto il lavoro sperimentale in cui si è ricercata la dose minima necessaria per l'abbattimento dell'*E. coli* tramite radiazione UVC e blu.

- **Capitolo 5:** descrive la progettazione del sistema di sanificazione mediante il modello fisico-matematico volto a studiare le dosi di radiazione ottenute da diverse configurazioni di LED UVC. Inoltre, viene presentata la realizzazione del suddetto prototipo e la sua validazione preliminare.
- **Capitolo 6:** Conclusioni del lavoro di tesi.

Capitolo 1

Introduzione

Da oltre due anni a questa parte, si è rapidamente diffusa una malattia infettiva respiratoria nota come malattia da Coronavirus 2019 (Covid-19), causata dalla diffusione del virus SARS-CoV-2. Il Covid-19 ha avuto gravissime ripercussioni sulla salute mondiale, coinvolgendo milioni di persone e causando più di 6 milioni di morti. Situazioni drammatiche come queste fanno capire che è assolutamente necessario adottare delle strategie di prevenzione alle infezioni causate da tutti i microrganismi patogeni, comunemente noti anche come microbi o germi. I microbi si trovano ovunque nella natura, non riusciamo a vederli a occhio nudo, ma ne siamo quotidianamente a contatto. Tali microrganismi si suddividono in batteri, virus, protozoi e funghi, in seguito brevemente descritti [7]:

- I batteri sono organismi unicellulari procarioti, hanno una dimensione di circa 0.3 - 1.5 μm ; sono visibili solo al microscopio ottico grazie alla colorazione di Gram, che ci consente di distinguerli in Gram positivi e Gram negativi in base alla struttura della loro parete cellulare esterna. I batteri Gram negativi hanno una membrana organizzata e compatta che impedisce la diffusione di molecole indesiderate all'interno della cellula. Nei batteri Gram positivi, invece, la struttura esterna è più porosa, facilitando l'ingresso di varie sostanze. I batteri hanno una parete cellulare, una membrana citoplasmatica e un citoplasma nel quale è immersa una singola molecola di acido desossiribonucleico (DNA) a struttura raggomitolata. Inoltre, alcuni di loro possono presentare delle strutture facoltative quali capsule, ciglia, fimbrie. Tutti sono in grado di riprodursi in autonomia attraverso la replica del DNA, scindendosi in un tempo abbastanza breve in due cellule indipendenti. Esistono anche delle specie sporigene che possono formare spore altamente resistenti, in grado di sopravvivere in ambienti sfavorevoli con bassa umidità e carenza di cibo, rappresentando così un considerevole problema per la sterilizzazione degli ambienti.

- I virus sono organismi visibili solo al microscopio elettronico avendo delle dimensioni di qualche nanometro, quindi molto ridotte rispetto a quelle batteriche. Sono noti come parassiti endocellulari obbligati, in quanto per vivere e per essere in grado di replicarsi necessitano di apparati metabolici ed enzimatici di cellule ospiti di altri organismi animali o batterici. I virus contengono un genoma (che può essere ad acido ribonucleico (RNA) o DNA), un capside e un pericapside.
- I protozoi sono organismi unicellulari eucarioti, si distinguono in specie in grado di muoversi autonomamente come i Flagellati e i Rizopodi e specie immobili come i Sporozoi. Si nutrono di sostanze solide, alghe e batteri e possono essere presenti nel suolo, nelle acque, ma anche negli animali. Alcune specie possono formare delle cisti particolarmente resistenti ad ambienti sfavorevoli, in grado di svolgere una sorta di conservazione del protozoo che, una volta tornato in condizioni favorevoli, può continuare a replicarsi ed esercitare le sue azioni patogene.
- I funghi (o miceti) sono organismi unicellulari o pluricellulari eucarioti che hanno dimensioni almeno 20 volte superiori a quelle batteriche. Il regno dei funghi comprende circa 250.000 specie conosciute, di cui almeno 250 sono patogene per l'uomo. Sono costituiti da una parete cellulare e oltre agli organelli, ai ribosomi e reticoli, contengono un nucleo ben definito che racchiude il DNA e le proteine. Si possono riprodurre sia in modo asessuata che sessuato attraverso la produzione di spore.

Gli agenti patogeni sono responsabili del proliferare di malattie infettive nell'organismo ospite, dello sviluppo di epidemie e in casi estremi possono portare anche a decessi; per questo motivo, prevenire i loro effetti dannosi assume un ruolo di centrale importanza, specialmente per i soggetti con un quadro clinico compromesso.

Possiamo distinguere tre diversi metodi di trasmissione dei microbi:

1. Trasmissione diretta: avviene tramite un contatto diretto tra un soggetto sano e uno malato.
2. Trasmissione semi-diretta: un soggetto sano inala goccioline di Flugge contenenti agenti infettanti rilasciati da un soggetto malato.
3. Trasmissione indiretta: può avvenire per mezzo di un veicolo (aria, acqua, suolo...) che mantiene la vitalità degli organismi infettanti trasferendoli agli individui sani, oppure per mezzo di un vettore (organismi viventi) che a seconda dei casi può trasportare passivamente il materiale contaminato oppure può ospitare il patogeno consentendogli talvolta anche la riproduzione.

Per ridurre i rischi biologici dovuti alla trasmissione di patogeni, la sanificazione degli ambienti è di primaria importanza. Con sanificazione si intendono dei processi volti a ridurre la carica microbica entro degli standard igienici ottimali. Le fasi principali per una corretta sanificazione sono la pulizia, che consiste nell'eliminazione dello sporco visibile a occhio nudo tramite lavaggio con prodotti detergenti, e la successiva disinfezione, che mira alla riduzione degli agenti patogeni presenti in un determinato sito. Qualora l'eliminazione di qualsiasi forma microbica (comprese le spore) sia totale, si parla di sterilizzazione. La norma UNI EN 556 stabilisce un livello di sicurezza di sterilità (Sterility Assurance Level, SAL), cioè di probabilità di sopravvivenza di un microrganismo al processo di sterilizzazione, minore di 10^{-6} [8].

Possiamo distinguere le tecniche di disinfezione in meccaniche e chimiche. Le tecniche meccaniche più note sono la filtrazione, che consente la sola rimozione di organismi con dimensioni superiori a $0.2\ \mu\text{m}$, la pastorizzazione e l'utilizzo di microonde, che sfruttano l'innalzamento di temperatura per l'uccisione dei microbi, ma non sono efficaci nella rimozione delle spore. Le molteplici tecniche chimiche invece, intervengono direttamente sulla struttura cellulare dei microrganismi, ad esempio, denaturandone le proteine o distruggendone la membrana cellulare. Le tecniche chimiche più diffuse sono l'impiego di alcol, alogeni, perossidi di idrogeno e composti tensioattivi.

Per quanto riguarda i metodi di sterilizzazione, sono maggiormente utilizzati i mezzi fisici che comprendono la filtrazione, il calore, e le radiazioni. I metodi impiegati vengono scelti in base all'efficienza di sterilizzazione dipendente dalla natura del materiale da sanificare [9] [8].

Metodi di sterilizzazione:

- Filtrazione: possono essere impiegati tre diverse tipologie di filtri:
 1. A spessore: per la filtrazione delle particelle più grosse.
 2. Membrane filtranti: per i microrganismi compresi tra $0.1\ \mu\text{m}$ e $10\ \mu\text{m}$.
 3. Nuclepore: costituito da pori di qualsiasi diametro necessario, consentendo anche la filtrazione dei virus.
- Calore: l'utilizzo del calore è il metodo che dà i migliori risultati, pertanto il più utilizzato. Esso infatti è in grado di eliminare anche le endospore, che sono gli organismi più resistenti. La morte cellulare è direttamente proporzionale all'innalzamento della temperatura e al tempo di esposizione. Il calore impiegato può essere:
 1. Secco: comprende le pratiche di incenerimento, per il quale si portano i materiali a una temperatura maggiore di $500\ ^\circ\text{C}$, o di bollitura in cui i materiali da sterilizzare vengono mantenuti in acqua ad una temperatura di $100\ ^\circ\text{C}$.

2. Umido (o Vapore): viene sfruttato l'innalzamento della temperatura ottenuto tramite uno specifico strumento noto come autoclave. Il calore umido fornisce prestazioni migliori rispetto all'utilizzo del calore secco, essendo più rapido ed efficace.
- Radiazioni:
 1. Ionizzanti: (es. raggi γ) agiscono trasferendo la propria energia all'interno della cellula colpita, alterandone il DNA. Sono molto usate in ambito industriale in quanto permette di trattare grandi quantità di materiale. Inoltre, trovano impiego anche in campo medico per la sterilizzazione dei tessuti biologici e dei dispositivi medici.
 2. Non ionizzanti: i più utilizzati sono i raggi ultravioletti, sfruttati specialmente ad una lunghezza d'onda di 265 nm per il quale abbiamo il massimo assorbimento da parte del DNA. I campi di applicazione dei raggi UV sono limitati alla sterilizzazione delle superfici piane, non avendo una capacità penetrante come quella dei raggi γ . Per certi impieghi, ad esempio per la disinfezione delle acque di scarico, è possibile combinare l'azione dei raggi UV con altre sostanze chimiche come l'ipoclorito di sodio. Inoltre, in ambito alimentare e farmaceutico, trovano impiego anche le microonde, che nel giro di qualche minuto sono in grado di alterare le capacità funzionali e vitali delle cellule dei microorganismi, grazie all'innalzamento della temperatura, portandoli alla morte [8,9].

Generalmente, l'efficacia germicida viene misurata attraverso la riduzione logaritmica dei germi; il numero di "log" è uguale al numero di 9 utilizzato per esprimere il coefficiente di abbattimento [10]:

- Abbattimento 1 Log = inattivazione 90%
- Abbattimento 2 Log = inattivazione 99%
- Abbattimento 3 Log = inattivazione 99,9%
- Abbattimento 4 Log = inattivazione 99,99%
- Abbattimento 5 Log = inattivazione 99,999%
- Abbattimento 6 Log = inattivazione 99,9999%
- Abbattimento 7 Log = inattivazione 99,99999%
- Abbattimento 8 Log = inattivazione 99,999999%

1.1 Acqua

L'acqua è un elemento essenziale per la vita: costituisce circa il 70% del corpo umano e ne servono in media 2 L al giorno per consentire all'organismo di funzionare correttamente. Spesso, la possibilità di avere accesso all'acqua potabile viene data per scontata, ma per una significativa porzione della popolazione mondiale questo non è possibile. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, ancora oggi circa due miliardi di persone usano acqua potabile contaminata da materiale fecale, che è la causa di oltre 500 mila casi di morte ogni anno.

L'acqua è uno dei più importanti veicoli responsabili della trasmissione indiretta di microrganismi patogeni batterici e virali, causa di gravi malattie; i germi infatti, hanno la capacità di attaccarsi ai colloidali e ai solidi presenti nell'acqua, diffondendosi in modo molto rapido. Il colera, la febbre tifoide e l'epatite A, sono le malattie più comuni che si possono contrarre dal consumo diretto di acqua contaminata dalle feci animali che non ha subito un trattamento di potabilizzazione adeguato. Ogni anno ci sono milioni di morti a causa di malattie diarroiche, e quasi la totalità di questi casi è attribuibile all'ambiente e alla scarsa igiene [7]. Per ridurre la probabilità di contrarre tali epidemie e migliorare la salute della popolazione mondiale sono quindi necessari adeguati investimenti per interventi idrici e igienico-sanitari, riducendo così anche in modo rilevante i costi per il trattamento delle patologie.

Tra i 17 degli Obiettivi di Sviluppo Sostenibile (SDG) posti dalle Nazioni Unite nel 2015, il sesto obiettivo (Fig. 1.1) che riguarda “Acqua pulita e servizi igienico-sanitari” mira a garantire l'accesso universale all'acqua potabile sicura ed a prezzi accessibili per tutti, entro il 2030, diminuendo quindi l'inquinamento e il rilascio di sostanze chimiche pericolose, incoraggiando l'igiene e aumentando il riciclaggio e il riutilizzo sicuro dell'acqua a livello globale [11].



Figura 1.1: Sixth Sustainable Development Goal.

A prescindere dalla loro origine, tutte le acque destinate al consumo umano, sia nel settore industriale che nelle imprese alimentari, sono regolamentate dal Decreto Legislativo nr 31 del 2001, che adotta la Direttiva Europea 98/83/CE. La normativa prescrive dei requisiti (parametri microbiologici, chimici e indicatori) che l'acqua deve rispettare per essere considerata potabile, non deve quindi contenere parassiti

o altre sostanze in concentrazioni per le quali si possono avere delle ripercussioni sulla salute umana [12]. Tra i parametri microbiologici vi è la presenza di *E. coli*, ospite del tratto intestinale di tutti gli animali e per questo, rappresenta un indicatore di contaminazione fecale, che deve essere assente in 100 mL di acqua. In quelli chimici si considerano composti industriali tossici (arsenico, piombo, ...) e residui derivanti dai trattamenti di potabilizzazione (antiparassitari). Infine, gli indicatori forniscono informazioni sulla purezza dell'acqua (odore, colore, sapore, ...). La direttiva prevede inoltre dei controlli periodici sia delle acque superficiali che di quelle sotterranee, degli impianti di confezionamento dell'acqua, delle acque nelle imprese alimentari, degli impianti di adduzione e altri.

Per poter impiegare l'acqua in sicurezza, bisogna quindi garantire determinate caratteristiche fisiche, chimiche e organolettiche raggiungibili attraverso un processo di potabilizzazione tramite il quale vengono rimossi elementi inquinanti, minerali, virus e batteri. Esistono diversi trattamenti, i più comuni sono quelli fisici e chimici, ma a seconda della tipologia di acqua e del suo impiego, potrebbero essere necessari anche affinamento e disinfezione. Il processo di potabilizzazione segue generalmente i seguenti passi:

1. Decantazione: eliminazione della torbidità dell'acqua attraverso la sedimentazione delle particelle più grandi.
2. Flocculazione: rimozione delle particelle più leggere attraverso l'aggiunta di agenti flocculanti.
3. Flottazione: rimozione della schiuma di flocculazione formatosi nel passaggio precedente.
4. Filtrazione: consente la rimozione del sedimento depositato in fase di flocculazione.
5. Ozonizzazione: ossidazione delle molecole organiche portando ad un abbattimento batteriologico e virale. Questo passaggio ha dei costi molto elevati oltre ad essere inefficace alla distruzione delle uova di parassiti. Inoltre, l'ozono può dare vita a composti secondari come quelli carbonilici alifatici potenzialmente tossici.
6. Clorazione: tramite l'aggiunta del Cloro all'acqua, si forma il cloro attivo libero fortemente ossidante, garantendo un effetto battericida. La clorazione però, può portare a un cattivo odore e sapore dell'acqua, e come per l'ozonizzazione, si possono formare prodotti secondari che possono essere pericolosi per l'uomo.

In questi anni, sta crescendo sempre più l'interesse per la disinfezione dell'acqua tramite radiazioni luminose, in particolare nella regione degli ultravioletti a

lunghezza d'onda più corta (UVC) e del blu. Come verrà spiegato successivamente, queste radiazioni consentono la rottura del DNA o del RNA dei batteri e dei virus, impedendone così la proliferazione. L'efficacia sanificante delle radiazioni UV è funzione dello spessore dello strato di acqua da sterilizzare, dalla sua velocità di scorrimento, dal suo stato di torbidità, e dalla quantità di radiazione totale per unità di volume considerato. Questo tipo di approccio offre dei grandi vantaggi, quali la possibilità di integrazione in sistemi già esistenti garantendo un effetto antimicrobico ottimale, una riduzione dei costi per la potabilizzazione e l'assenza di produzione di materiale di scarto pericoloso.

A causa di tutte queste motivazioni, è stato deciso di incentrare il lavoro di questo progetto sulla progettazione di un prototipo di sistema di disinfezione dell'acqua basato sulla radiazione luminosa da poter integrare nei comuni rubinetti delle abitazioni o delle strutture sanitarie o industriali, garantendo un sistema di distribuzione dell'acqua sicuro, che fornisca un'adeguata sanificazione in conformità alle esigenze sanitarie per migliorare la qualità della vita. Come contaminante tipo per l'acqua adoperata nel corso dello studio, si è considerata l' *Escherichia coli*, un batterio facilmente reperibile, che abita nell'intestino animale e che può essere responsabile di infezioni del tratto urinario e intestinale, portando in alcuni rari casi anche alla morte.

Al fine di raggiungere l'obiettivo prefissato, il lavoro è stato suddiviso in due fasi; nella prima fase, quella sperimentale, sono stati svolti una serie di esperimenti al laboratorio volti a trovare una dose minima sufficiente, in relazione alle potenze ottiche dei LED e ai tempi di esposizione, per l'abbattimento dell'*E. coli* sia tramite l'utilizzo di luce UVC che di luce blu. Una volta raccolti i dati, sono stati valutati i risultati sperimentali che, come vedremo in seguito, hanno mostrato che i LED blu hanno un'efficacia di disinfezione molto limitata per questo genere di applicazioni in cui il tempo di esposizione del campione deve essere al massimo di qualche secondo. Nella seconda fase del lavoro, è stato creato un modello matematico-fisico basato sulla teoria delle sorgenti Lambertiane, che ha consentito di studiare i valori di dosi di radiazione totali ottenibili in diverse configurazioni di LED UVC. È stato così possibile valutare quale fosse il sistema meglio performante, che è stato quindi utilizzato per il progetto di un prototipo sanificante capace di garantire un abbattimento della carica batterica dell'acqua.

Capitolo 2

Radiazioni UVC e blu

In questo capitolo sono introdotti i concetti base della radiazione, le proprietà, il meccanismo di disinfezione e stato dell'arte delle radiazioni UVC e blu.

2.1 La natura della luce

Nel corso dei secoli, la luce è stata oggetto di studio da tanti filosofi e scienziati; già nell'antica Grecia si formulavano ipotesi filosofiche sulla natura della luce. Intorno al 500 a.C., il noto matematico e filosofo Pitagora, aveva ipotizzato che la luce fosse un insieme di raggi che partono dagli occhi e raggiungono gli oggetti osservati; un paio di secoli successivi, il filosofo Epicuro, affermò che la luce veniva generata da una sorgente e riflessa dagli oggetti negli occhi. Dopo tanti secoli, nel Seicento, furono fatte delle utili scoperte per lo studio della natura della luce; in particolare, diversi matematici, come W. Snell e F. Grimaldi, arrivano a formulare la legge della rifrazione (nota anche come Legge di Snell) e a scoprire il fenomeno della diffrazione, riuscendo a dare così una spiegazione coerente ai fenomeni di riflessione, rifrazione e diffrazione. Alla fine del Seicento, Newton formulò l'ipotesi che la luce fosse composta da diversi colori, separabili attraverso un prisma di vetro. Egli riuscì così a concepire la prima teoria corpuscolare della luce, secondo la quale la luce era costituita da tanti minuscoli corpuscoli, di diverse dimensioni, ciascuna rappresentativa di un colore, che hanno un moto rettilineo ad elevatissime velocità. Quindi, il moto di tale flusso di particelle era facilmente spiegabile tramite le leggi della meccanica classica ben note fino a quei tempi. Qualche anno dopo, è stata formulata la prima teoria ondulatoria della luce dal fisico C. Huygens, secondo la quale, la luce è un'onda composta da piccole particelle elastiche che si propagano in un mezzo, noto come etere, seguendo appunto un moto armonico. I primi anni del 1800 T. Young riuscì a dimostrare i fenomeni di diffrazione e interferenza tramite la teoria ondulatoria, scartando così quella corpuscolare di Newton. Nello stesso secolo, circa 70 anni dopo, il fisico J. Maxwell pubblica un noto articolo "A

Dinamical Theory of the Electromagnetical Field” in cui la luce viene descritta come un’onda elettromagnetica e non elastica, spiegando le relazioni che legano il campo magnetico ed elettrico. L’onda viene descritta come trasversale, ovvero la direzione di propagazione è perpendicolare alla direzione di oscillazione. Nel 1905, Einstein, sfruttando l’ipotesi avanzata da M. Planck, secondo la quale la materia e le radiazioni interagiscono mediante quanti di energia, avanzò l’ipotesi che l’energia trasportata dalla radiazione elettromagnetica fosse un flusso discreto di quanti o fotoni, proporzionale alla frequenza della radiazione [13]. L’elettrodinamica quantistica (QED), che è definita il gioiello della fisica, è la teoria più recente ed accurata a disposizione per la descrizione di tutti i fenomeni che coinvolgono campi elettromagnetici e particelle cariche, come elettroni e protoni. La QED, infatti, concilia nella stessa teoria la meccanica quantistica e l’elettromagnetismo, riuscendo a spiegare i fenomeni lasciati senza descrizione dall’elettromagnetismo classico. Nel quadro della QED tutti i fenomeni che comprendono campi elettromagnetici e particelle cariche sono descritti mediante la composizione di quattro eventi fondamentali: la propagazione nello spaziotempo di particelle cariche, la propagazione nello spaziotempo di fotoni, l’assorbimento e l’emissione di un fotone da parte delle particelle cariche. Questi eventi sono descritti in termini probabilistici ed infatti le previsioni della QED riguardano solo la probabilità che determinati eventi accadano, abbandonando il determinismo proprio dell’elettromagnetismo classico [14].

2.2 Introduzione alle radiazioni

Il termine radiazione indica il trasporto di energia elettromagnetica per mezzo di fotoni, i quali sono pacchetti discreti di energia e mediano le interazioni elettromagnetiche. I fotoni sono privi di massa e non necessitano di un mezzo per propagarsi. La caratteristica principale che contraddistingue le radiazioni elettromagnetiche è la frequenza, cioè il numero di oscillazioni effettuati dall’onda nell’unità di tempo, misurata in hertz [Hz]. La frequenza è inversamente proporzionale alla lunghezza d’onda, che è un’altra importante caratteristica delle onde. Lo spettro elettromagnetico è l’insieme di tutte le frequenze che le onde elettromagnetiche sono in grado di assumere. L’energia associata alla radiazione elettromagnetica è definita nel seguente modo:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1)$$

dove E è l’energia del fotone [J], ν è frequenza [Hz], λ è la lunghezza d’onda [m], h è la costante di Planck (6.62×10^{-34} J s) e c è la velocità della luce nel vuoto (3×10^8 m/s).

Dalla Eq. 2.1 è osservabile che l’energia trasportata risulta maggiore per alte frequenze e piccole lunghezze d’onda. Quando una radiazione interagisce con la materia, ne trasferisce parte o tutta la propria energia, producendo effetti diversi a

seconda della sua frequenza. Le radiazioni vengono quindi suddivise in :

- Radiazioni ionizzanti (IR): comprendono fotoni e particelle subatomiche ad alte energie (ordine degli elettronvolt) e frequenze (es. raggi x e raggi γ), capaci di ionizzare, ovvero di modificare la struttura, le molecole e gli atomi della materia con la quale interagiscono, producendo ioni. Qualora la materia esposta alle radiazioni si trattasse di tessuti biologici, le cellule interessate potrebbero essere danneggiate, portando gravi conseguenze cliniche al soggetto esposto [15]. Gli effetti conseguenti a questo tipo di radiazioni possono essere distinti in “deterministici” o “stocastici”; i primi vengono quantificati con la *dose assorbita* (misurata in Gray [Gy]) e si manifestano per esposizioni molto elevate (ad esempio, in seguito ad un disastro nucleare come quello di Chernobyl), per le quali i severi danni a livello biologico sono direttamente proporzionali alla dose e si manifestano tramite gravi lesioni anatomiche, di organi e dei tessuti. Gli effetti stocastici invece, colpiscono in modo casuale i soggetti esposti (effetti somatici) o i loro ereditari (effetti genetici), generalmente a dosi basse che possono comunque indurre degli effetti biologici nocivi; essi vengono quantificati attraverso la *dose efficace* (misurata in Sievert [Sv]) [16, 17].
- Radiazioni non ionizzanti (NIR): onde elettromagnetiche a bassa energia, non sono in grado di produrre ionizzazione, ma possono indurre effetti termici, meccanici e biologici alla materia esposta. Gli effetti sull’organismo umano possono essere distinti in effetti a breve e a lungo termine.

Nella figura di seguito viene riportata la classica rappresentazione dello spettro elettromagnetico (Fig. 2.1); è possibile vedere che la zona nel visibile è quella che approssimativamente separa le due tipologie di radiazioni. L’interazione tra la luce e gli organismi viventi viene studiato nella fotobiologia.

Un fascio di radiazioni che attraversano lo spazio viene descritto attraverso i termini di *Energia radiante* [J] e *Flusso radiante (Potenza radiante)* [W]. La sorgente di radiazione invece, viene descritta attraverso la sua *Intensità radiante* [W sr^{-1}] e la *Radianza* [$\text{W}/(\text{sr m}^2)$]. In questo lavoro di tesi, verrà spesso utilizzato il termine *Irradianza* [$\text{W}/\text{m}^2\text{cm}^2$], che si riferisce alla materia colpita dalla radiazione. Inoltre, di notevole importanza per questo studio è la dose, ovvero l’integrale temporale dell’irradianza, nota anche come *dose di esposizione* [mJ/cm^2]. Tutte queste grandezze, verranno meglio descritte nel Capitolo 4.

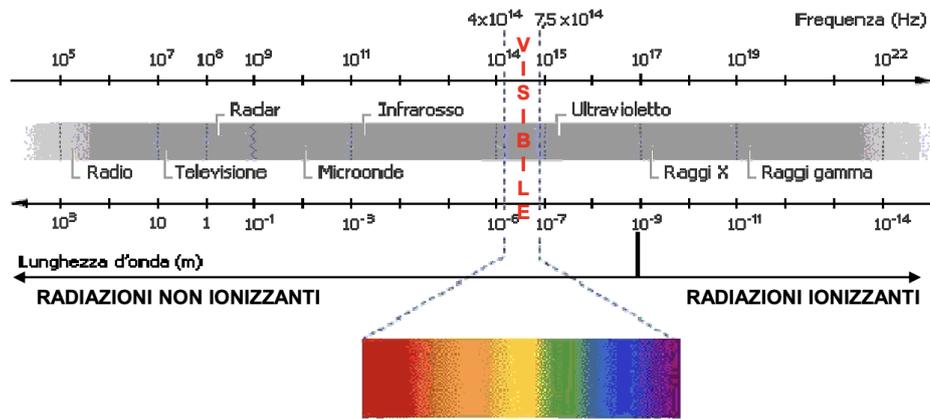


Figura 2.1: Spettro elettromagnetico [1].

2.3 UVC

Come già spiegato nel Capitolo 1, la sicurezza dell'acqua è un problema molto rilevante a livello globale perché tramite essa si possono diffondere gravi malattie che sono tra le principali cause di morte umana. I metodi chimici utilizzati presentano diverse criticità come la resistenza batterica ai disinfettanti, l'alterazione dell'odore e del sapore dell'acqua e la produzione di sottoprodotti talvolta tossici o cancerogeni per l'uomo. Per ovviare questa serie di problemi, si stanno svolgendo una serie di studi sull'effetto germicida delle radiazioni UV, in particolare delle radiazioni UVC. In questa sezione verrà quindi introdotta la radiazione UVC, i metodi più innovativi per la sua produzione e il suo meccanismo di funzionamento antibatterico.

Introduzione alla radiazione UVC

La radiazione ultravioletta (UV) copre la regione dello spettro elettromagnetico di lunghezze d'onda comprese tra 100 e 400 nm. L'UV prodotto dal sole costituisce

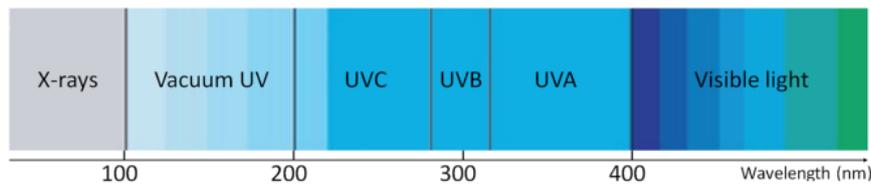


Figura 2.2: Spettro UV.

solo una piccola percentuale dello spettro solare, ma trova molto impiego negli studi della fotobiologia. Generalmente per gli studi si utilizzano le radiazioni UV prodotte artificialmente attraverso il passaggio di corrente elettrica in un gas come il mercurio vaporizzato.

Gli effetti biologici causati dalle radiazioni UV, cambiano enormemente al variare della lunghezza d'onda e per tale motivo, nel Secondo Congresso Internazionale sulla Luce, è stato deciso di suddividerli in tre categorie principali (fig. 2.2):

- UVA 315 - 400 nm.
- UVB 280 - 315 nm.
- UVC 100 - 280 nm.

Questa suddivisione può variare a seconda delle discipline di interesse [18]. Tra questi intervalli di lunghezze d'onda, l'UVC ha la migliore capacità di inattivare i microrganismi perché la lunghezza d'onda di 250 - 270 nm è fortemente assorbita dagli acidi nucleici delle cellule microbiche e, pertanto, è l'intervallo di lunghezze d'onda più letale (fig. 2.3).

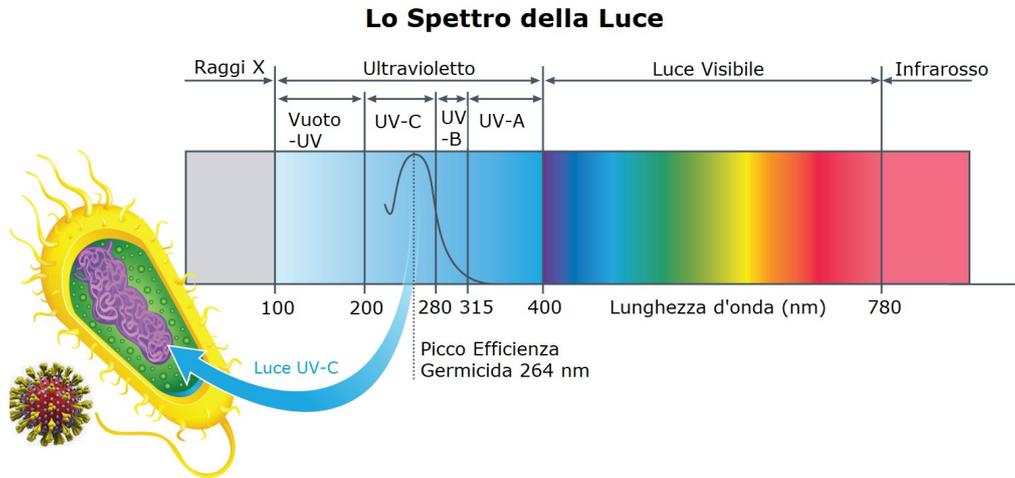


Figura 2.3: Effetto battericida della radiazione UV [2].

Tecnologie per la generazione di radiazioni ultraviolette a breve lunghezza d'onda

Come accennato in precedenza, le radiazioni UVC, oltre che essere prodotte naturalmente dal sole, possono essere anche generate artificialmente; una delle tecnologie attualmente utilizzate consiste in lampade a vapori di mercurio a bassa o a media pressione, caratterizzate da lunghezze d'onda fisse. Le lampade a mercurio hanno una serie di svantaggi che ne limitano l'utilizzo, in particolare, necessitano di frequenti sostituzioni in quanto hanno una vita media di circa 4000 - 10.000 h e sono difficilmente riciclabili in quanto costituite da mercurio, una sostanza fortemente tossica e nociva per l'ambiente, sono ingombranti, hanno una bassa efficienza energetica, un lungo tempo di riscaldamento e non sono in grado di accendersi/spegnersi ad alta frequenza [19, 20]. Per questa serie di motivi, si sta sempre più utilizzando una tecnologia emergente di diodi ad emissione di luce ultravioletta (LED UV) che hanno delle prestazioni nettamente superiori rispetto alle altre. Il LED è un dispositivo semiconduttore a giunzione p-n che emette luce in un determinato spettro, funziona con basse energie, non richiede tempi di riscaldamento e possono essere accesi o spenti con una frequenza regolabile molto alta; inoltre, i LED, oltre ad avere un tempo di vita molto lungo (fino a 100.000 h), non rilasciano materiali tossici né producono delle sostanze di scarto inquinanti; pertanto, sono sicuri a livello ambientale e per l'uomo [20]. In questo progetto verrà valutata quindi l'efficacia di inattivazione dei LED UVC nei confronti dei patogeni presenti nell'acqua, andando a studiare la fluenza, ovvero la dose, necessaria per il loro abbattimento. Un gran numero di batteri sono sensibili all'esposizione ultravioletta, ma l'entità dei danni che si possono procurare non dipende soltanto dalla dose di radiazione fornita, che

è relazionata al dispositivo di generazione della radiazione, ma anche dalla specie batterica da eliminare.

Disinfezione mediante UVC e stato dell'arte

Sono stati condotti numerosi studi sull'azione germicida ultravioletta a corto raggio (UVC) e sono stati identificati diversi fattori che possono influenzare l'efficacia del trattamento come la struttura e lo spessore della cellula, lo stato del microrganismo e la sua capacità di attivare meccanismi di riparazione. Gli studi condotti fino ad oggi hanno coinvolto diverse specie microbiche, includendo virus, batteri Gram positivi e Gram negativi e lieviti. Il meccanismo sanificante degli UVC avviene tramite la rottura dei legami dell'acido desossiribonucleico o dell'acido ribonucleico dei microrganismi, il che spesso porta alla formazione di dimeri tra i residui pirimidinici degli acidi nucleici [21] (fig.2.4).

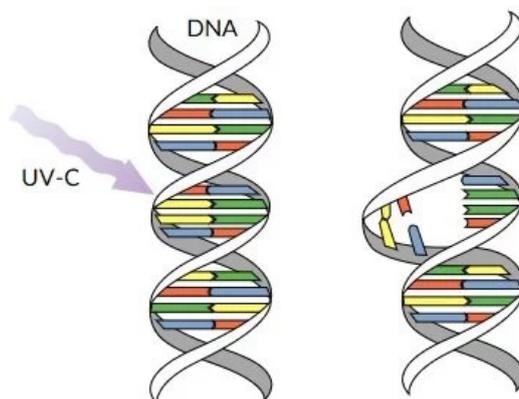


Figura 2.4: Danneggiamento del DNA dovuto alle radiazioni UVC [3].

La conseguenza di questa modifica è che la produzione di dimeri di ciclobutano pirimidina (CPD) provoca la deformazione della molecola di DNA, il che potrebbe causare errori nella replicazione cellulare e portare successivamente alla morte delle cellule.

Per delle sovraesposizione di breve durata di radiazione UVC si possono però avere dei danni nell'uomo sia a livello cutaneo con la comparsa di eritemi, che a livello oculare, con la comparsa di gravi fotocheratiti, per questo è necessario adottare le giuste precauzioni durante l'utilizzo, la progettazione o l'installazione di tali radiazioni [22]. Pertanto, gruppi nazionali ed internazionali, come l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) e l'International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP), hanno stabilito dei limiti di esposizione umana (EL) per i raggi ultravioletti pari a 6 mJ/cm^2 in un arco di tempo di 8 h/giorno. Sono stati condotti molti studi per provare l'efficacia di disinfezione

dei LED UVC, nei quali sono stati ottenuti risultati sperimentali buoni per l'inattivazione di un grande numero di batteri e funghi quali *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), *Enterococcus faecalis* resistente alla vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* [23–25]. In un altro studio è stata dimostrata la capacità della radiazione UVC di disinfettare dei cateteri contenenti biofilm batterici come *Staphylococcus coagulase-negative*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *Coryneforms* [26]. Uno studio ha confrontato l'abbattimento batterico raggiunto con la stessa dose di 0.6 mJ/cm^2 su batteri Gram positivi (*L. monocytogenes*, *S. aureus*), batteri Gram negativi (*E. coli*, *Salmonella*) e lieviti (*P. membranaefaciens*, *S. pastorianus*), ottenendo una riduzione di 5log per i Gram positivi, 3-5log per i Gram negativi e 1log per i lieviti [27]. In letteratura, vi sono numerose tabelle riportanti le energie incidenti della radiazione UV a 253 nm necessarie per inibire la formazione di colonie dei microrganismi di 1 log (90%) e 2 log (99%), in particolare, per l'*E. coli* i valori sono rispettivamente di circa 3 e $6.6 \mu\text{Ws/cm}^2$ [28] [4] (fig.2.5).

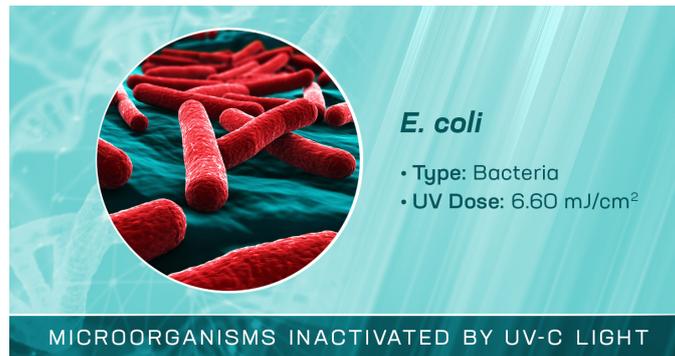


Figura 2.5: Dose UV per *E. coli* [4]

2.4 Luce blu

La luce blu (400 - 470 nm) svolge principalmente un'attività antimicrobica attraverso l'attivazione di fotosensibilizzatori endogeni, che porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno che attaccano i componenti delle cellule batteriche, distruggendoli. Rispetto alla radiazione ultravioletta, la luce blu è significativamente meno dannosa per le cellule dei mammiferi, anche se i dati attuali dimostrano che la luce blu è innocua per la pelle, ma può infliggere danni agli occhi [29]. Inoltre, anche per esposizioni prolungate alla luce blu, non vi sono problemi di fotodegradazione dei materiali come succedrebbe per i stessi tempi di esposizione alla luce UVC. Già alla fine del 1800, Darwin aveva osservato la risposta fototropica delle piante alla luce blu, fenomeno successivamente osservato anche per altre specie come i batteri [30]. Negli ultimi anni sono stati studiati i genomi di diversi batteri e funghi

fotosintetici e chemiotattici che sono in grado di codificare proteine fotorecetttrici. È stato verificato inoltre, che la luce blu influenza le risposte fisiologiche batteriche, infatti è in grado di regolarne la motilità, sopprimere la formazione di biofilm, inattivare i batteri oppure addirittura aumentare la virulenza batterica [31].

2.4.1 Disinfezione con la luce blu e stato dell'arte

La letalità della luce blu per i batteri è stata dimostrata sia in vitro che in vivo e può produrre un effetto battericida ad ampio spettro sia sui batteri Gram negativi che Gram positivi. Sebbene l'intervallo di lunghezze d'onda di 402 - 420 nm sia stato indicato come l'intervallo spettrale antimicrobico più efficace, anche le lunghezze d'onda di 455 - 470 nm sono risultate avere un potenziale antimicrobico per alcune specie batteriche [31].

Ancora oggi però, non è del tutto chiaro il meccanismo dell'effetto antimicrobico della luce blu; l'ipotesi generalmente accolta è che si ha un processo di fotosensibilizzazione mediato dalla luce blu, che dipende dalla presenza di ossigeno, il quale induce citotossicità (apoptosi o necrosi) attraverso stress ossidativi causati da specie di ossigeno singoletto (1O_2). In altre parole, i fotosensibilizzatori, che si trovano al livello energetico più basso, vengono convertiti nel loro stato eccitato di singoletto o di tripletto che, in presenza di ossigeno, possono produrre specie tossiche di ossigeno, come il perossido di idrogeno (H_2O_2), il superossido o i radicali idrossilici oppure possono generare 1O_2 . Successivamente, queste specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono indurre danni a diverse parti delle cellule batteriche, tra cui la membrana cellulare, la parete cellulare e il genoma [5, 32] (fig. 2.6).

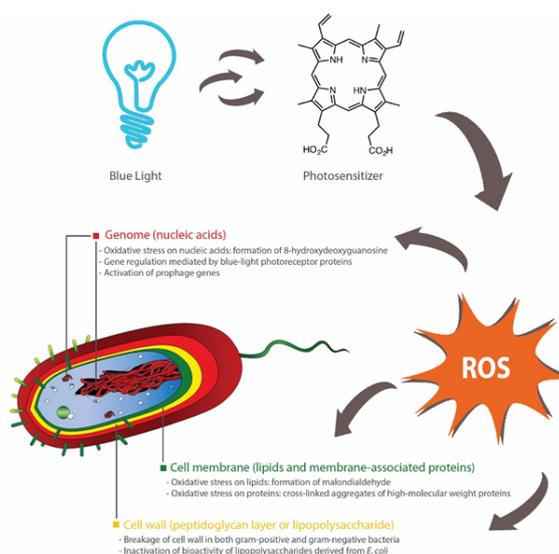


Figura 2.6: Meccanismo di azione della luce blu sui batteri [5].

La sensibilità alla luce blu varia a seconda della tipologia di batteri coinvolti. Alcuni studi hanno infatti dimostrato che i batteri Gram positivi vengono inattivati maggiormente a lunghezze d'onda di 405 nm rispetto ai batteri Gram negativi [33]. In altri studi è stato dimostrato che la luce blu è in grado di inattivare alcuni patogeni orali anaerobi come: *Porphyromonas* e *Fusobacterium* [33,34]. La luce blu è letale per molte varietà di batteri e funghi, anche se la sua efficacia dipende dalla lunghezza d'onda della luce, dai livelli di energia e dalla specie microbica [35]. È stata riportata l'efficacia battericida in vitro della luce blu per *Escherichia coli*, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *P. aeruginosa*, *Streptococcus mutans* [36]. Maclean et al. hanno studiato l'effetto battericida della luce emessa da un array di LED blu a 405 nm su alcune specie batteriche associate a infezioni acquisite in ospedale, tra cui *Enterococcus faecalis*, *E. coli* Gram negativi, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *S. epidermidis* Gram positivi, *S. aureus* e *K. pneumonia*, dimostrando che la maggior parte delle specie Gram positive e Gram negative sono state eliminate con successo ad eccezione della prima specie citata che ha mostrato poca sensibilità all'inattivazione con la luce blu [33]. Anche Murdoch et al. hanno dimostrato l'effetto battericida della luce blu emessa da un array di LED di 405 nm, sui seguenti ceppi batterici: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Listeria* e *Mycobacterium* [37]. *L. monocytogenes*, che è un batterio Gram positivo, è risultato più suscettibile dei batteri enterici Gram negativi alla luce a 405 nm. La fotoinattivazione della luce blu è stata attribuita alla fotoeccitazione delle porfirine endogene intracellulari, che sono presenti in quantità diverse a seconda della specie batterica [38,39]. È quindi necessario utilizzare lunghezze d'onda diverse per fotostimolare diverse specie batteriche. Inoltre, un altro fattore da tenere in considerazione, è il fatto che i batteri producono livelli diversi di porfirine quando coltivati in laboratorio piuttosto a quando sono in condizioni fisiologiche naturali [33]. È possibile concludere che complessivamente sono stati ottenuti risultati positivi circa l'efficacia di disinfezione della luce blu, anche se, sono state osservate discrepanze nei risultati ottenuti in vari studi. Tali differenze potrebbero essere dovute a vari fattori come la diversa somministrazione della luce utilizzata, diversa fluenza, ai diversi generi microbici, ecc. La luce con lunghezza d'onda centrata su 405 nm ha mostrato uno spettro antibatterico significativamente ampio da poter impiegare in vari ambiti come la sterilizzazione di alimenti e lo smaltimento delle acque reflue [33]. Inoltre, si potrebbero approfondire gli studi sulla disinfezione con la luce blu per poterne estendere le applicazioni anche a potenziali sistemi di decontaminazione per l'aria, per le superfici e per gli strumenti medici in ambiente clinico [33,40].

Capitolo 3

Determinazione della dose per l'abbattimento dell'*Escherichia coli*

In questo capitolo verrà presentata la principale fase sperimentale del progetto; dopo una breve descrizione di materiali e metodi, verrà mostrata la serie di esperimenti svolti in laboratorio al fine di trovare una dose sufficiente per l'abbattimento dell'*Escherichia coli* presente in soluzioni acquose, tramite l'utilizzo di LED UVC e LED blu.

3.1 Materiale e Metodi

3.1.1 Materiale

Per svolgere le prove sperimentali è stato utilizzato il seguente materiale:

- LED UVC a 275 nm (LA KH120U8F), potenza ottica: 100 mW (fig. 3.1a)
- LED blu a 405 nm (VLMU5200-405-140), potenza ottica: 2.4 W (fig. 3.1b)
- Contact slide di tipo 1 Liofilchem®: dispositivo pronto all'uso che consente l'isolamento e l'enumerazione delle *Enterobacteriaceae*(fig. 3.1d)
- Un incubatore IVYX Scientific(fig. 3.1c)
- Piastre di Petri di varie dimensioni
- Siringhe sterilizzate
- Acqua, alcol, latte, contaminanti a base di *E. coli*.

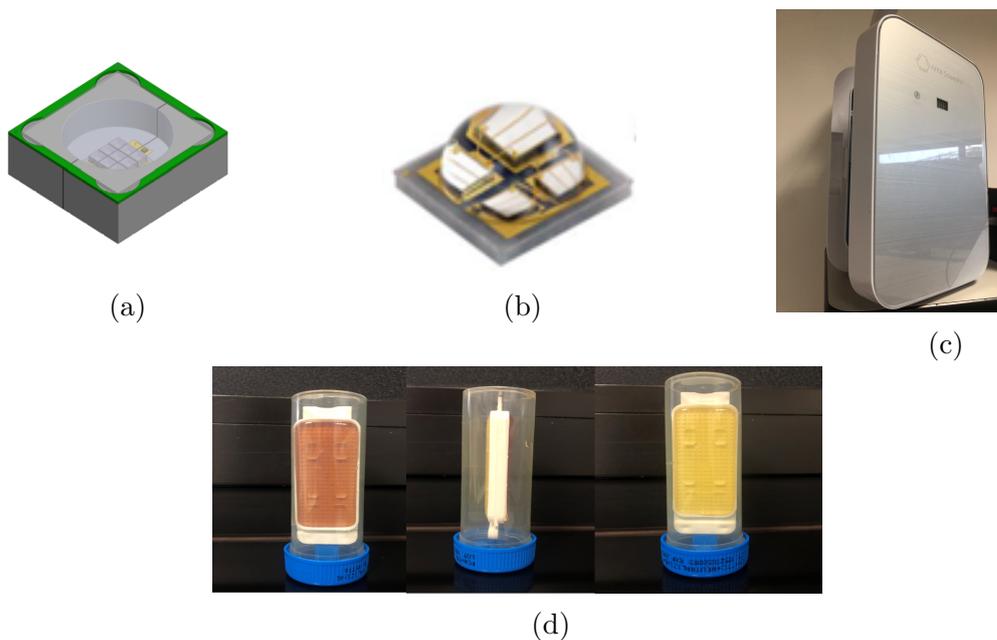


Figura 3.1: (a) LED UVC, (b) LED blu, (c) Incubatore, (d) Contact slide.

I due LED sono stati integrati nello stesso circuito (3.2), che verrà utilizzato per tutte le prove presentate in questa tesi. Entrambi i LED sono alimentati a 24 V, in contemporanea o singolarmente a seconda della necessità.

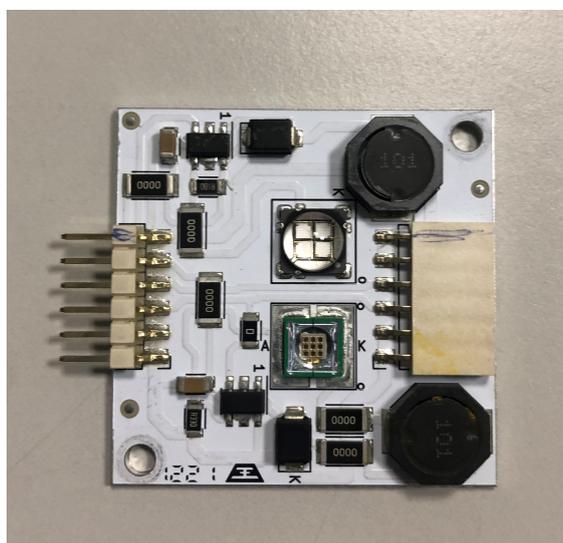


Figura 3.2: Circuito con LED integrati.

Il circuito è stato fissato su un supporto metallico, avente una guida che consente di aumentare o diminuire la distanza del circuito dalla superficie di appoggio dei

campioni a seconda dei dati richiesti dalle prove. Il set-up sperimentale è mostrato in fig. 3.3.



Figura 3.3: Set-up sperimentale.

3.1.2 Metodi

In questa sezione sono indicati i metodi impiegati, comuni a tutte le prove. Come prima cosa, sono state fatte delle simulazioni in Matlab[®] in cui è stato considerato un LED che irradia perpendicolarmente, ad una certa distanza “ h ”, una superficie circolare con raggio “ r ”, che si suppone sia la superficie della soluzione contaminata. Per quanto riguarda l’inattivazione batterica attraverso la radiazione ultravioletta a corto raggio, in letteratura è stato trovato un valore di dose ottimale per l’abbattimento di 2 log dell’*E. coli* di circa 6.6 mJ/cm^2 . In questo studio, è stato deciso di indagare un livello di dose superiore a quello trovato, pari a 10 mJ/cm^2 , andando a ricavare, alle diverse irradianze ottenute con valori di r e h prefissati, i tempi di esposizione necessari per raggiungere tale dose. Circa l’inattivazione dell’*E. coli* tramite la radiazione blu, in letteratura è stato trovato un valore di dose sufficiente pari a 108 mJ/cm^2 ; tuttavia, la maggioranza degli studi non esclude che l’effetto battericida da loro ottenuto non sia dovuto all’eccessivo aumento della temperatura del campione. È stato quindi deciso di indagare diverse dosi di radiazione, impostando a priori la distanza campione-LED e il tempo di esposizione per vari test, accertandosi in tutte le prove che l’innalzamento di temperatura sia in un range contenuto.

Una volta ottenuta la serie di valori dei tempi di esposizione, con raggio del contenitore e distanza precedentemente fissati, si passa alla fase sperimentale in laboratorio. Non potendo prevedere con esattezza se a livello pratico i risultati ottenuti potessero confermare quelli teorici, sono state pianificate diverse prove ripetute da eseguire nei vari test, sia per poter studiare un discreto range di valori che per verificarne la ripetibilità.

I campioni impiegati negli esperimenti sono tutti composti da soluzioni acquose, in particolare, per alcune prove è stata utilizzata dell'acqua potabile del rubinetto contaminata con feci feline o terriccio, in altre prove è stato utilizzato il latte vaccino non pastorizzato, in altre ancora acque prelevate da diversi laghi. I campioni preparati, sono stati messi all'interno delle piastre di Petri sterili aventi il diametro scelto in fase di simulazione, e sono stati irradiati per i tempi e le distanze prestabilite. Per ogni tipologia di esperimento, è stato prelevato un campione di riferimento non irradiato da poter confrontare con quelli esposti ai LED.

Per valutare la presenza delle colonie batteriche del campione di controllo e di quelli irradiati, sono state utilizzate delle Contact Slide *Liofilchem*[®] di tipo 1: dei dispositivi pronto all'uso costituiti da un supporto di plastica rivestito da due materiali differenti che consentono l'isolamento e l'enumerazione delle *Enterobacteriaceae* presenti sulle superfici o nei liquidi (Fig. 3.1d). Una volta preparate le Contact slide, sono state incubate per 24 h consecutive a 37 °C in un incubatore *IVYX Scientific* (Fig. 3.1c), accelerando il processo di proliferazione delle colonie batteriche.

Al termine del tempo di incubazione, sono state acquisite le foto dei campioni e poi rielaborate in ambiente Matlab[®]. Come prima cosa, per ciascuna immagine, è stato fatto del pre-processing per ritagliarle e variarne i livelli di contrasto e di luminosità in modo da consentire un'individuazione ottimale delle colonie batteriche. È stata quindi calcolata la percentuale di batteri presente in ciascun campione, e l'abbattimento batterico ottenuto rapportato al corrispondente riferimento. Per ogni esperimento verranno mostrati dei diagrammi che mostrano questo ultimo dato. È stato anche creato un codice Python in grado di contare il numero delle colonie batteriche direttamente dalle immagini processate, per avere un'indicazione più quantitativa dei risultati ottenuti.

In questo capitolo sono riportati soltanto i risultati sperimentali più rilevanti di questo studio e le motivazioni che hanno portato a determinate scelte. Essi sono suddivisi in due sezioni principali, nella prima vengono considerati gli esperimenti relativi alla sanificazione tramite LED UVC e nella seconda quelli relativi alla sanificazione tramite LED blu.

3.2 Risultati sperimentali

3.2.1 Sanificazione tramite LED UVC

I seguenti esperimenti si basano sull'utilizzo di luce UVC per la sanificazione di soluzioni contaminate.

Esperimento 1

Il campione impiegato in queste prove è composto da acqua potabile di un rubinetto (priva di *E. coli*) contaminata con feci di gatto (contaminante facilmente reperibile contenente *E. coli*). Per l'esposizione al LED è stato utilizzato un recipiente molto piccolo, con raggio pari a 0.3 cm.

Sono stati svolti tre test in totale, per ciascuno dei quali è stata impostata una certa distanza LED-campione, e un certo tempo di esposizione necessario per ottenere una dose di 10 mJ/cm². Ogni test è stato ripetuto tre volte per studiarne la ripetibilità.

Una volta finita l'esposizione, sono state prima preparate le contact slide del campione di riferimento e dei campioni irradiati e poi messe in incubazione a 37 °C per 24 h.

Materiale:

- 280 mL di acqua di rubinetto;
- 1.1 g di feci di gatto;
- 10 Contact slide.

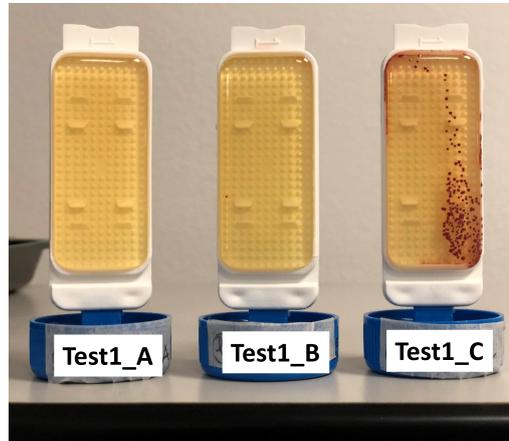
Campioni analizzati:

- 1 campione di riferimento;
- 3 campioni irradiati con UVC ad un'altezza di 1.8 cm per 1 s (Test1 A, Test1 B, Test1 C);
- 3 campioni irradiati con UVC ad un'altezza di 2.5 cm per 2 s (Test2 A, Test2 B, Test2 C);
- 3 campioni irradiati con UVC ad un'altezza di 5 cm per 5 s (Test3 A, Test3 B, Test3 C).

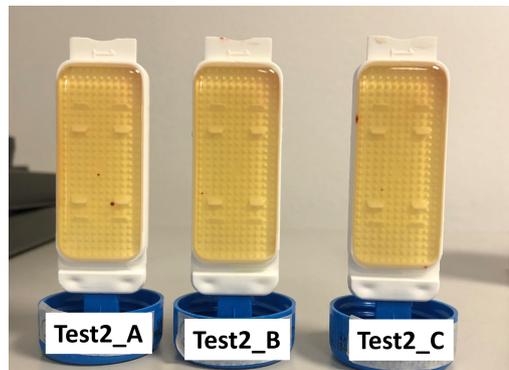
In seguito sono mostrate le figure dei campioni analizzati dopo un tempo di incubazione a 37 °C di 24 h.



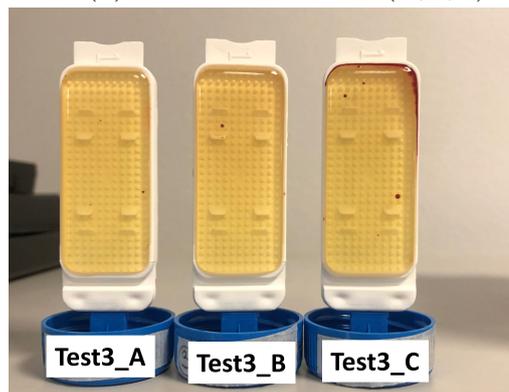
Figura 3.4: Contact slide di controllo.



(a) Contact slide test1 (A,B,C).



(b) Contact slide test2 (A,B,C).



(c) Contact slide test3 (A,B,C).

Figura 3.5: Contact slide test1 (a), test2 (b), test3 (c).

Risultati

Nella figura 3.6 è riportato un grafico a barre con le percentuali di abbattimento batterico raggiunte nei tre test. In tutte le ripetizioni si ottengono delle percentuali molto alte di abbattimento (maggiori dell'89%), eccetto in due casi: test1 C e test3 C, in cui si può osservare un incremento batterico rispetto al campione di controllo molto elevato. Per spiegare questi dati discordanti è possibile fare due supposizioni. In primo luogo, è probabile che a causa del ridotto diametro del contenitore, contenente la soluzione da irradiare, ci sia stato uno scorretto posizionamento del campione, non perfettamente ortogonale al LED. Inoltre, la soluzione è stata preparata senza seguire dei criteri di diluizione o di mescolamento prestabiliti e questo potrebbe aver comportato una disomogeneità nel prelievo dei campioni acquisi prima della loro esposizione.

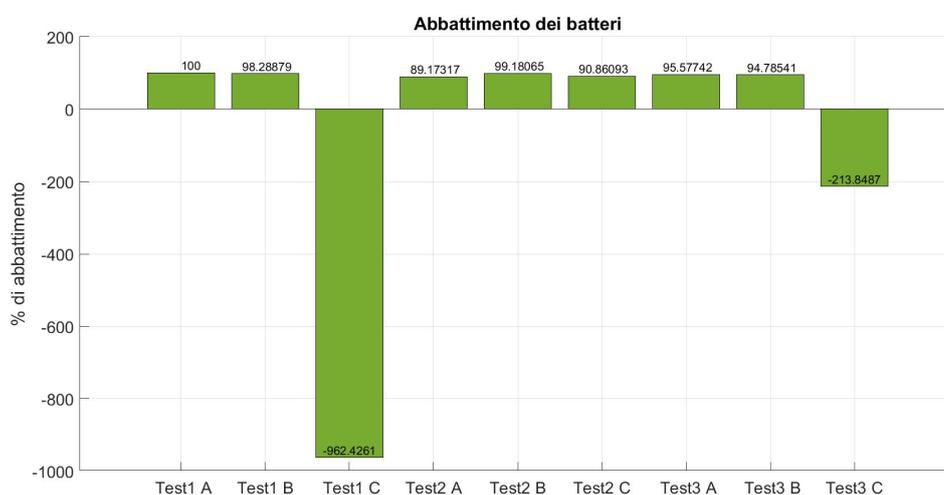


Figura 3.6: Abbattimento batterico.

Alla luce di quanto precedentemente detto, per i successivi esperimenti, è stato deciso di mettere in atto delle nuove procedure per la diluizione dei campioni e per il mescolamento prima del prelievo di soluzione per ogni prova. Inoltre, per l'irraggiamento sono stati utilizzati dei recipienti che avessero un raggio superiore a 1 cm.

Esperimento 2

Vista la necessità di una migliore preparazione dei campioni per rendere i vari test più coerenti tra di loro, è stata eseguita una diluizione seriale (fig. 3.7) [6] della soluzione, riducendo la concentrazione del contaminante nella soluzione da sanificare. Per eseguire la diluizione seriale, si preparano delle provette contenenti 9 mL di liquido di diluizione, in questo caso acqua. In seguito, nella prima provetta viene aggiunto 1 mL del campione concentrato, nella seconda provetta 1 mL della prima e così via nelle successive. Si ottiene in questo modo una soluzione con concentrazione 1:10 nella prima provetta, 1:100 nella seconda, 1:1.000 nella terza, ecc. . .

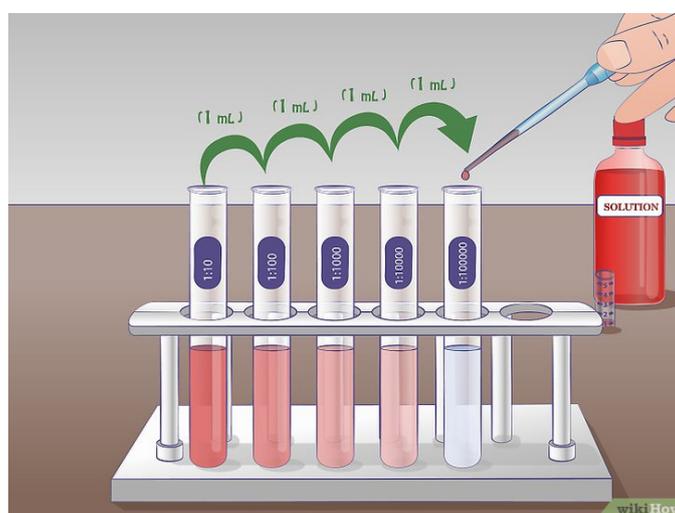


Figura 3.7: Esempio di diluizione seriale [6].

L'obiettivo di questi test, non è stato solo quello di valutare l'efficacia germicida del LED UV, ma anche quello di valutare come i risultati variano diluendo i campioni. Come nelle prove precedenti, per preparare il campione da sanificare è stata utilizzata l'acqua potabile di un rubinetto (priva di *E. coli*) contaminata con feci di gatto. Per l'esposizione è stata impiegata una capsula di Petri con raggio pari a 1.4 cm e, impostando una dose minima pari a 10 mJ/cm², sono stati calcolati i tempi di esposizione e la distanza LED-campione, mantenuti fissi per tutte le prove, rispettivamente a 3.4 s e 2.5 cm. In totale sono stati fatti tre test, uno per ciascuna serie di diluizione. Ogni test è stato eseguito due volte per studiarne la ripetibilità. Una volta finita l'esposizione, sono state prima preparate le contact slide del campione di riferimento e dei campioni irradiati e poi messe in incubazione a 37 °C per 24 h.

Materiali:

- 160 mL di acqua di rubinetto;

- 5.48 g di feci di gatto;
- 10 Contact slide.

Dopo aver contaminato l'acqua, sono state fatte le seguenti diluizioni:

1. Test A: 1 mL di acqua contaminata + 9 mL di acqua del rubinetto (diluizione 1:10);
2. Test B: 1 mL di acqua contaminata di prova A + 9 mL di acqua del rubinetto (diluizione 1:100);
3. Test C: 1 mL di acqua contaminata del test B + 9 mL di acqua del rubinetto (diluizione 1:1000).

Campioni analizzati:

- 1 riferimento di acqua contaminata non diluita;
- 1 riferimento per ogni prova (Controllo A, Controllo B, Controllo C);
- 2 campioni irradiati con UVC ad un'altezza di 2.5 cm per 3.4 s per ogni prova (TestA1, TestA2, TestB1, TestB2, TestC1, TestC2).

In seguito sono mostrate le figure dei campioni analizzati dopo un tempo di incubazione a 37 °C di 24 h.

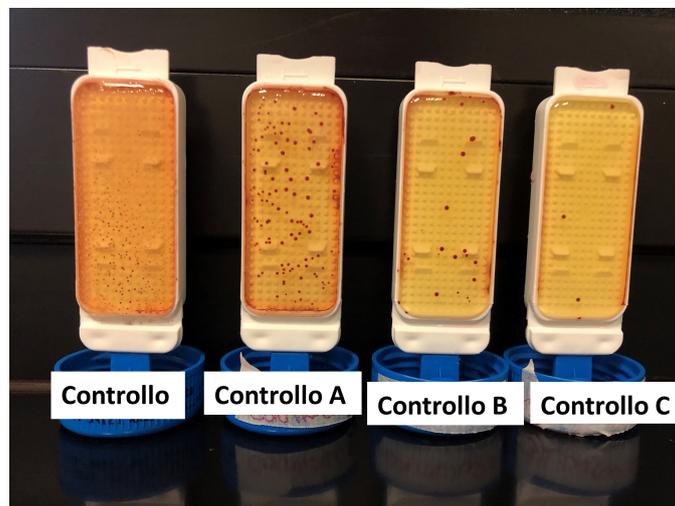
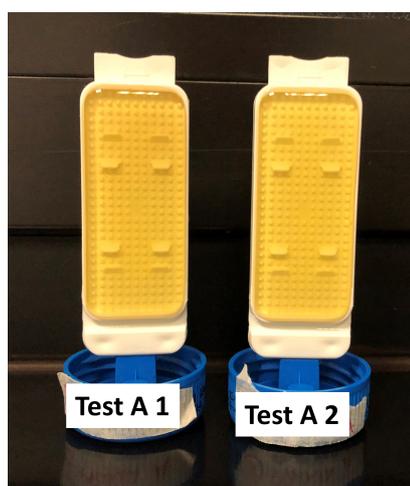
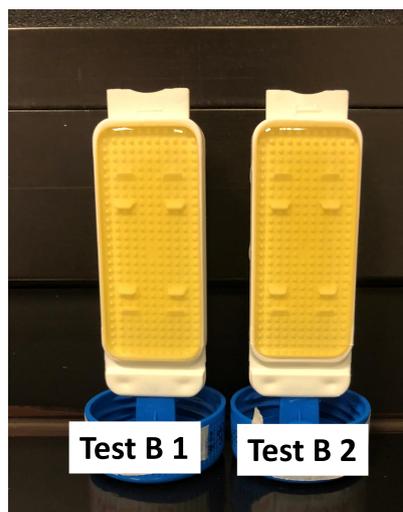


Figura 3.8: Contact slide dei controlli a diversi livelli di diluizione.

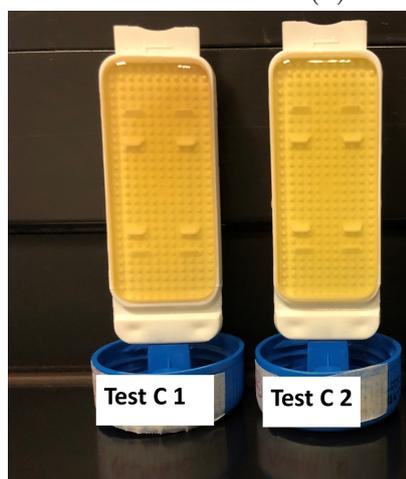
Nella figura 3.8 è possibile osservare la proliferazione batterica della stessa soluzione diluita più volte. Il primo campione di controllo è relativo all'acqua contaminata non diluita, in esso è possibile notare che il numero di colonie batteriche



(a) Contact slide test A.



(b) Contact slide test B.



(c) Contact slide test C.

Figura 3.9: (a) Contact slide testA, (b) Contact slide testB,(c) Contact slide testC.

non è valutabile, in quanto non ben localizzabili nella superficie. Nel secondo, che rappresenta la soluzione diluita 1:10, ci sono approssimativamente 10^5 CFU/ml (Unità formanti colonie). Nel terzo e nel quarto controllo, in cui le soluzioni sono diluite rispettivamente di 1:100 e 1:1000, è possibile notare un grande decremento delle colonie, infatti si passa prima a circa 10^4 CFU/ml e poi a 10^3 CFU/ml. Da questi risultati è deducibile che una corretta diluizione delle soluzioni analizzate, ci consente di avere non solo dei campioni più omogenei tra di loro, ma anche dei risultati più facili da interpretare.

Risultati

Per ogni contact slide è stato calcolato il numero di colonie batteriche, riportato

nella seguente tabella: Nella figura 3.10 è riportato il grafico a barre delle percen-

Tabella 3.1: Numero di colonie batteriche nelle contact slide di controllo e nei test A,B,C.

| | |
|--|-----|
| Numero di colonie batteriche nel controllo non diluito | 717 |
| Numero di colonie batteriche nel controllo A | 301 |
| Numero di colonie batteriche nel controllo B | 27 |
| Numero di colonie batteriche nel controllo C | 4 |
| Numero di colonie batteriche nel TestA (1 e 2) | 0 |
| Numero di colonie batteriche nel TestB (1 e 2) | 0 |
| Numero di colonie batteriche nel TestC (1 e 2) | 0 |

tuali di abbattimento batterico raggiunte in entrambe le ripetizioni dei tre test. Gli ottimi risultati ottenuti mostrano un totale abbattimento batterico in tutti i campioni esposti al LED (superiore a 9log).

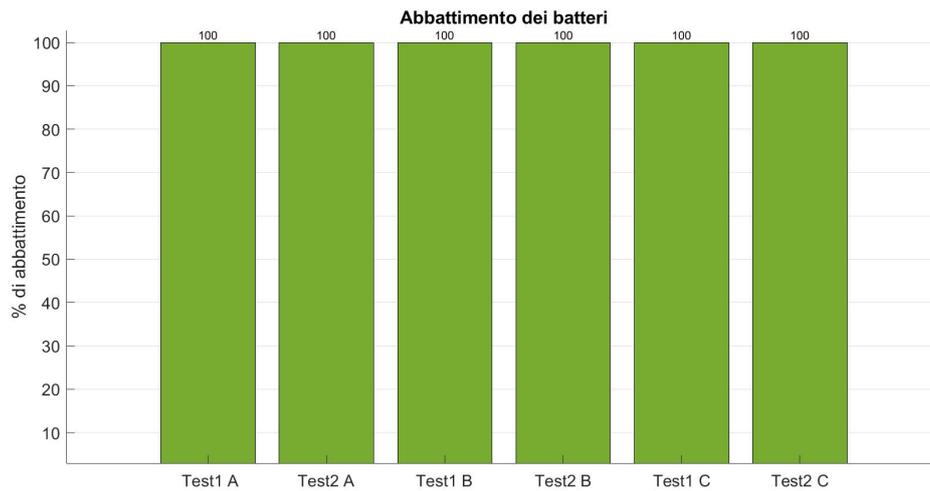


Figura 3.10: Abbattimento batterico.

Esperimento 3

Anche in queste prove il campione utilizzato è composto da acqua potabile di un rubinetto (priva di *E. coli*) contaminata con feci di gatto. Per l'esposizione al LED è stato utilizzato un piatto di Petri con raggio pari a 1.4 cm.

Come per il primo esperimento (3.2.1) stati svolti tre test in totale, per ciascuno dei quali è stata impostata una certa distanza LED-campione, e un certo tempo di esposizione necessario per ottenere una dose di 10 mJ/cm². Ogni test è stato ripetuto tre volte per studiarne la ripetibilità.

Una volta finita l'esposizione, sono state prima preparate le contact slide del campione di riferimento e dei campioni irradiati e poi messe in incubazione a 37 °C per 24 h.

Materiale:

- 160 mL di acqua del rubinetto;
- 5.8 g di feci di gatto;
- 10 contact slide.

Dopo aver contaminato l'acqua, sono state fatte le stesse diluizioni dell'esperimento precedente (3.2.1).

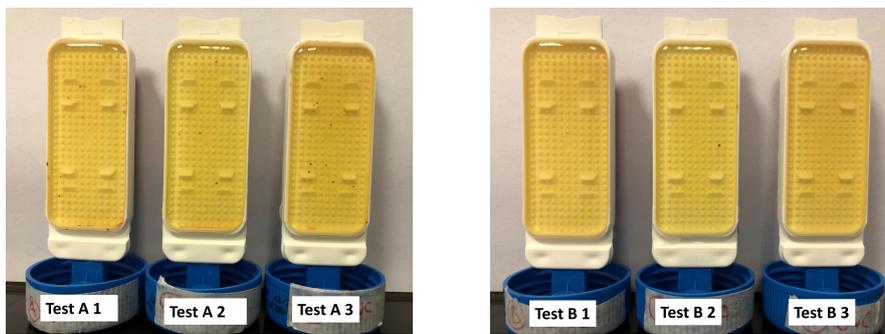
Campioni analizzati:

- 1 riferimento di acqua contaminata diluita;
- 3 campioni irradiati con UVC ad un'altezza di 1.8 cm per 1.09 s (TestA 1, TestA 2, TestA 3);
- 3 campioni irradiati con UVC ad un'altezza di 2.5 cm per 2.08 s (TestB 1, TestB 2 TestB 3);
- 3 campioni irradiati con UVC ad un'altezza di 5 cm per 5 s (TestC 1, TestC 2, TestC 3).

In seguito sono mostrate le figure dei campioni analizzati dopo un tempo di incubazione a 37 °C di 24 h.

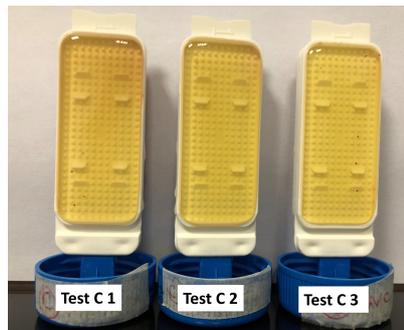


Figura 3.11: Contact slide di controllo.



(a) Contact slide test A.

(b) Contact slide test B.



(c) Contact slide test C.

Figura 3.12: Contact slide testA(a), testB(b), testC(c)

Risultati:

Per ogni contact slide è stato calcolato il numero di colonie batteriche, riportato nella tabella 3.2. Nella figura 3.13 è mostrato il grafico a barre delle percentuali di abbattimento batterico raggiunte in ciascuna ripetizione dei tre test. Nei test B,

Tabella 3.2: Numero di colonie batteriche nelle contact slide di controllo e nei test A,B,C.

| | |
|--|-----|
| Numero di colonie batteriche nel controllo diluito | 105 |
| Numero di colonie batteriche nel TestA 1 | 7 |
| Numero di colonie batteriche nel TestA 2 | 4 |
| Numero di colonie batteriche nel TestA 3 | 12 |
| Numero di colonie batteriche nel TestB 1 | 1 |
| Numero di colonie batteriche nel TestB 2 | 1 |
| Numero di colonie batteriche nel TestB 3 | 0 |
| Numero di colonie batteriche nel TestC 1 | 4 |
| Numero di colonie batteriche nel TestC 2 | 0 |
| Numero di colonie batteriche nel TestC 3 | 8 |

in cui il campione è posto a 2.5 cm, si ottiene i risultati migliori, con un minimo di percentuale di abbattimento del 98,88%, quindi di circa 2log. Sono comunque stati raggiunti dei risultati ottimi per tutte le altre ripetizioni dei tre test, nelle quali non la percentuale non scende mai sotto l'89,88%.

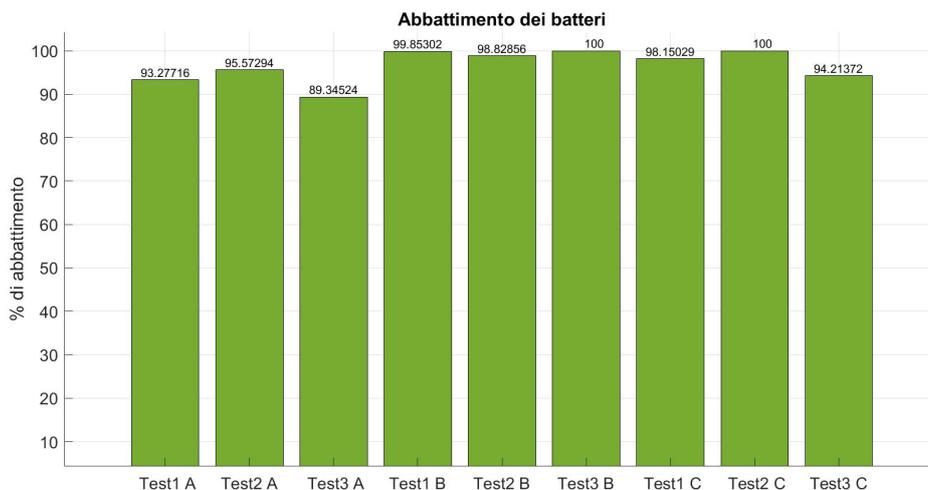


Figura 3.13: Abbattimento batterico.

Esperimento 4

Per queste prove è stato utilizzato del latte vaccino non pastorizzato. È stato analizzato sia il latte non diluito che il latte diluito tramite la diluizione seriale mostrata nell'esperimento 3.2.1. Per entrambi i campioni sono state fatte delle esposizioni con i tempi e le distanze dal LED riportate in seguito. Ciascuna prova (A,B,C), è stata ripetuta per due volte per rendere i risultati più affidabili e per studiarne la ripetibilità.

. Per calcolare altezze e tempi è stata impostata una dose pari a 10 mJ/cm^2 , e un raggio di 1.4 cm. Una volta finita l'esposizione, sono state prima preparate le contact slide del campione di riferimento e dei campioni irradiati e poi messe in incubazione a 37°C per 24 h.

Materiale:

- Latte vaccino non pastorizzato;
- 14 contact slide;
- acqua del rubinetto per la diluizione.

Il latte è stato diluito nel seguente modo:

1. Step1: 1 mL di latte + 9 mL di acqua del rubinetto (1:10);
2. Step2: 1 mL di latte diluito nello step1 + 9 mL di acqua del rubinetto (1:100);
3. Step3: 1 mL di latte diluito nello step2 + 9 mL di acqua del rubinetto (1:1000).

Campioni analizzati:

- 1 riferimento di latte vaccino diluito;
- 1 riferimento di latte vaccino non diluito;
- 3 campioni di latte diluito irradiati con UVC ad un'altezza di 1.8 cm per 1.09 s (TestA);
- 3 campioni di latte diluito irradiati con UVC ad un'altezza di 2.5 cm per 2.04 s (TestB);
- 3 campioni di latte diluito irradiati con UVC ad un'altezza di 5 cm per 7.1 s (TestC);
- 3 campioni di latte non diluito irradiati con UVC ad un'altezza di 1.8 cm per 1.09 s (TestA);

- 3 campioni di latte non diluito irradiati con UVC ad un'altezza di 2.5 cm per 2.04 s (TestB);
- 3 campioni di latte non ;diluito irradiati con UVC ad un'altezza di 5 cm per 7.1 s (TestC).

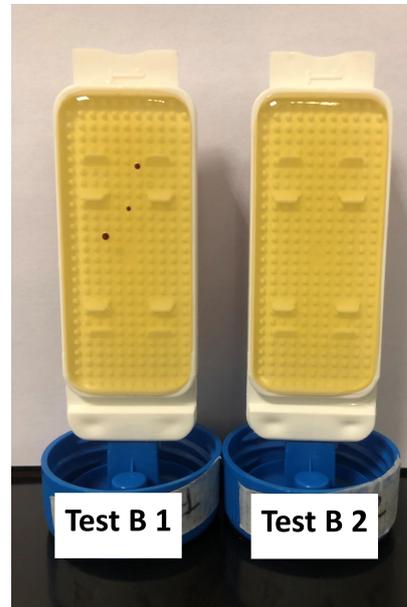
In seguito sono mostrate le figure dei campioni di latte diluito analizzati dopo un tempo di incubazione a 37°C di 24 h.



Figura 3.14: Contact slide di controllo del latte diluito.



(a) Contact slide test A (1,2).



(b) Contact slide test B (1,2).



(c) Contact slide test C (1,2).

Figura 3.15: Contact slide testA(a), testB(b), testC(c).

Per ogni contact slide del latte diluito è stato inoltre calcolato il numero di colonie batteriche, riportato nella seguente tabella:

Tabella 3.3: Numero di colonie batteriche nelle contact slide di controllo e nei test A,B,C del latte diluito.

| | |
|--|-----|
| Numero di colonie batteriche nel campione di controllo diluito | 105 |
| Numero di colonie batteriche nel TestA 1 | 7 |
| Numero di colonie batteriche nel TestA 2 | 0 |
| Numero di colonie batteriche nel TestB 1 | 3 |
| Numero di colonie batteriche nel TestB 2 | 0 |
| Numero di colonie batteriche nel TestC 1 | 1 |
| Numero di colonie batteriche nel TestC 2 | 0 |

Risultati

Nella figura 3.16 è il grafico a barre delle percentuali di abbattimento batterico raggiunte in ciascuna ripetizione dei tre test. Ad eccezione del test A, in cui la percentuale di abbattimento è circa del 94%, in tutti gli altri test si supera la percentuale del 99,3% (maggiore di 2log), raggiungendo un abbattimento totale per almeno tre campioni. Sono stati raggiunti quindi dei risultati ottimi per tutte le prove effettuate.

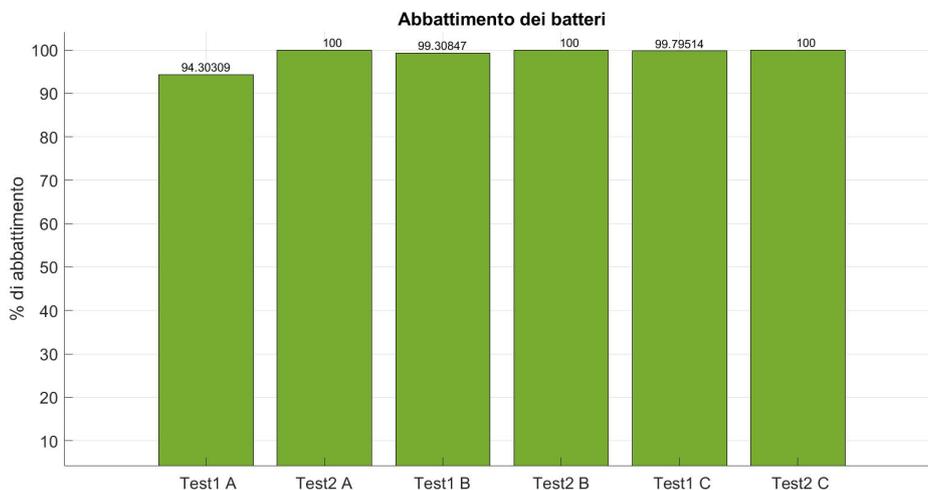


Figura 3.16: Abbattimento batterico.

Nell'immagine nella figura 3.17 è invece riportata la serie di prove fatte con il latte vaccino non diluito. È stata rilevata una grande quantità di *E. coli* nel latte non pastorizzato, come si può vedere dalla foto. Inoltre, a causa dell'elevata concentrazione di colonie batteriche, non è valutabile alcun abbattimento batterico

consistente in nessuno dei campioni analizzati. Questo potrebbe essere dovuto oltre al fatto che il campione non è diluito, anche al fatto che, essendo molto opaco, impedisce all'UVC di raggiungere gli strati inferiori. Una prova futura con il latte non diluito potrebbe essere svolta mantenendo continuamente mescolato il campione, oppure utilizzando uno strato molto sottile di campione.

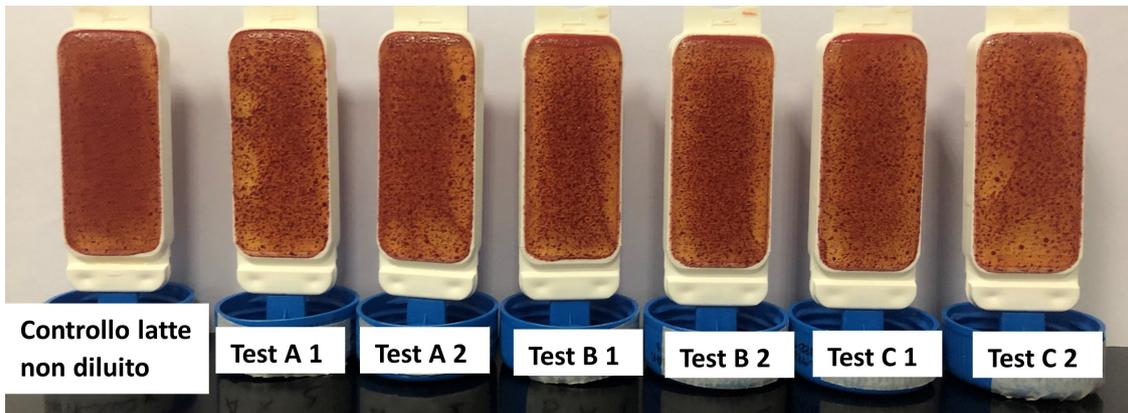


Figura 3.17: Controllo del latte non diluito e risultati ottenuti con diversi tempi di esposizione con il LED blu.

3.2.2 Sanificazione tramite LED blu

I seguenti esperimenti si basano sull'utilizzo di luce blu per la sanificazione di soluzioni contaminate. In particolare, gli esperimenti si concentrano sulla ricerca di una dose di irradiazione blu sufficiente all'abbattimento batterico, evitando che quest'ultimo sia dovuto all'effetto termico della radiazione. A differenza dei precedenti esperimenti relativi al LED UVC, in queste prove le distanze LED-campione e i tempi di esposizione non sono stati calcolati in Matlab[®] fissando una dose minima necessaria per la disinfezione batterica, ma è stato fatto un procedimento inverso: sono state analizzate diverse distanze LED-campione e diversi tempi di esposizione, cercando così la combinazione migliore, quindi che consenta un abbattimento più significativo. Il campione utilizzato per tutti i quattro esperimenti esposti è composto da acqua potabile di un comune rubinetto (priva di *E. coli*) contaminata con feci di gatto e per l'esposizione è stata utilizzata una capsula di Petri con raggio pari a 1.4 cm.

Esperimento 1

Per questo primo esperimento è stata fissata una distanza LED-campione di 1.8 cm. I tempi di esposizione testati sono stati i seguenti: 10 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s. Una volta finita l'esposizione, sono state prima preparate le contact slide del campione di riferimento e dei campioni irradiati e poi messe in incubazione a 37 °C per 24 h.

Materiale:

- 160 mL di acqua del rubinetto;
- 5.8 g di feci di gatto;
- 7 contact slide.

Dopo aver contaminato l'acqua, sono state fatte le stesse diluizioni dell'esperimento 3.2.1 della sezione precedente.

In seguito sono mostrate le figure dei campioni analizzati dopo un tempo di incubazione a 37 °C di 24 h.



Figura 3.18: Contact slide di controllo.

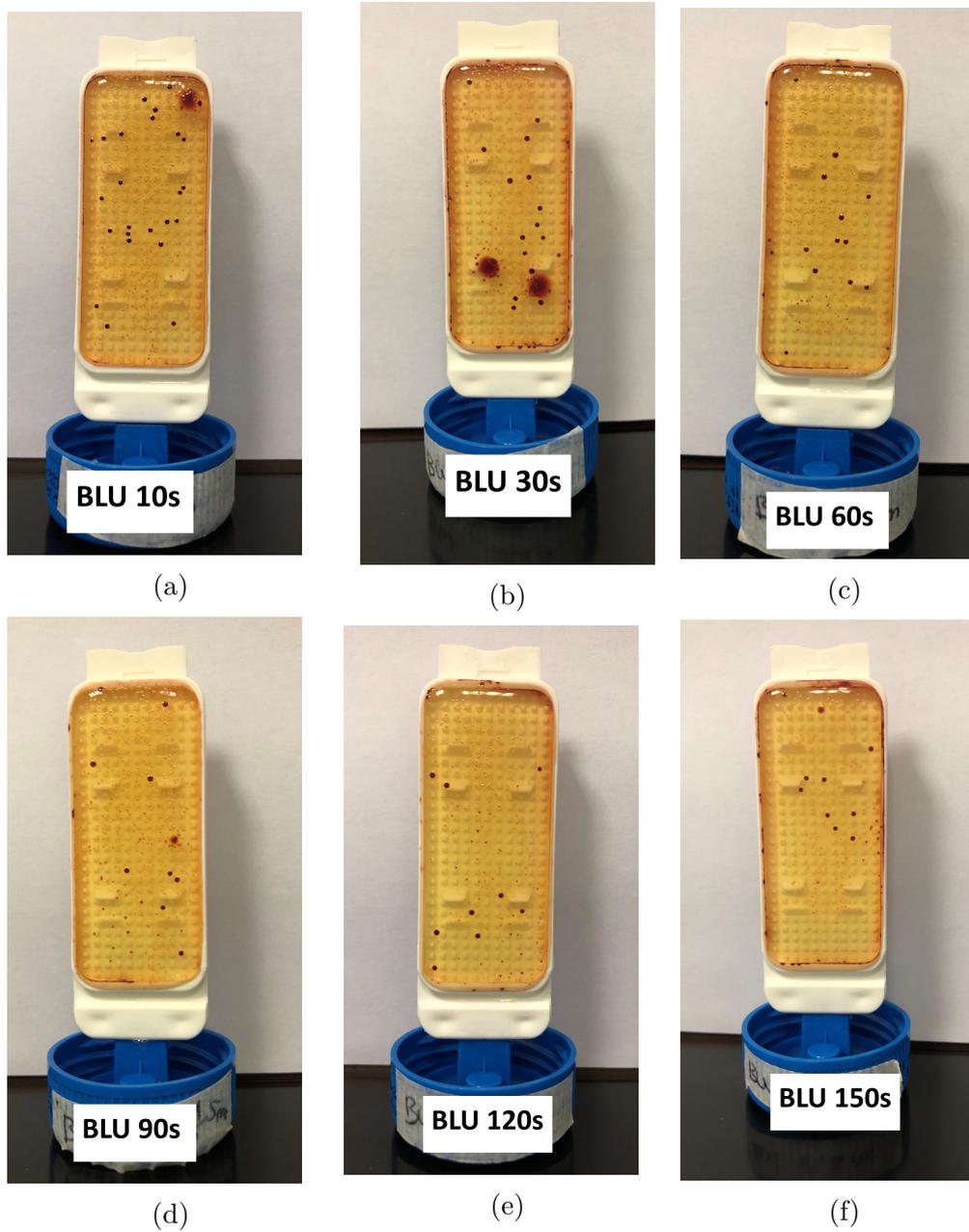


Figura 3.19: Contact slide di tutti i campioni irradiati con un LED blu.(a) Campione irradiato per 10 s. (b) Campione irradiato per 30 s. (c) Campione irradiato per 60 s. (d) Contact slide del campione irradiato per 90 s. (e) Campione irradiato per 120 s. (f) Campione irradiato per 150 s.

Risultati

Nella figura 3.20 è riportato il grafico a barre delle percentuali di abbattimento batterico raggiunte con i diversi tempi di esposizione. Come atteso, la percentuale di abbattimento batterico non ha raggiunto dei risultati sufficienti per nessuna ripetizione (minori di 1log), per questo motivo è stato deciso di incrementare i tempi di esposizione alla radiazione nelle successive prove.

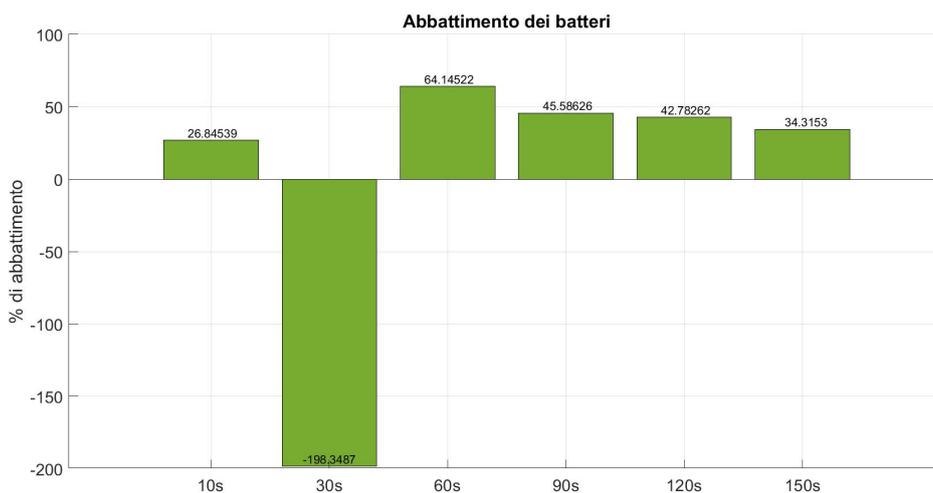


Figura 3.20: Abbattimento batterico.

Esperimento 2

In queste prove, la distanza LED-campione è stata aumentata rispetto all'esperimento precedente(3.2.2) e fissata ad un valore pari a 2.5 cm.

I tempi di esposizione testati sono stati i seguenti: 10 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s.

Materiale:

- 171 mL di acqua del rubinetto;
- 6.2 g di feci di gatto;
- 6 contact slide.

Dopo aver contaminato l'acqua, sono state fatte le stesse diluizioni dell'esperimento 3.2.1 della sezione precedente.

In seguito sono mostrate le figure dei campioni analizzati dopo un tempo di incubazione a 37 °C di 24 h.

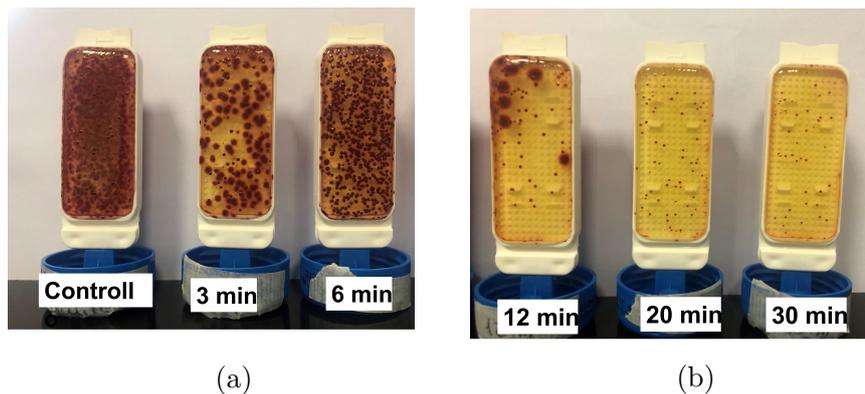


Figura 3.21: Contact slide di tutti i campioni irradiati con un LED blu.(a) Campione di controllo a sinistra, campione irradiato per 3 min al centro e campione irradiato per 6 min a destra. (b) Campione irradiato per 12 min a sinistra, campione irradiato per 20 min al centro e campione irradiato per 30 min a destra.

Risultati

È stato quindi valutato l'abbattimento batterico percentuale (3.22) raggiunto con i nuovi tempi di esposizione. È possibile notare un aumento lineare delle prestazioni di disinfezione all'aumentare del tempo di esposizione. Nelle prove con tempi uguali o superiori a 20 min, si raggiungono delle percentuali molto elevate che superano il 98,8%, raggiungendo un abbattimento batterico superiore a 2log per tempi di esposizione di 30 min.

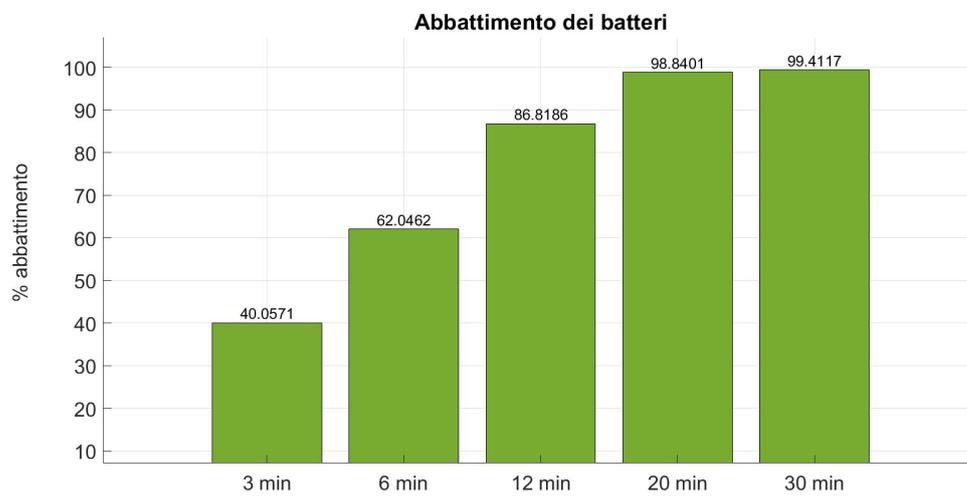


Figura 3.22: Abbattimento batterico.

Esperimento 3

La distanza LED-campione è stata diminuita di 1 cm rispetto al precedente esperimento(3.2.2), quindi è stata impostata a 1.5 cm, al fine di valutare l'incremento di dose a distanze inferiori.

I tempi di esposizione testati sono stati i seguenti: 6 min, 10 min, 15 min, 20 min.

Materiale:

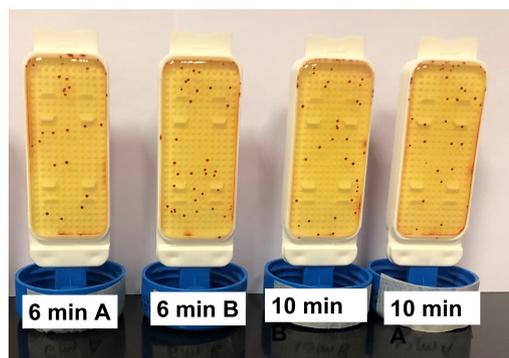
- 177 mL di acqua del rubinetto;
- 6.4 g di feci di gatto;
- 9 contact slide.

Dopo aver contaminato l'acqua, sono state fatte le stesse diluizioni dell'esperimento 3.2.1 della sezione precedente.

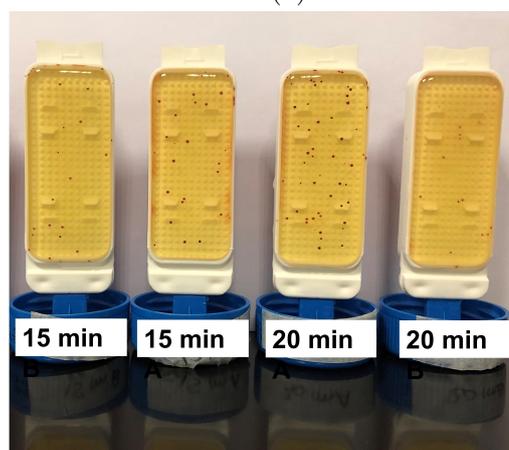
In seguito sono mostrate le figure dei campioni analizzati dopo un tempo di incubazione a 37 °C di 24 h.



Figura 3.23: Contact slide di controllo.



(a)



(b)

Figura 3.24: Contact slide di tutti i campioni irradiati con un LED blu. (a) Campioni irradiati per 6 min a sinistra e campioni irradiati per 10 min a destra. (b) Campioni irradiati per 15 min a sinistra e campioni irradiati per 20 min a destra.

Risultati

Con i tempi di esposizione scelti e la distanza LED-campione impostati, è stato raggiunto un incremento della percentuale di abbattimento batterico notevole rispetto al precedente esperimento (3.2.2) come si può vedere nel grafico a barre dei risultati (3.25). Le prestazioni minori si hanno per tempi di esposizione di 6 min (circa 93,5%). Con tempi di esposizione che vanno dai 10 ai 20 min però, riusciamo a ottenere una buona efficacia di disinfezione, raggiungendo una percentuale di abbattimento compreso tra 95% e 99,4%, quindi superando anche l'abbattimento di 2log.



Figura 3.25: Abbattimento batterico.

Esperimento 4

In questo ultimo esperimento, la distanza LED-campione è stata diminuita di 0.5 cm rispetto al precedente, quindi è stata impostata a 1 cm.

I tempi di esposizione testati sono stati i seguenti: 6 min, 10 min, 15 min, 20 min.

Materiale:

- 177 mL di acqua del rubinetto;
- 6.4 g di feci di gatto;
- 9 contact slide.

Dopo aver contaminato l'acqua, sono state fatte le stesse diluizioni dell'esperimento 3.2.1 della sezione precedente.

In seguito sono mostrate i campioni analizzati dopo un tempo di incubazione a 37°C di 24 h. È facilmente osservabile nella fig. 3.26 un decremento abbastanza lineare delle colonie batteriche all'aumentare dei tempi di esposizione.

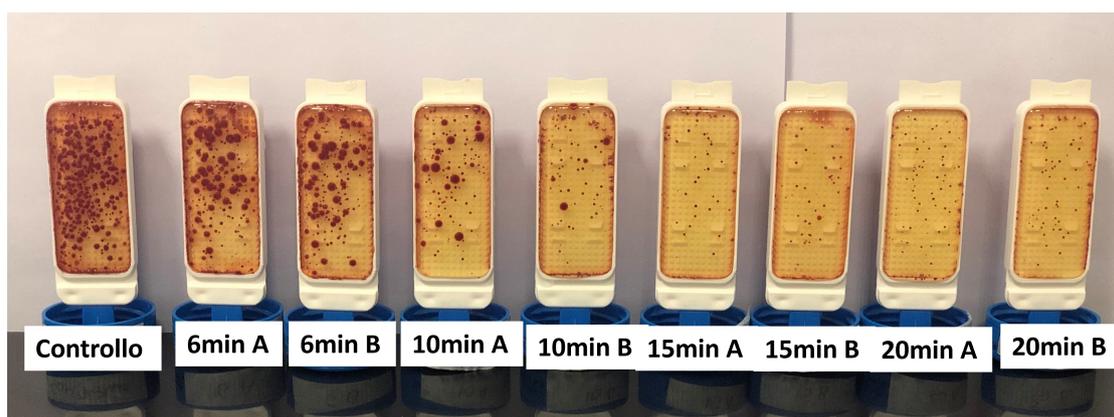


Figura 3.26: Tutte le contact slide dell'esperimento 4.

Risultati

Nella figura 3.27 è riportato il grafico a barre delle percentuali di abbattimento batterico raggiunte con i diversi tempi di esposizione.

Come si può osservare, è stato dimostrato che la percentuale di abbattimento batterico raggiunta con una distanza LED-campione di 1 cm è inferiore rispetto a quella raggiunta a 1.5 cm per tutti i tempi di esposizione. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che, utilizzando dei piatti contenenti il campione delle stesse dimensioni in entrambi gli esperimenti, si ha una distribuzione della radiazione sul campione migliore per 1.5 cm.

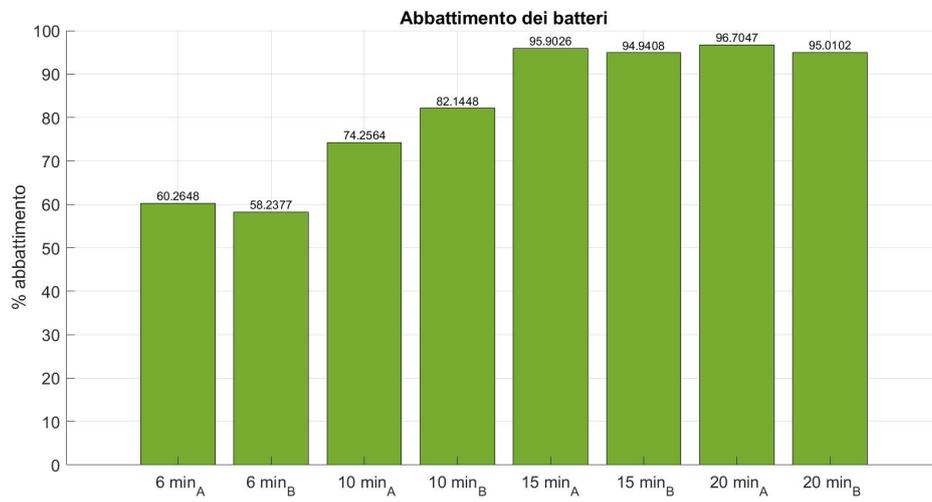


Figura 3.27: Abbattimento batterico.

Capitolo 4

Progettazione di un prototipo di sistema di sanificazione

Come affermato in precedenza, l'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di progettare un prototipo di sistema di disinfezione dell'acqua, contaminata da *E. coli*, basato sulla radiazione luminosa da poter integrare nei comuni rubinetti. Dai risultati sperimentali del precedente capitolo è emerso che è possibile ottenere un abbattimento dell'*E. coli* totale o comunque maggiore del 99%, tramite radiazioni UVC con una dose minima di 10 mJ/cm^2 per tempi di esposizione della durata di qualche secondo. Invece, per raggiungere un abbattimento comparabile utilizzando la luce blu sono necessari tempi di esposizione maggiori di 20 min. Possiamo quindi dedurre da tali risultati, che nel caso di una sorta di “tubo sanificante”, cioè di una sistema per disinfezione in tempo reale dell'acqua transitante, i LED blu hanno un'efficacia molto ridotta rispetto ai LED UVC; pertanto risultano poco adatti per questo genere di applicazioni in cui il tempo di esposizione per eseguire la disinfezione è piccolo, essendo limitato dalla velocità di transito nella regione interessata.

Nel seguito del capitolo, dopo una breve introduzione alla Radiometria e alle sorgenti lambertiane, verranno presentate alcune simulazioni eseguite in Matlab[®] al fine di trovare disposizione ottimale delle sorgenti UVC per progettare il dispositivo sanificante.

4.1 Radiometria

La radiometria è la scienza che si occupa delle misurazioni dell'energia radiante dell'intero spettro elettromagnetico, compresa la luce visibile, e caratterizza la distribuzione della potenza della radiazione nello spazio. In questo studio si applicano le leggi dell'ottica geometrica, trascurando quindi gli effetti di interferenza e diffrazione; inoltre, si assume che l'energia radiante venga trasportata lungo la direzione

del raggio e che il mezzo sia privo di perdite.

4.1.1 Definizioni:

- **Potenza radiante o Flusso radiante** ($\Phi_e, [W]$): l'energia radiante emessa, riflessa o trasmessa nell'unità di tempo, conosciuta anche come potenza luminosa. L'energia radiante viene indicata con Q_e e si misura in J.

$$\Phi_e = \frac{dQ_e}{dt} \quad (4.1)$$

- **Irradianza o Densità di Flusso** ($E_e, [W/m^2]$): è il flusso radiante totale incidente per unità di superficie.

$$E_e = \frac{d\Phi_e}{\cos \theta_d dA_d} \quad (4.2)$$

- **Intensità radiante** ($I_e, [W/sr]$): è una quantità direzionale che descrive la potenza radiante emessa da una sorgente puntiforme emessa in una certa direzione nell'unità di angolo solido.

$$I_e = I_{e,\Omega} = \frac{d\Phi_e}{d\Omega} \quad (4.3)$$

- **Radianza** ($L, [W/(sr m^2)]$): è una quantità direzionale che descriverla potenza radiante emessa per l'unità di angolo solido e di area proiettata su un piano normale alla direzione considerata.

$$L = \frac{\partial^2 \Phi_e}{\cos \theta_s \partial A_s \partial \Omega} \quad (4.4)$$

4.1.2 Sorgente lambertiana

Dalla teoria è noto che per una sorgente estesa come un LED, si possono esprimere le caratteristiche della radiazione in termini di radianza. In questo studio si considera un LED senza lente e lo si modella come una *sorgente lambertiana ideale*, cioè una sorgente che emette in modo omogeneo in tutte le direzioni, con una radianza che si propaga in modo uniforme dalla sua superficie.

Si presume che la superficie della sorgente Lambertiana sia normale all'asse ottico. Il LED che prendiamo in esame ha diametro w , distanza h dalla superficie in cui si trova il punto irradiato X , una data potenza radiante Φ_e e un angolo radiante $\theta_{3db} = 60^\circ$ (Fig. 4.1). La sorgente, di area A , ha una radianza costante:

$$L = \frac{\Phi_e}{\pi A} = \text{const}$$

Nell'asse normale che attraversa il centro della sorgente circolare, si ha un'irradianza pari a:

$$E = \frac{\Phi_e}{\pi A} \sin^2 \theta_{\max} \quad (4.5)$$

dove:

$$A = \pi \frac{w^2}{4} \quad \theta_{\max} = \arctan \left(\frac{w}{2h} \right) \quad (4.6)$$

Il massimo valore di irradianza raggiungibile può essere definito come:

$$E = \frac{4\Phi_e}{\pi(4h^2 + w^2)} \quad (4.7)$$

Se il punto irradiato X non è sull'asse della sorgente e fa un angolo Φ al normale, alla densità di flusso si impone un fattore di correzione “coseno alla quarta”. L'irradianza al punto considerato è quindi ottenuta da:

$$E(\phi) = E(0) \cos^4 \phi = \frac{4\Phi_e}{\pi(4h^2 + w^2)} \cos^4 \left(\arctan \left(\frac{r}{h} \right) \right) = \frac{4\Phi_e}{\pi(4h^2 + w^2)} \frac{h^4}{(h^2 + r^2)^2} \quad (4.8)$$

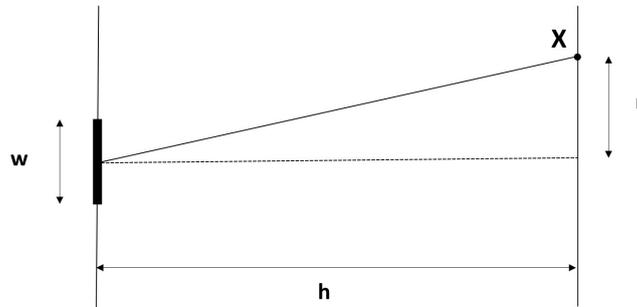


Figura 4.1: Sorgente circolare lambertiana che irradia un piano. w è il diametro della sorgente circolare, h è la distanza tra la sorgente e il piano contenente il punto X , r è la distanza tra il punto X e la normale tra la sorgente e il piano irradiato.

4.2 Simulazione delle configurazioni

Nei seguenti paragrafi verranno presentate una serie di simulazioni effettuate in ambiente Matlab[®] al fine di studiare come le irradianze di diverse combinazioni di sorgenti si sommano tra di loro, e valutare se i valori minimi raggiungibili sono o meno sufficientemente elevati per ottenere delle dosi sufficienti all'abbattimento dell'*E. coli*. I LED considerati sono approssimati con le sorgenti Lambertiane precedentemente descritte.

La prima simulazione, che è solamente introduttiva, viene calcolata la densità di flusso ottenibile da due LED posti su due diversi piani paralleli. Nella seconda simulazione si parte da una semplice combinazione di quattro LED che irradiano una superficie circolare, per poi fare delle considerazioni sulla dose totale ottenibile in casi stazionari o dinamici. Infine, nelle ultime due simulazioni, vengono studiate delle combinazioni di LED posti su una superficie cilindrica.

4.2.1 Due sorgenti in due piani paralleli

In questa prima simulazione sono stati considerati due piani paralleli contenenti ciascuno un LED, uguali tra di loro. In particolare, il primo rivolto verso il basso e il secondo verso l'alto, come mostrato in figura 4.2. Per ridurre la complessità del problema, ai due LED è stata assegnata la stessa coordinata $z = 0$. Sono state considerate tre diverse distanze tra i due piani contenenti i LED: $y = 10$ cm, $y = 5$ cm, $y = 2$ cm, per ciascuno di questi casi, è stata studiata la distribuzione dei valori di irradianza ottenuti.

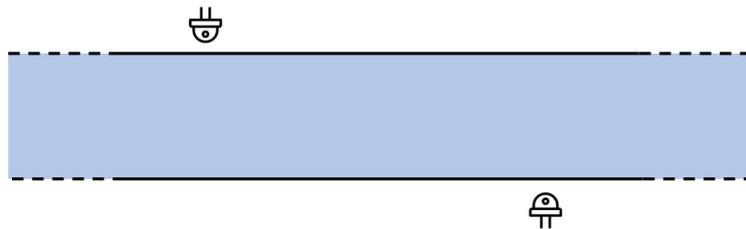


Figura 4.2: Modello con due sorgenti.

Dati:

- Diametro LED (w): 5 mm
- Potenza radiante (Φ): 100 mW
- Coordinate y considerate: $y = 10$ cm, $y = 5$ cm, $y = 2$ cm

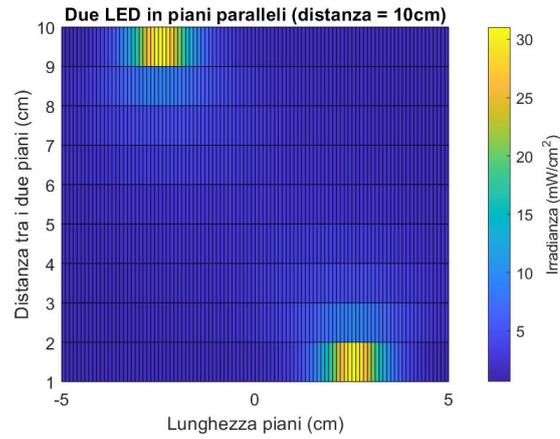
Attraverso l'Eq.4.8 è stato calcolato il valore della densità di potenza dovuta al contributo di entrambe le sorgenti sulla superficie considerata nei tre casi. I

risultati sono stati rappresentati graficamente tramite il “surface plot” riportato in Fig.4.3. Come atteso dalla teoria, è possibile notare che si hanno valori maggiori di irradianza in prossimità delle sorgenti e valori via via decrescenti allontanandosi da esse.

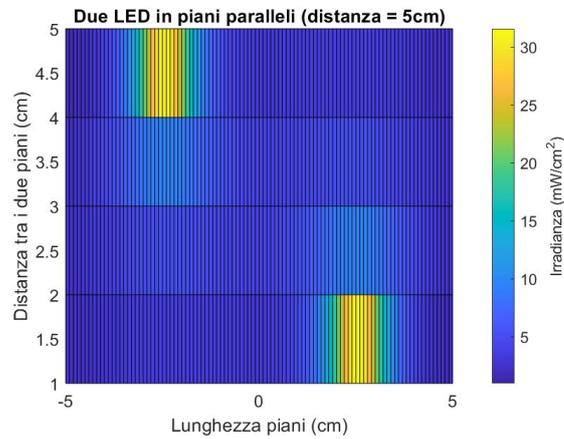
Di seguito sono elencati i valori di irradianza massimi e minimi raggiungibili nei tre casi:

- Per 10 cm la massima E raggiunta è: 31.05 mW/cm^2 e la minima è: 0.65 mW/cm^2 .
- Per 5 cm la massima E raggiunta è: 31.6 mW/cm^2 e la minima è: 0.97 mW/cm^2 .
- Per 2 cm la massima E raggiunta è: 31.8 mW/cm^2 e la minima è: 1.2 mW/cm^2 .

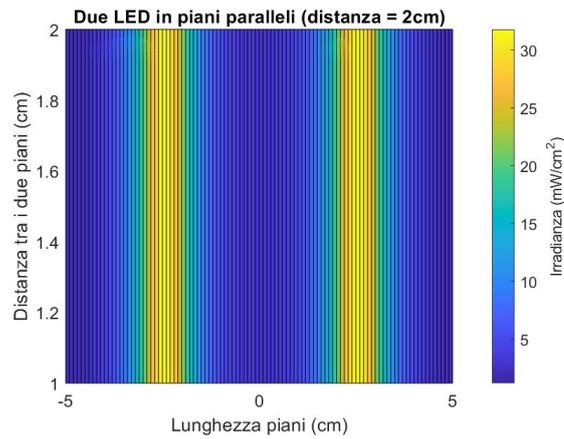
Si può quindi affermare che diminuendo la distanza tra i due piani, i valori minimi e massimi di densità di flusso raggiungibili non subiscono un cambiamento significativo, ciò che varia è l’irradianza totale rispetto alla superficie, che sarà ovviamente maggiore se i LED sono posti in una superficie più piccola.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.3: (a) Surface plot dell'irradianza del modello di due sorgenti poste su due piani distanti 10 cm, (b) Surface plot dell'irradianza del modello di due sorgenti poste su due piani distanti 5 cm, (c) Surface plot dell'irradianza del modello di due sorgenti poste su due piani distanti 2 cm.

4.2.2 Quattro sorgenti intorno a una superficie circolare

In questo caso di studio sono stati considerati quattro LED uguali, posti in modo simmetrico, a due a due, intorno a un cilindro (Fig.4.4).

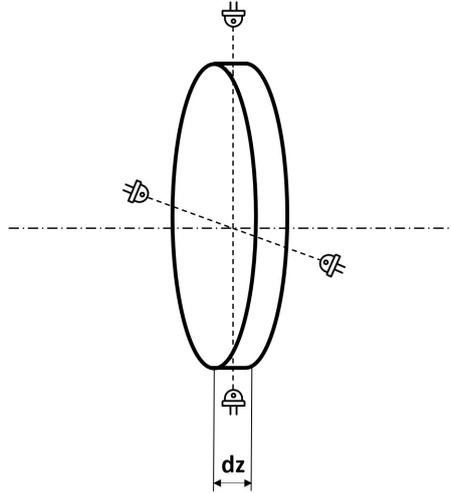


Figura 4.4: Modello con quattro sorgenti attorno ad un cilindro.

Da questa configurazione è possibile ricavare un modello semplificato utile al calcolo della densità di flusso, e di conseguenza della dose, facendo le seguenti approssimazioni:

1. Il volume preso in esame viene considerato molto piccolo ($V(x, y, dz)$), ovvero la sua dimensione z è infinitesima.
2. Il tempo di esposizione dei batteri che attraversano tale volume è anch'esso molto breve.
3. Si può assumere che il profilo di irradianza nel volume considerato sia costante rispetto alla direzione di scorrimento del fluido.

E' quindi possibile prendere in esame il caso semplificato di quattro LED equidistanziati posti intorno ad una superficie circolare (fig. 4.5).

Dati:

- Diametro LED(w): 5 mm
- Potenza radiante (Φ): 100 mW
- Distanza LED-superficie circolare (h): 1 cm - 5 cm (a passi di 1 cm)
- Angoli della superficie circolare (θ) : 0° - 360°

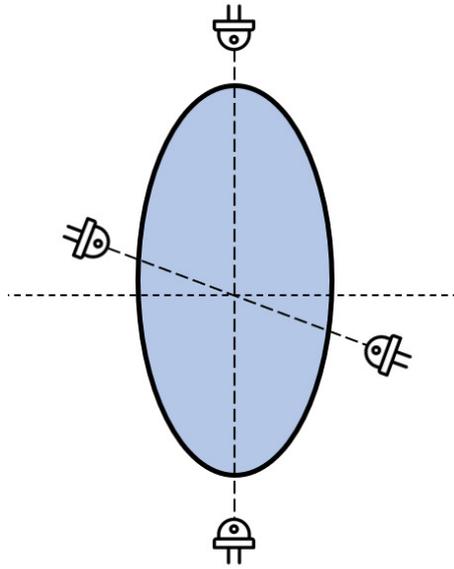


Figura 4.5: Modello con quattro sorgenti attorno ad un piano circolare.

- Raggio cerchio(ro): 0 cm - 2 cm (a passi di 0.1 cm)

Per ogni distanza LED-superficie, utilizzando la formula [4.8](#), sono state ricavate le irradianze totali minime e massime raggiunte al variare del raggio della superficie . I risultati ottenuti sono stati rappresentati graficamente nelle figure seguenti(fig. [4.6](#) e [4.7](#)):

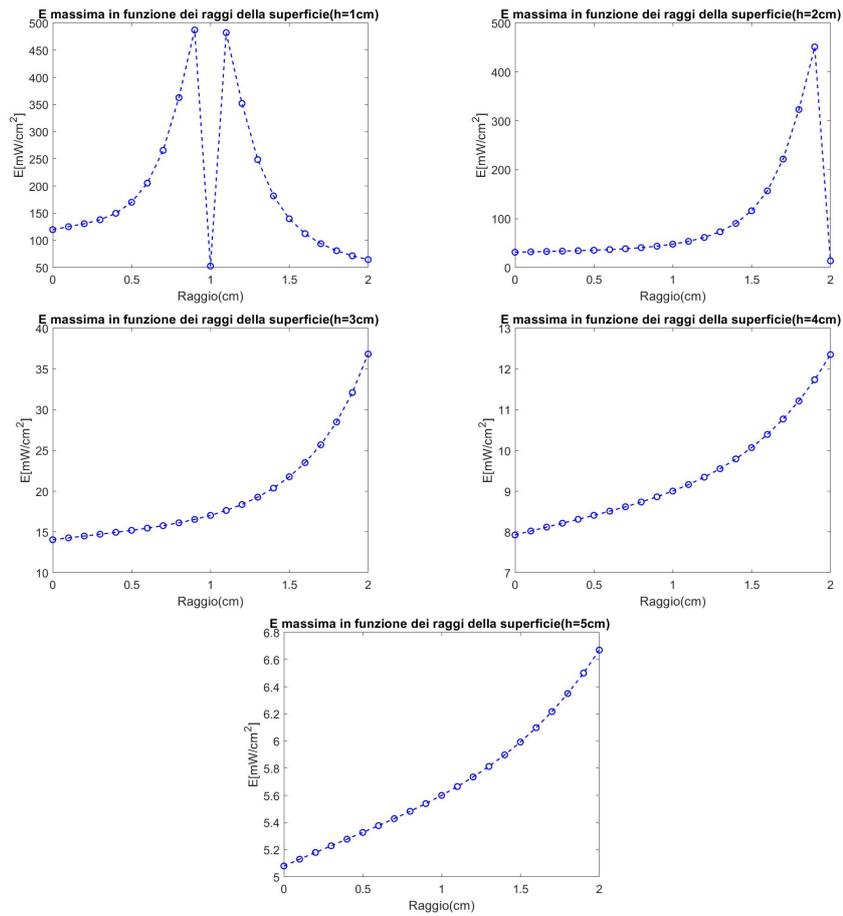


Figura 4.6: Irradianze massime dei quattro LED a diverse distanze LED-superficie in funzione del raggio.

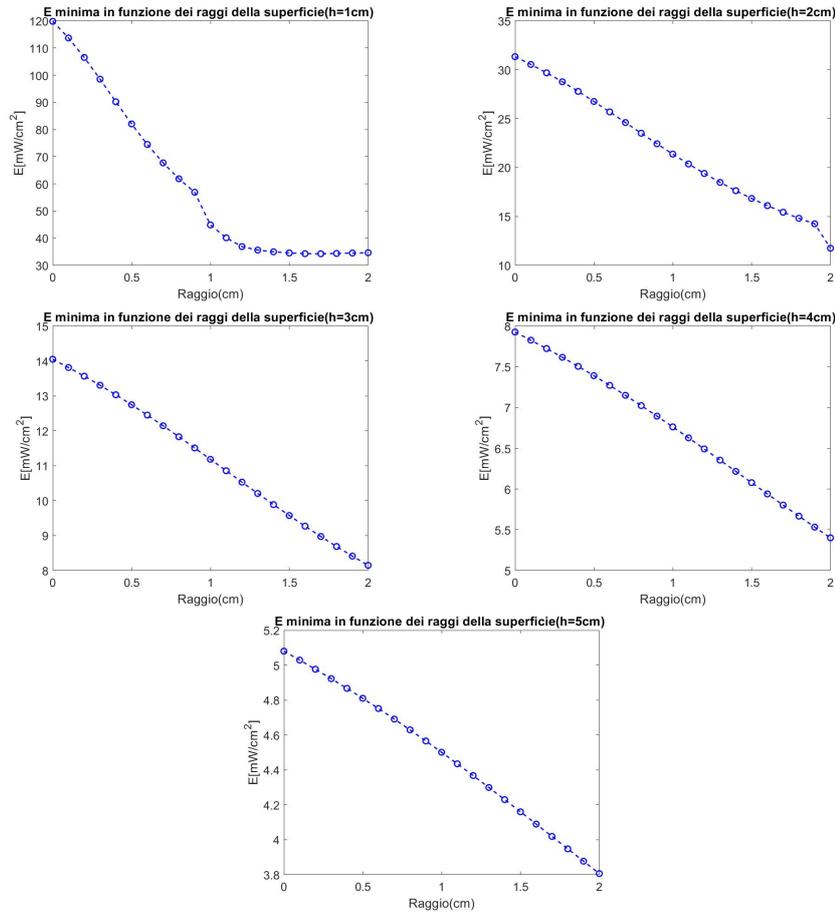


Figura 4.7: Irradianze minime dei quattro LED a diverse distanze LED-superficie in funzione del raggio.

Nelle seguenti tabelle (Tab. 4.1 e 4.2) sono elencati il valore massimo e minimo di densità di flusso che si raggiungono e il corrispettivo raggio per ogni altezza presa in esame.

Tabella 4.1: Massimi valori di E raggiunti per le diverse distanze h .

| h(cm) | $E_{max}(mW/cm^2)$ | r(cm) |
|--------------|--------------------------------------|--------------|
| 1 | 487.3 | 0.9 |
| 2 | 451.21 | 1.9 |
| 3 | 36.84 | 2 |
| 4 | 12.35 | 2 |
| 5 | 6.67 | 2 |

Per una distanza $h = 1$ cm è possibile ottenere un valore di densità di potenza minima pari a $34.27 mW/cm^2$, ovvero l'irradianza maggiore tra i minimi calcolati

Tabella 4.2: Minimi valori di E raggiunti per le diverse distanze h .

| $h(\text{cm})$ | $E_{\text{min}}(\text{mW}/\text{cm}^2)$ | $r(\text{cm})$ |
|----------------|---|----------------|
| 1 | 34.27 | 1.7 |
| 2 | 11.75 | 2 |
| 3 | 8.15 | 2 |
| 4 | 5.4 | 2 |
| 5 | 3.8 | 2 |

per varie distanze. Pertanto, è possibile concludere affermando che, con questa disposizione dei LED, i risultati migliori si ottengono ponendo i LED a una distanza dal centro della superficie irradiata pari a 1 cm.

Date le approssimazioni fatte all'inizio di questa sezione, tale modello semplificato può essere utilizzato per due diversi casi di studio:

1. **Caso stazionario:** Si suppone di dover calcolare il tempo di esposizione ai quattro LED, necessari a sanificare la superficie considerata, imponendo una dose minima necessaria per l'abbattimento dei batteri di interesse (nel caso dell'*E. Coli*, pari a $10 \text{ mJ}/\text{cm}^2$).
2. **Caso dinamico:** Si ipotizza di avere un caso ideale in cui un fluido sta attraversando il volume inizialmente considerato e il profilo della densità di flusso rimane costante lungo tutto il volume rispetto alla direzione di scorrimento. Il prodotto delle irradianze ottenute sulla superficie cilindrica e dei tempi ricavati dalla velocità di transito del liquido, restituisce i valori di dose raggiungibili idealmente, che ovviamente saranno maggiori di quelli ottenibili in una situazione reale; è possibile quindi valutare se le dosi ideali superano il valore minimo di dose necessario per la sanificazione.

4.2.3 Modello di quattro sorgenti su una superficie cilindrica

Il modello studiato in questa simulazione è costituito da quattro LED posizionati a metà di un cilindro cavo e distanziati di 90° tra di loro come in fig.4.8. Facendo riferimento al modello precedente, si ipotizza un caso dinamico in cui una soluzione acquosa contaminata attraversa tale cilindro e viene irradiata contemporaneamente da tutti e quattro i LED.

Dati:

- Diametri LED (w): 5 mm
- Potenza radiante (Φ): 100 mW
- Lunghezza del cilindro (L): 6 cm (a passi di 0.01 cm)
- Raggio del cilindro (r): 3 cm (a passi di 0.1 cm)
- Angolo θ del cilindro: $0^\circ - 360^\circ$ (a passi di 5°)

Al fine di studiare la dose totale che il flusso di acqua subisce al passaggio all'interno del cilindro, è stato sviluppato, anche in questa simulazione, un modello in Matlab[®] ottenendo, per il volume considerato, il valore di irradianza di ogni LED, attraverso l'Eq.4.8 in funzione di tre parametri: raggio, angolo e lunghezza del cilindro. In particolare, per ottenere dei valori abbastanza rappresentativi, ad ogni variazione di lunghezza pari a 0.01 cm del cilindro, sono state considerate delle circonferenze concentriche relative alle sezioni trasversali con dei raggi che partono da una lunghezza di 0.1 cm e aumentano a passi di 0.1 cm fino ad arrivare al raggio del cilindro in esame pari a 3 cm. Ogni 5° di ciascuna circonferenza, sono stati quindi calcolati i valori della densità di flusso relativi a ciascun LED ($E1, E2, E3, E4$) e la loro somma totale. Per ottenere la dose complessiva dovuta ai quattro contributi, la somma delle quattro densità di flusso ricavate per ciascuna sezione è stata integrata lungo tutta la lunghezza del cilindro, ottenendo un'irradianza totale in funzione dell'angolo e del raggio (E_{tot}) (fig.4.9).

Una volta calcolata la densità di flusso totale lungo il cilindro, è stato ipotizzato che il flusso di acqua che ci passa all'interno abbia la stessa portata di un classico rubinetto, pari a $Q = 8 \text{ L/min}$. In seguito, sono stati calcolati i seguenti dati:

- Sezione del cilindro:

$$S = \pi \cdot r^2 \quad (4.9)$$

- Velocità del flusso (cm/s):

$$v = \frac{Q}{S} \quad (4.10)$$

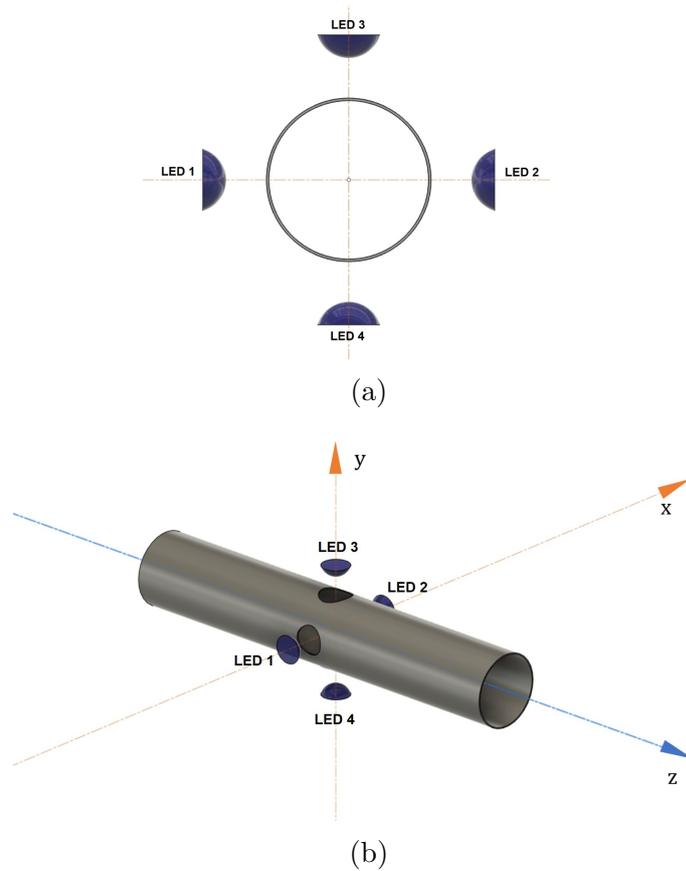


Figura 4.8: (a) Vista frontale del modello cilindrico con 4 LED, (b) Vista laterale del modello cilindrico con 4 LED.

- Tempo di attraversamento del cilindro (s):

$$t = \frac{L}{v} \quad (4.11)$$

- Dose (mJ/cm²):

$$D = E_{tot} \cdot t \quad (4.12)$$

Risultati:

Sono stati di conseguenza ricavati i valori di dose massimi e minimi raggiunti sia grazie al contributo di tutti e quattro i LED che al contributo di diverse combinazioni di LED al fine di valutare le dosi che si possono raggiungere qualora non fossero accesi tutti contemporaneamente. Tenendo presente che il valore di dose minima necessaria per l'abbattimento dell'*E. coli* equivale a circa 10 mJ/cm², si può concludere che per quanto riguarda le dosi massime, come atteso, si ottengono dei valori più che sufficienti per tutte le combinazioni considerate. Per le dosi

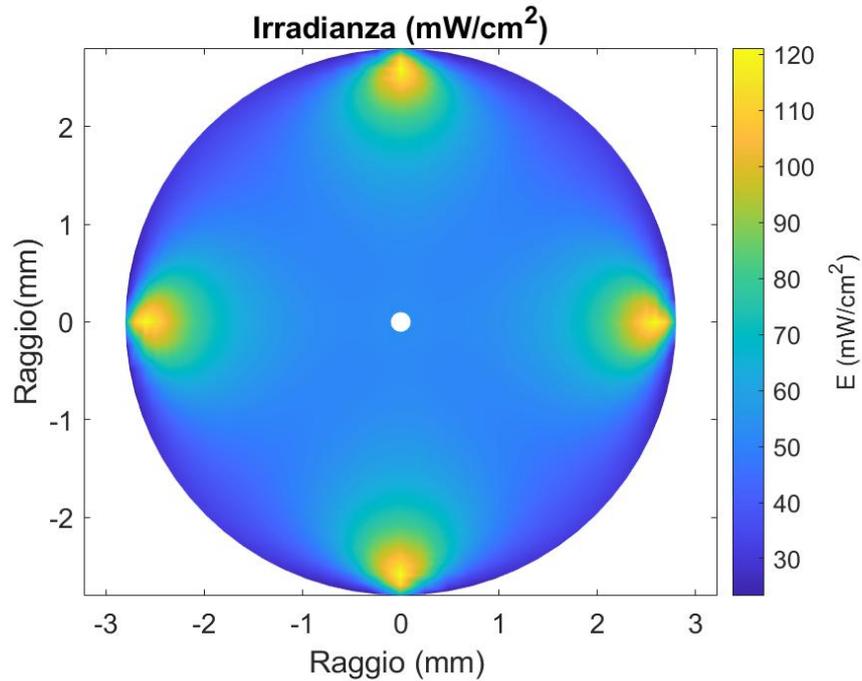


Figura 4.9: Irradianza del modello di quattro sorgenti su una superficie cilindrica.

minime invece, solo nei casi in cui almeno tre LED sono accesi si ottiene dei valori sufficienti. I risultati sono rappresentati in fig. 4.10 e fig. 4.11.

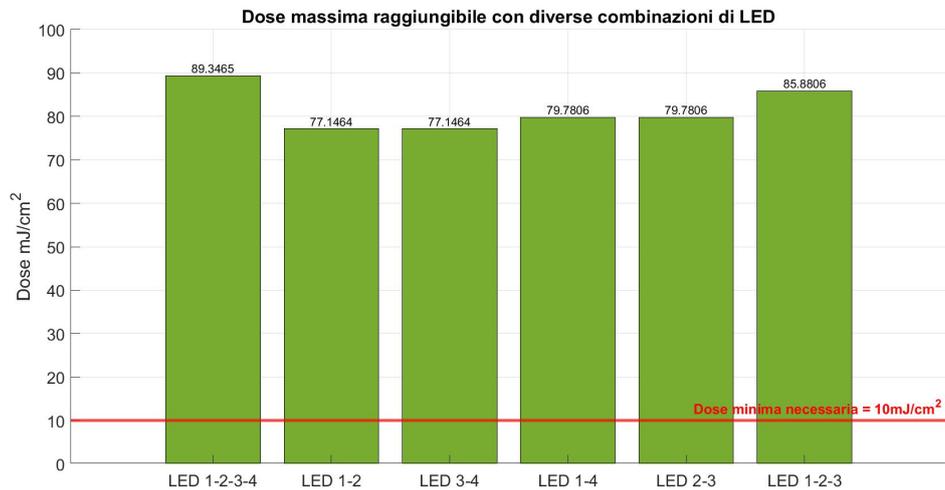


Figura 4.10: Dosi massime raggiungibili tramite il del modello cilindrico con 4 LED.

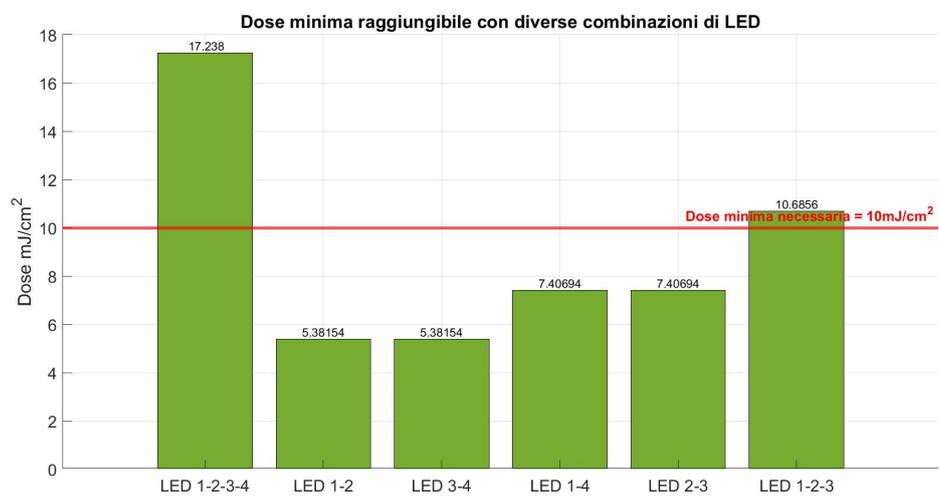


Figura 4.11: Dosi minime raggiungibili tramite il del modello cilindrico con 4 LED.

4.2.4 Modello di tre sorgenti su una superficie cilindrica

Di seguito viene presentato l'ultimo modello studiato, un'evoluzione del modello precedente, in cui invece che quattro, sono considerati tre LED posizionati a metà di un cilindro cavo e distanziati di 120° tra di loro come in fig. 4.12. Anche in questo caso viene ipotizzato una situazione dinamica in cui l'acqua da sanificare passa attraverso il cilindro e viene irradiata contemporaneamente da tutti e tre i LED.

Dati:

- Diametri LED (w): 5 mm
- Potenza radiante (Φ): 100 mW
- Lunghezza del cilindro (L): 8 cm (a passi di 0.01 cm)
- Raggio del cilindro (r) : 2 cm (a passi di 0.1 cm)
- Angolo θ del cilindro: $0^\circ - 360^\circ$ (a passi di 5°)

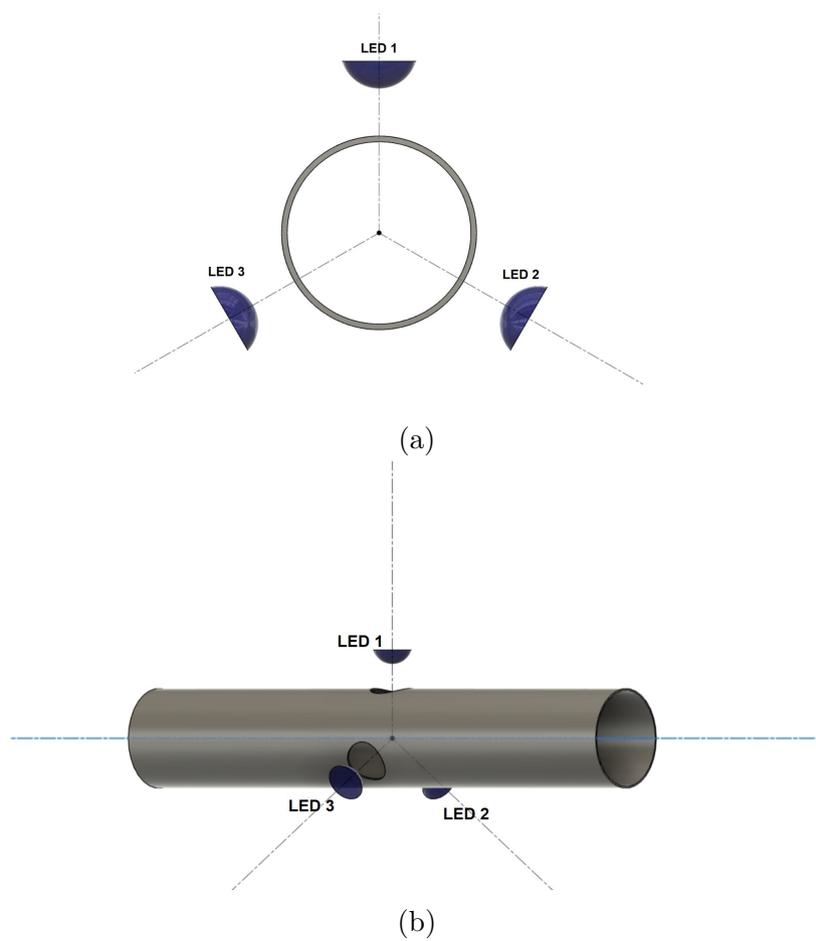


Figura 4.12: (a) Vista frontale del modello cilindrico con 3 LED, (b) Vista laterale del modello cilindrico con 3 LED.

Per il calcolo della dose totale che il flusso di acqua subisce transitando all'interno del cilindro, è stato creato un modello in Matlab[®] facendo le stesse considerazioni e gli stessi calcoli del modello precedente, variando unicamente la lunghezza totale del cilindro, che in questo caso è pari a 8 cm e il raggio, pari a 2 cm. È stato così ricavato il valore dell'irradianza totale in funzione dell'angolo e del raggio del cilindro (E_{tot}) (fig.4.13).

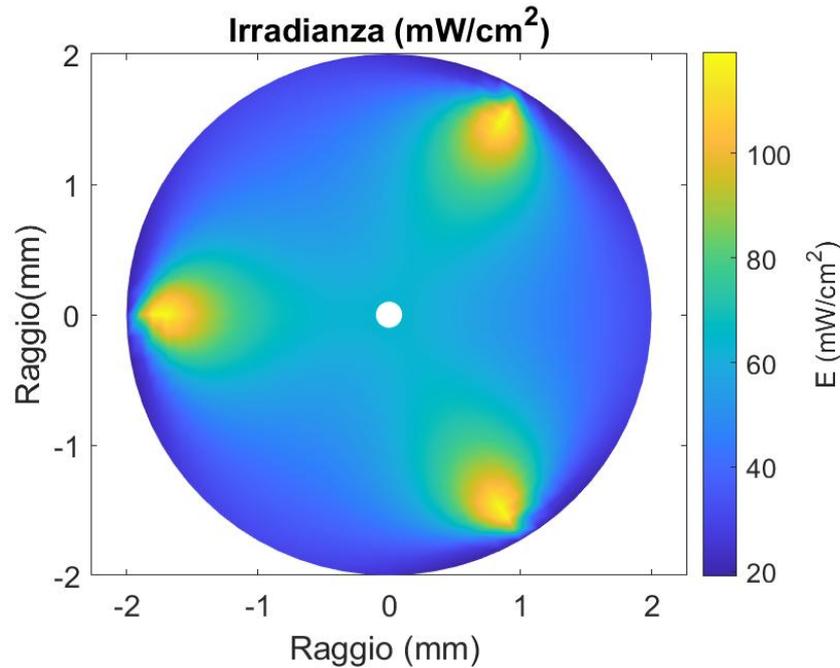


Figura 4.13: Irradianza del modello di tre sorgenti su una superficie cilindrica.

Viene nuovamente ipotizzato che il flusso di acqua che fluisce all'interno del cilindro abbia la stessa portata di un classico rubinetto. In seguito, sono stati ripetuti i seguenti calcoli:

- Sezione del cilindro:

$$S = \pi \cdot r^2 \quad (4.13)$$

- Velocità del flusso (cm/s):

$$v = \frac{Q}{S} \quad (4.14)$$

- Tempo di attraversamento del cilindro (s):

$$t = \frac{L}{v} \quad (4.15)$$

- Dose (mJ/cm²):

$$D = E_{tot} \cdot t \quad (4.16)$$

Risultati: Una volta calcolata la dose per ciascun punto considerato, sono stati ricavati i suoi valori massimi e minimi sia tenendo in conto il contributo di tutti e tre i LED che quello dovuto alle possibili combinazioni di due soli LED, in modo da poter analizzare i valori raggiungibili qualora non fossero tutti accesi. In questo modello studiato, a differenza del modello precedente, si raggiungono dei risultati ottimi in tutti i casi; infatti, sia i valori di dose massima che quelli di dose minima risultano superiori alla minima necessaria per l'abbattimento dell'*E. coli*, come si può vedere in fig. 4.14 e fig. 4.15.

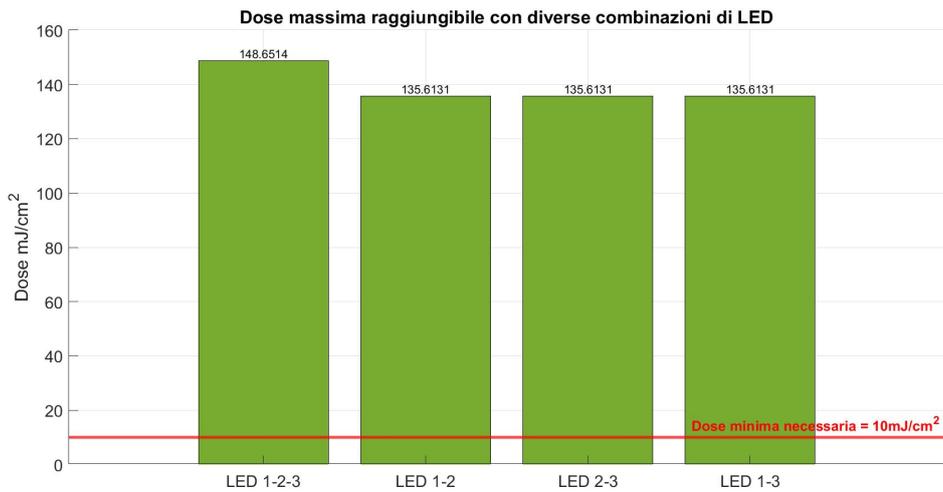


Figura 4.14: Dosi massime raggiungibili tramite il del modello cilindrico con 3 LED.

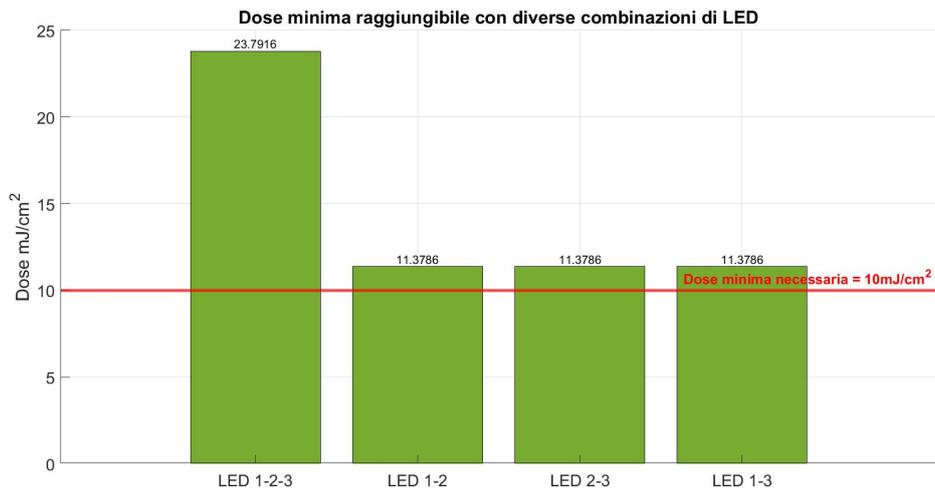


Figura 4.15: Dosi minime raggiungibili tramite il del modello cilindrico con 3 LED.

4.3 Progettazione del prototipo

Dati gli ottimi risultati ottenuti attraverso l'ultima simulazione del modello di cilindro con tre LED, è stato possibile progettare un prototipo di tubo sanificante che seguisse tale modello come mostrato nelle fig. 4.16, fig. 4.17 e fig. 4.18. Il prototipo è stato progettato con lo scopo di verificare i dati ottenuti sperimentalmente.

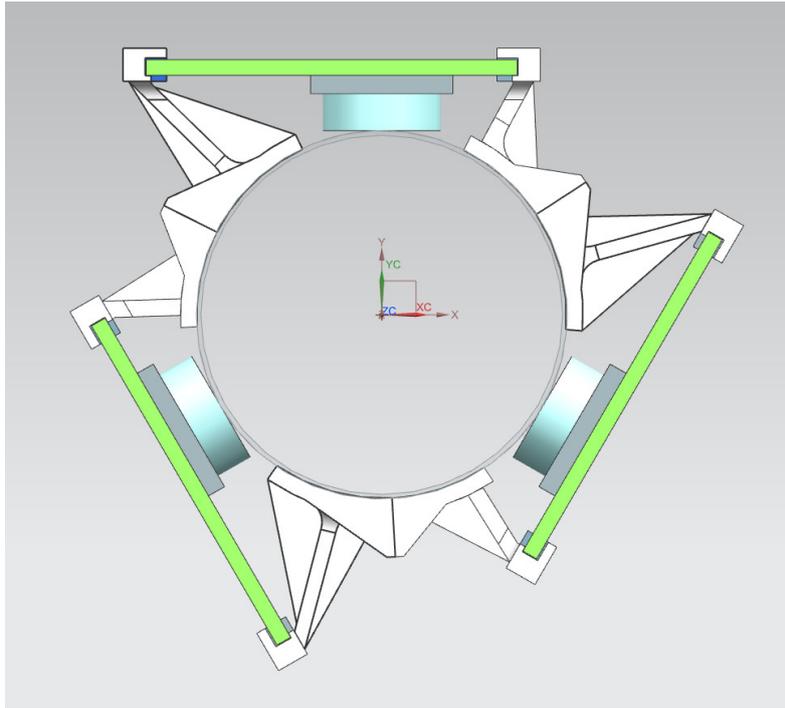


Figura 4.16: Vista frontale del prototipo di tubo sanificante.

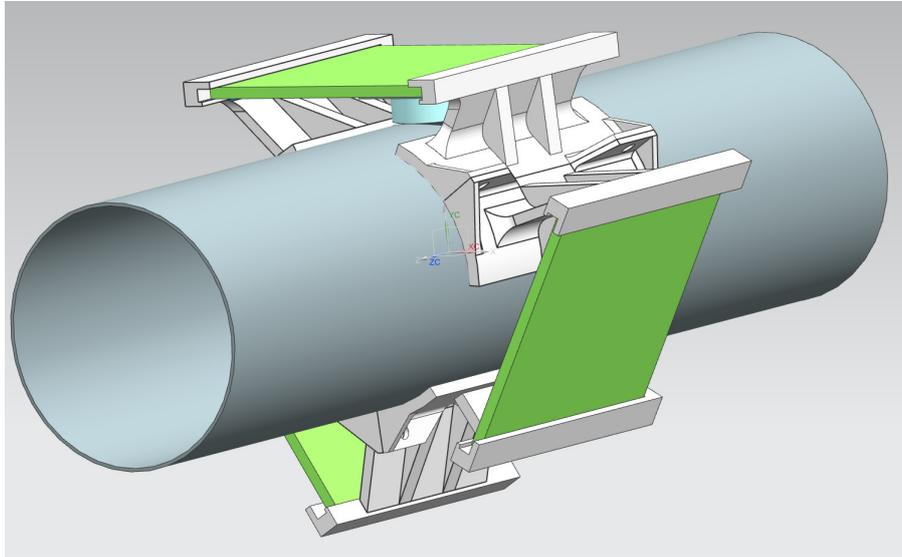


Figura 4.17: Prototipo di tubo sanificante.

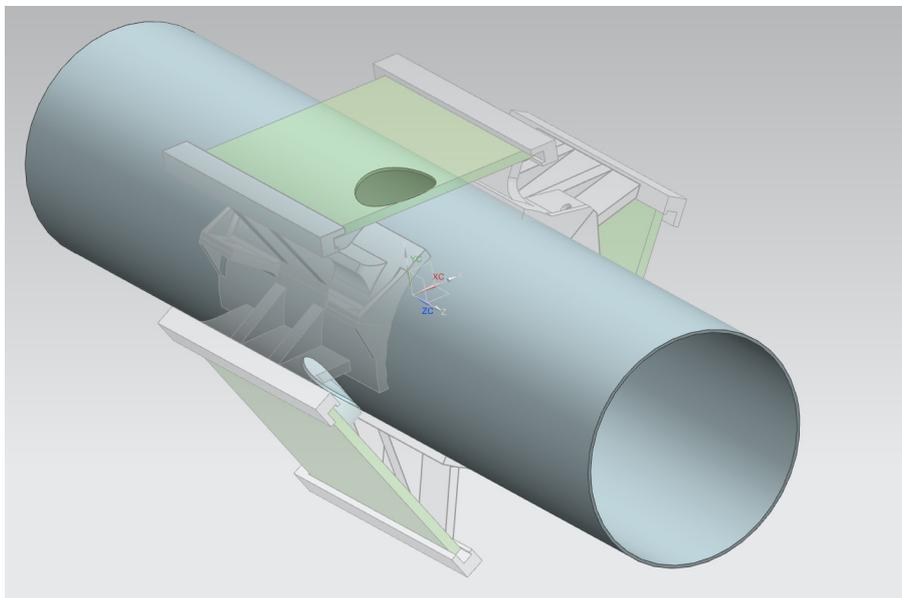
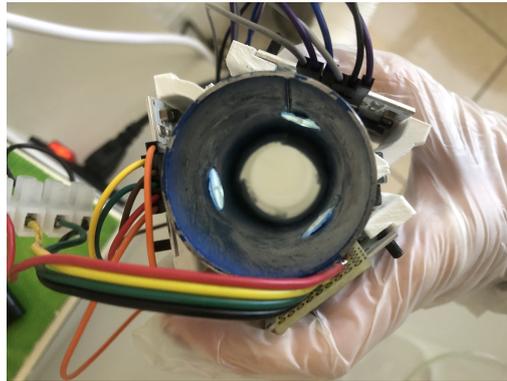


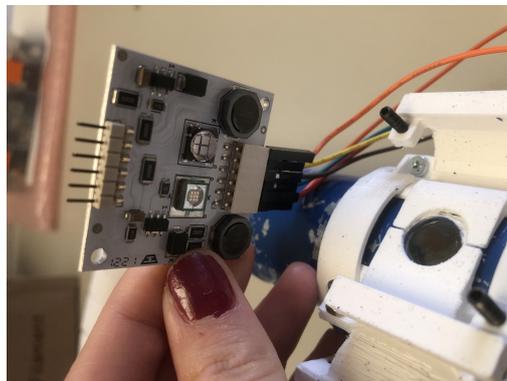
Figura 4.18: Prototipo di tubo sanificante.

Procedimento per la realizzazione del prototipo

Per la realizzazione del prototipo di tubo sanificante, sono stati impiegati dei materiali facilmente reperibili nel laboratorio in cui sono stati svolti gli esperimenti presentati nel Capitolo 3. Un tubo metallico di 8 cm è stato forato a metà lunghezza e sono state applicate delle piccole finestre di quarzo di diametro 12.7 mm, trasparenti alle radiazioni UVC. In seguito, sono state realizzate, tramite stampa 3D, dei supporti per i tre circuiti impiegati (fig. 3.2), in modo da fissare i tre LED UVC in corrispondenza delle finestre di quarzo e sono stati fatti i vari collegamenti elettrici per portare all'alimentatore da 24 V tutti e tre i circuiti.



(a)



(b)

Figura 4.19: (a) Vista frontale del tubo con i LED accesi. (b) Vista del circuito.

4.3.1 Test del prototipo sanificante

Materiale:

- 233 mL di acqua di rubinetto;
- 8 g di feci di gatto;

- 2 Contact slide.

Procedimento

Dopo aver contaminato l'acqua potabile con l'*E. coli*, sono state fatte le seguenti diluizioni:

1. Diluizione 1: 233 mL di acqua contaminata più 2097 mL di acqua del rubinetto (diluizione 1:10).
2. Diluizione 2: 233 mL di acqua della diluizione 1 più 2097 mL di acqua del rubinetto (diluizione 1:100).
3. Diluizione 3: 233 mL di acqua della diluizione 2 più 2097 mL di acqua del rubinetto (diluizione 1:1000).

In seguito, sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

1. E' stata immersa una contact slide nell'acqua contaminata diluita per avere un campione di riferimento.
2. L'acqua contaminata è stata fatta passare all'interno del dispositivo sanificante.
3. L'acqua sanificata è stata raccolta all'interno di un recipiente.
4. Per prelevare un campione sanificato, è stata immersa una contact slide nel recipiente contenente l'acqua sanificata.
5. La contact slide del campione sanificato e quella del campione di riferimento sono state messe in incubazione per 24 h a 37 °C.
6. Una volta finito il tempo di incubazione, è stata valutata la crescita delle colonie batteriche di entrambi i campioni prelevati.

In seguito sono mostrate le contact slide dei campioni analizzati dopo l'incubazione:



Figura 4.20: Sulla sinistra, contact slide di riferimento dell'acqua contaminata. Sulla destra, contact slide del campione sanificato con il prototipo.

Risultati

In fig. 4.21 è riportato il grafico a barre della percentuale di abbattimento batterico raggiunta attraverso un passaggio dell'acqua contaminata all'interno del tubo progettato. È stata ottenuta una percentuale di abbattimento del 98,25%, leggermente inferiore a quella attesa dalla teoria e dagli esperimenti svolti in laboratorio e riportati nel Capitolo 3. Infatti, con una dose maggiore di 10 mJ/cm^2 , l'inattivazione dell'*E. coli* attesa è superiore a 3log, e non 2log come ottenuto da tale prototipo. Tali risultati potrebbero essere dovuti a tanti diversi fattori: ad esempio, i circuiti sui quali i LED sono integrati, non sono perfettamente attaccati alla superficie del tubo, le finestre di quarzo utilizzate potrebbero essersi sporcate in fase di montaggio, non è assicurato che la portata del tubo sia esattamente pari a 8 L/min , e così via.

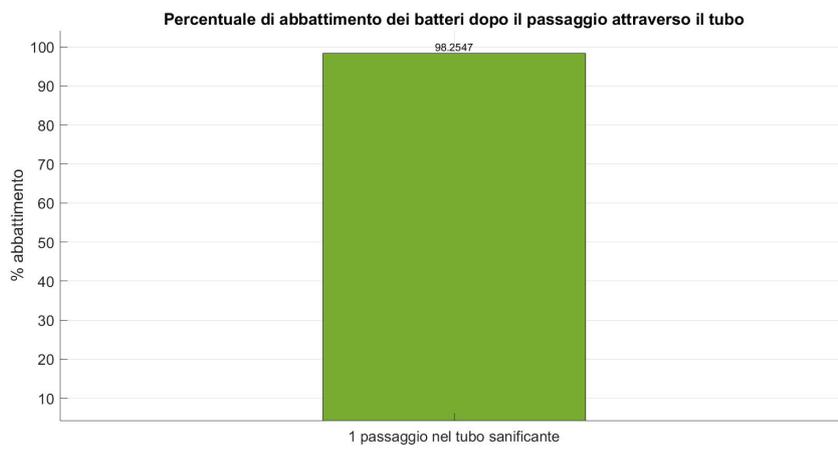


Figura 4.21: Abbattimento batterico ottenuto con il prototipo

Capitolo 5

Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono state studiate principalmente due tecniche innovative basate sull'utilizzo di radiazioni UVC e di radiazioni blu per la disinfezione dell'acqua contaminata dal batterio *E. Coli*. L'obiettivo finale dello studio è stato quello di progettare un dispositivo sanificante per l'acqua da integrare nei comuni rubinetti per potenziare e migliorare le tecnologie di potabilizzazione dell'acqua comuni. Per quanto riguarda il LED UVC (274 nm, 100 mW), dopo un'accurata ricerca bibliografica, è stata presa in esame una dose pari a 10 mJ/cm^2 e sono stati condotti degli esperimenti volti a validare tale la dose ottimale prefissata. Gli esperimenti sono stati svolti sia utilizzando acqua potabile contaminata con feci di gatto (contaminante facilmente reperibile contenente *E. coli*), sia utilizzando del latte vaccino non pastorizzato, nel quale è stata rilevata la numerosa presenza di colonie di *E. coli*. La stessa dose è stata studiata su più campioni variando i tempi di esposizione e la distanza del campione stesso dal LED; inoltre, i test sono stati ripetuti più volte per valutare la ripetibilità dei risultati ottenuti. Per entrambe le soluzioni contaminate considerate, è stato raggiunto un abbattimento batterico medio superiore a 2log per un range da 1 a 5 s. Circa la sanificazione tramite il LED blu (405 nm, 2.4 W), gli studi precedenti non hanno mostrato dei risultati coerenti con delle dosi di abbattimento affidabili, pertanto, gli esperimenti eseguiti tramite il LED blu in questo lavoro, sono volti a cercare una dose sufficiente all'abbattimento dell'*E. coli*. Le soluzioni prese in esame sono tutte composte da acqua potabile e feci di gatto; i risultati sperimentali migliori si sono ottenuti per tempi di esposizione di 30 min, con un abbattimento maggiore di 2log. Dai risultati sperimentali è emerso che il LED blu non si presta bene per applicazioni come quella della progettazione di un tubo sanificante in grado di inattivare i batteri in tempi brevissimi, quindi, nella seconda fase del lavoro, è stato preso in considerazione solamente il LED UVC. In seguito, è stato creato un codice in Matlab[®] per simulare dei modelli fisico-matematici di diverse combinazioni di LED, approssimati a sorgenti lambertiane, al fine di trovare il modello migliore per l'inattivazione batterica. In particolare, per ciascun modello, è stata calcolata la somma delle irradianze di tutti i LED coinvolti. I risultati

migliori sono stati ottenuti per il modello costituito da tre LED posti a metà di un cilindro cavo, a 120° tra loro. Le dosi minime e massime di radiazione raggiungibili con questa configurazione sono superiori a 23.7 mJ/cm^2 e 148.6 mJ/cm^2 rispettivamente. Inoltre, è stato ipotizzato il caso in cui uno dei tre LED non fosse acceso, e sono state comunque ottenute delle dosi superiori a 10 mJ/cm^2 impostata come minima sufficiente in fase sperimentale, ovvero 135.6 mJ/cm^2 di dose massima e 11.4 mJ/cm^2 di dose minima. Il miglior modello ottenuto nelle simulazioni è stato utilizzato per progettare un prototipo di tubo sanificante con tre LED UVC (LA KH120U8F) e una portata di circa 8 L/min , successivamente testato in laboratorio. Circa 2330 mL di acqua contaminata con 8 g di feci di gatto è stata sanificata facendola scorrere attraverso il prototipo costruito, ottenendo un'ottima percentuale di abbattimento batterico, maggiore del 98% con un solo passaggio.

Il lavoro svolto nella tesi ha portato dei risultati molto soddisfacenti, ma con ampi margini di miglioramenti futuri. Nei prossimi studi potrebbero essere studiati altri modelli di combinazioni di LED, valutando l'efficacia e i costi della progettazione di un dispositivo con più LED meno potenti o con meno LED più potenti. Inoltre, svolgere gli esperimenti di inattivazione batterica in un ambiente controllato all'interno di un laboratorio di biologia, con personale esperto, consentirebbe di avere dei dati più precisi e dei risultati più affidabili. Ulteriormente, si può valutare la possibilità di estendere questo studio anche ad altri tipi di batteri, come la *Legionella*, che ancora oggi rimane un grosso problema nelle strutture ospedaliere. Per quanto riguarda l'abbattimento batterico con la radiazione blu, sarebbe necessario approfondire lo studio e valutare, oltre alla sanificazione dell'acqua, altri campi di applicazione, come quello alimentare per una conservazione prolungata degli alimenti.

Bibliografia

- [1] <https://sci4dem.it/cosa-sono-le-radiazioni-ionizzanti>
- [2] <https://www.progettazioneottica.it/leffetto-germicida-della-luce-ultravioletta-risposte-alle-principali-domande/2277>
- [3] <https://acquario.top/lampada-uv-sterilizzatrice-acquario/2/>
- [4] <https://ultraviolet.com/e-coli-is-inactivated-by-germicidal-uv-c-light>
- [5] <https://encyclopedia.pub/entry/6236>
- [6] <https://www.wikihow.it/Eeguire-il-Metodo-delle-Diluizioni-Seriali>
- [7] <https://www.lenntech.com/processes/disinfection/disinfection.htm>
- [8] M. Marra, V. Rafaschieri, R. Bonavita, and D. Como, “Pulire, disinfettare o sterilizzare? procedure e metodi a confronto,” *Annali di igiene*, vol. 21, no. 1, pp. 19–29, 2009.
- [9] R. Iatta and E. Jatta, “Mezzi fisici di sterilizzazione: vantaggi e limiti,” *Annali di igiene*, vol. 21, no. 1, pp. 31–36, 2009.
- [10] <https://www.biosicurezzaweb.net/>
- [11] <https://www.globalgoals.org/goals/>
- [12] <https://www.analisiacqua.org/acqua-destinata-consumo-umano/>
- [13] https://it.wikipedia.org/wiki/Radiazione_elettromagnetica
- [14] R. P. Feynman, *QED: The strange theory of light and matter*, vol. 90. Princeton University Press, 2006.
- [15] <https://www.inail.it/cs/internet/attivita/prevenzione-e-sicurezza/conoscere-il-rischio/agenti-fisici/radiazioni-ionizzanti.html>
- [16] G. Menna, R. Ocone, C. Salierno, F. Salvi, R. Sogni, G. Torri, F. Trotti, C. Zampieri, P. Zeppa, and J. Wells, “Radiazioni ionizzanti,”
- [17] R. F. Laitano, *Fondamenti di dosimetria delle radiazioni ionizzanti*. ENEA, 2011.
- [18] B. L. Diffey, “Sources and measurement of ultraviolet radiation,” *Methods*, vol. 28, no. 1, pp. 4–13, 2002.
- [19] S. S. Nunayon, H. Zhang, and A. C. Lai, “Comparison of disinfection performance of uvc-led and conventional upper-room uvgi systems,” *Indoor Air*, vol. 30, no. 1, pp. 180–191, 2020.

-
- [20] S. Schalk, V. Adam, E. Arnold, K. Brieden, A. Voronov, and H.-D. Witzke, "Uv-lamps for disinfection and advanced oxidation-lamp types, technologies and applications," *IUVA news*, vol. 8, no. 1, pp. 32–37, 2006.
- [21] D.-I. A. Renzel, "Disinfection with uvc," 2016.
- [22] B. Diffey, *Ultraviolet Radiation in Medicine*. IoP, 1982.
- [23] Y. Su, J. Sun, S. Rao, Y. Cai, and Y. Yang, "Photodynamic antimicrobial activity of hypocrellin a," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 103, no. 1, pp. 29–34, 2011.
- [24] S. J. Dean, A. Petty, S. Swift, J. J. McGhee, A. Sharma, S. Shah, and J. P. Craig, "Efficacy and safety assessment of a novel ultraviolet c device for treating corneal bacterial infections," *Clinical & Experimental Ophthalmology*, vol. 39, no. 2, pp. 156–163, 2011.
- [25] R. Yin, T. Dai, P. Avci, A. E. S. Jorge, W. C. de Melo, D. Vecchio, Y.-Y. Huang, A. Gupta, and M. R. Hamblin, "Light based anti-infectives: ultraviolet c irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond," *Current opinion in pharmacology*, vol. 13, no. 5, pp. 731–762, 2013.
- [26] J. Bak, S. D. Ladefoged, M. Tvede, T. Begovic, and A. Gregersen, "Dose requirements for uvc disinfection of catheter biofilms," *Biofouling*, vol. 25, no. 4, pp. 289–296, 2009.
- [27] D.-K. Kim, S.-J. Kim, and D.-H. Kang, "Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength uvc-leds for inactivation of gram positive and gram negative food-borne pathogenic bacteria and yeasts," *Food research international*, vol. 97, pp. 280–287, 2017.
- [28] <https://www.americanairandwater.com/uv-facts/uv-dosage.htm>
- [29] M. M. Kleinpenning, T. Smits, M. H. Frunt, P. E. Van Erp, P. C. Van De Kerkhof, and R. M. Gerritsen, "Clinical and histological effects of blue light on normal skin," *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, vol. 26, no. 1, pp. 16–21, 2010.
- [30] C. Darwin, "The power of movement in plants [ed. new york, 1881]," 1881.
- [31] T. Dai, A. Gupta, C. K. Murray, M. S. Vrahas, G. P. Tegos, and M. R. Hamblin, "Blue light for infectious diseases: Propionibacterium acnes, helicobacter pylori, and beyond?," *Drug Resistance Updates*, vol. 15, no. 4, pp. 223–236, 2012.
- [32] K. T. Tsen, S.-W. D. Tsen, O. F. Sankey, and J. G. Kiang, "Selective inactivation of micro-organisms with near-infrared femtosecond laser pulses," *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 19, no. 47, p. 472201, 2007.
- [33] M. Maclean, S. J. MacGregor, J. G. Anderson, and G. Woolsey, "Inactivation of bacterial pathogens following exposure to light from a 405-nanometer light-emitting diode array," *Applied and environmental microbiology*, vol. 75, no. 7, pp. 1932–1937, 2009.

- [34] M. R. Hamblin and T. Hasan, "Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 3, no. 5, pp. 436–450, 2004.
- [35] A. J. De Lucca, C. Carter-Wientjes, K. A. Williams, and D. Bhatnagar, "Blue light (470 nm) effectively inhibits bacterial and fungal growth," *Letters in applied microbiology*, vol. 55, no. 6, pp. 460–466, 2012.
- [36] J. S. Guffey and J. Wilborn, "In vitro bactericidal effects of 405-nm and 470-nm blue light," *Photomedicine and laser therapy*, vol. 24, no. 6, pp. 684–688, 2006.
- [37] L. E. Murdoch, M. Maclean, E. Endarko, S. J. MacGregor, and J. G. Anderson, "Bactericidal effects of 405 nm light exposure demonstrated by inactivation of escherichia, salmonella, shigella, listeria, and mycobacterium species in liquid suspensions and on exposed surfaces," *The Scientific World Journal*, vol. 2012, 2012.
- [38] R. A. Ganz, J. Viveiros, A. Ahmad, A. Ahmadi, A. Khalil, M. J. Tolckoff, N. S. Nishioka, and M. R. Hamblin, "Helicobacter pylori in patients can be killed by visible light," *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, vol. 36, no. 4, pp. 260–265, 2005.
- [39] H. Ashkenazi, Z. Malik, Y. Harth, and Y. Nitzan, "Eradication of propionibacterium acnes by its endogenous porphyrins after illumination with high intensity blue light," *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 35, no. 1, pp. 17–24, 2003.
- [40] S. E. Bache, M. Maclean, S. J. MacGregor, J. G. Anderson, G. Gettinby, J. E. Coia, and I. Taggart, "Clinical studies of the high-intensity narrow-spectrum light environmental decontamination system (hins-light eds), for continuous disinfection in the burn unit inpatient and outpatient settings," *Burns*, vol. 38, no. 1, pp. 69–76, 2012.