

# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

Dipartimento di Bioscienze

## **DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE XXVII Ciclo**

**2012 - 2014**

### **TRATTAMENTI BIOTECNOLOGICI DELLE ACQUE**

**Docente guida:**

Chiar.mo Prof. Nelson Marmiroli

**Tutor:**

Chiar.ma Prof.ssa Iliana Ferrero

**Coordinatore del dottorato:**

Chiar.mo Prof. Nelson Marmiroli

**Dottorando:**

Dott. Ing. Federico Biffignandi

Abstract	Pag.	3
Riassunto	“	4
1. Premessa	“	6
2. Scopo della ricerca	“	9
3. Lo stato dell’arte sulla disinfezione dell’acqua	“	14
▪ Clorazione	“	15
▪ Cloroammoniazione	“	18
▪ Ozonizzazione	“	18
▪ Attinizzazione	“	19
▪ Raggi gamma	“	21
▪ Processi oligodinamici	“	21
▪ Il metodo SODIS	“	22
4. Ceppi batterici oggetto della sperimentazione	“	27
▪ Coliformi	“	27
▪ Enterococchi fecali	“	28
▪ <i>Escherichia coli</i>	“	28
5. Materiali e metodi	“	30
6. Attività svolta e risultati	“	37
▪ Sperimentazione con luce artificiale (sistema <i>Tonal</i> )	“	38
▪ Sperimentazione con luce solare	“	44
▪ Sperimentazione con luce solare in campo aperto	“	45
▪ Sperimentazione con luce solare in serra	“	46
▪ Sperimentazione con luce artificiale (proiettore a led)	“	49
Sperimentazione su acque prelevate dal territorio	“	52
Sperimentazione su acque reflue da scarico industriale	“	60
Sperimentazione dell'irraggiamento a tempi brevi	“	62
▪ Attività chimico – fisica della luce visibile	“	73
7. Discussione	“	82
8. Conclusioni e prospettive future	“	86
Sigle, abbreviazioni e formule chimiche	“	90
Bibliografia	“	91
Ringraziamenti	“	94

## Abstract

The research has been focused on the study of the photochemical effect of light on bacterial populations, with the objective of identifying the parameters of relevance for the effects.

Initially, with the purpose of developing the system and identifying the experimental conditions for bactericidal activity, experiments were performed with a non pathogenic *Escherichia coli* strain, DH-10B.

The research activities have been focused mainly on the following parameters: irradiation, wavelength, time of exposure, initial bacteria concentration, volume of the sample, depth of the liquid sample. The results obtained indicate that irradiation is the driving force in the process, and beyond a certain threshold makes the time of exposure less relevant.

The results obtained showed that infrared radiation, and the consequent increase in temperature, have no relevant effect on the disinfection, since the same values of bactericidal action were obtained in experiments performed in the open field and in a greenhouse with controlled temperature.

An important feature is that the bactericidal effect has been obtained in the absence of UV radiation, for which the mutagenic effect is well known, and therefore UV light can be substituted by visible light in the appropriate experimental conditions.

Once the experimental conditions had been defined, in order to obtain satisfactory results in laboratory conditions, the experiments have been performed on water samples from the territory of the Parma Province, which contained coliforms, enterococci and *Escherichia coli*. The disinfection activity has been tested in drinking water and waste water.

The results obtained showed that irradiation with artificial light of wavelength between 380 and 760 nanometers causes a decrease in bacterial load of over 90%, with exposure times of 15 minutes. It is highly interesting for possible applications that such a decrease has been obtained with very short periods of exposure.

This work has allowed to establish an approach for disinfection of contaminated waters, by utilising a low impact system. non polluting, with no use of chemical substances or UV light, using simply visible light to obtain a decrease in bacterial load of 90% (reference value for UV disinfection). The application of this approach can be of interest for several end-users, as has been shown through contacts with companies and operators of environmental services. It has to be remarked that a cooperation has been established with Ente Montagna 2000, managing water services for the municipalities of the Parma Appennine mountains.

## Riassunto

Il lavoro di ricerca di dottorato ha avuto come oggetto lo studio dell'effetto fotochimico della luce su popolazioni batteriche con l'obiettivo di individuare i parametri da cui tali effetti dipendevano.

Inizialmente, allo scopo di mettere a punto il sistema e di identificare le condizioni sperimentali in grado di svolgere un'azione antibatterica e in particolare battericida, è stata svolta una sperimentazione utilizzando un ceppo di *Escherichia coli* non patogeno, *Escherichia coli* DH-10B.

La ricerca svolta è stata focalizzata principalmente sui seguenti parametri: illuminamento, lunghezza d'onda, tempo di esposizione, concentrazione batterica iniziale, volume del liquido da depurare e profondità dello stesso. L'insieme dei risultati ottenuti indica che l'illuminamento è il vero "motore" del processo, in grado, oltre determinate soglie, di rendere meno influente anche il tempo di esposizione.

I risultati ottenuti dimostrano che la radiazione infrarossa, e l'aumento della temperatura da essa determinato, non ha un effetto rilevante sul processo depurativo, in quanto gli stessi valori di abbattimento della carica batterica si sono ottenuti in esperimenti condotti in campo aperto e in serra a temperatura controllata.

Un aspetto particolarmente rilevante consiste nel fatto che l'azione battericida è stata ottenuta in assenza di radiazione ultravioletta, la cui azione mutagenica è ben nota, e che, pertanto quest'ultima può essere sostituita a scopi depurativi dalla luce visibile, nelle opportune condizioni sperimentali.

Una volta definite le diverse condizioni sperimentali che davano risultati soddisfacenti in termini di attività antibatterica in esperimenti di laboratorio, si è passati alla sperimentazione su campioni di acque prelevate sul territorio parmense, contenenti coliformi totali, enterococchi fecali ed *Escherichia coli* per investigare l'attività depurativa sulle acque potabili e reflue.

I risultati ottenuti dimostrano che mediante irraggiamento con luce artificiale avente lunghezza d'onda compresa tra 380 e 760 nanometri, si ottiene un abbattimento della carica batterica di oltre il 90% con tempi di trattamento di soli 15 minuti primi. Si considera di potenziale interesse anche per scopi applicativi il fatto tali valori siano stati ottenuti anche in trattamenti effettuati per tempi tanto brevi.

Questa ricerca ha consentito di stabilire un approccio per la disinfezione di acque contaminate con l'utilizzazione di un sistema a basso impatto, non inquinante, senza l'uso né di sostanze chimiche battericide né di raggi UV, arrivando con il solo irraggiamento con luce visibile a superare la percentuale di abbattimento del 90%, valore di riferimento nel trattamento con radiazione ultravioletta. Le applicazioni di un tale approccio possono essere di interesse per diversi utilizzatori, come dimostrato nel corso della esperienza dai contatti presi con aziende e operatori del settore ambientale. Si segnala inoltre la collaborazione diretta con l'Ente Montagna 2000, gestore del ciclo idrico per i Comuni dell'Appennino Parmense con cui è stata svolta parte del lavoro.

## 1. Premessa

Nel corso di una ventennale attività di studio, sperimentazione, progettazione e ricerca precedente l'inizio del presente Dottorato di Ricerca, condotta in modo autonomo nel campo della terapia con la luce (cromoterapia), sono stati progettati e costruiti in qualità di prototipi due dispositivi, finalizzati all'irradiazione di pazienti con luce artificiale e solare, nelle varie frequenze dello spettro visibile, secondo protocolli terapeutici elaborati da medici italiani e stranieri.

I dispositivi sono brevemente descritti e illustrati di seguito.

### ***DISPOSITIVO TONAL***

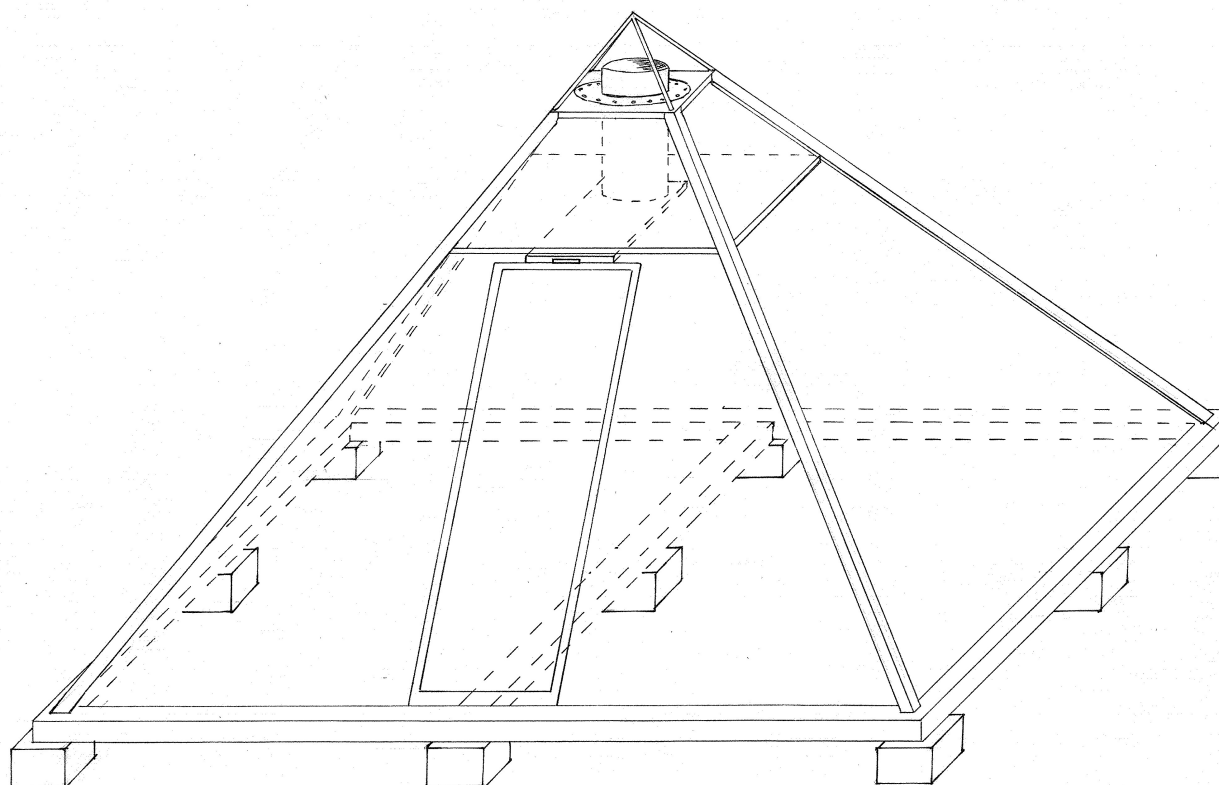


**Figura 1.** Il dispositivo *Tonal*, con proiettore e computer, in funzione.

Il *Tonal* è un proiettore per terapia con la luce che consente di effettuare irradiazione luminosa di diversi colori nella banda delle lunghezze d'onda della luce visibile, comprese tra 380 e 760 nanometri circa (rosso, arancione, giallo, verde, blu, indaco, viola), sul corpo umano o su parti di esso, con l'utilizzo di computer che controlla il videoproiettore tramite un software dedicato.

Il Proiettore per terapia della luce *Tonal* è stato utilizzato come coadiuvante nel trattamento di alcune patologie appartenenti ai campi della reumatologia, della traumatologia, della dermatologia, dei disturbi digestivi, urologici, etc.; inoltre si è riscontrata una certa efficacia in casi di disturbi psicosomatici.

### ***DISPOSITIVO TEOCAL***



**Figura 2.** Rappresentazione schematica del dispositivo *Teocal*

Il *Teocal* è un dispositivo per cromoterapia costituito da un locale di dimensioni  $5 \times 5 \times 3$  m illuminato da luce solare convogliata tramite lucernario tubolare e filtrata da filtri cromatici in vetro, cristallo o materiale sintetico del colore prescelto.

A seguito di queste esperienze ho sperimentato l'irradiazione di acqua potabile con luce avente lunghezza d'onda nella gamma del visibile, riscontrando risultati di interesse in alcuni casi di depressione e colite. In queste esperienze è stato utilizzato il proiettore *Tonal*, affiancando ad esso un terzo dispositivo, di più semplice realizzazione e utilizzo, costituito da portalampada, lampada a led e filtri cromatici di corrente uso fotografico. Campioni di acqua provenienti dall'acquedotto di la Spezia, irradiati col proiettore *Tonal* nella banda di frequenza del blu, vennero analizzati presso il laboratorio dell'ARPAL (Agenzia regionale per l'ambiente della Liguria), riscontrando rispetto a campioni non irradiati modificazioni in parametri quali pH, conduttività elettrica, durezza, concentrazione degli ioni fluoruro, nitrato, solfato, sodio, calcio.

Successive analisi microbiologiche, eseguite da un laboratorio privato di La Spezia su un campione di acqua reflua irradiata nella frequenza del blu, fecero rilevare un abbattimento del 100% per i Coliformi fecali, e del 42-51% per la presenza di Coliformi totali, *Escherichia coli* ed Enterococchi fecali.

Queste premesse hanno dato luogo all'attività universitaria di ricerca condotta nel corso del presente Dottorato, in cui si è studiata l'attività depurativa della luce visibile su diverse tipologie di acque, dall'acqua potabile alle acque reflue.

## 2. Scopo della ricerca

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) segnala che, a causa della mancanza di acqua pulita e sicura, si producono i seguenti effetti:

- 1,2 miliardi di persone non hanno l'accesso ad una fornitura di acqua potabile
- 1,8 milioni di persone muoiono ogni anno per diarrea, la maggior parte essendo costituita da bambini sotto i 5 anni
- la mancanza di acqua pura perpetua lo stato di povertà delle popolazioni
- il 94% dei casi di diarrea sono prevenibili attraverso modificazioni dell'ambiente

I patogeni presenti nell'acqua (waterborne) comprendono diverse forme di vermi, protozoi, funghi, batteri virus e prioni, causa soprattutto di malattie enteriche. A Milwaukee negli USA, l'infezione da *Cryptosporidium parvum* del 1993 che portò alla morte di oltre 100 persone costituì un segnale dello stato di degrado delle infrastrutture per l'acqua potabile e della inadeguatezza dei sistemi di trattamento tradizionali basati solamente sulla rimozione dei patogeni con metodi fisici e chimici [Shannon et al. 2008]. Occorre inoltre considerare che nei casi di disastri naturali ed eventi catastrofici la fornitura di acqua potabile è spesso una delle priorità, indispensabile anche per prevenire la diffusione di malattie nella popolazione colpita. In queste circostanze i normali sistemi di purificazione dell'acqua possono essere disabilitati. Occorre anche ricordare che le riserve idriche e i sistemi di distribuzione dell'acqua potabile rappresentano bersagli potenziali per azioni di terrorismo mediante la contaminazione intenzionale con microrganismi patogeni [Meinhardt 2005].

L'elenco dei contaminanti prioritari da considerare nelle norme e legislazioni, prodotto negli USA nel 2009, comprende i seguenti microrganismi [Richardson e Ternes 2011]:

- Adenovirus: malattie respiratorie e gastrointestinali
- Calicivirus: comprendono Norovirus, causa di malattie gastrointestinali
- *Campylobacter jejuni*: batterio che provoca disturbi gastrointestinali
- Enterovirus: comprendono i poliovirus e altri, causa di malattie respiratorie
- *Escherichia coli* (O157): batterio che produce tossine, provoca disturbi gastrointestinali e blocco renale
- *Helicobacter pylori*: batterio che provoca ulcera e cancro all'apparato digerente
- virus dell'epatite A; causa epatite ed itterizia

- *Legionella pneumophila*: batterio, se inalato provoca malattie ai polmoni
- *Mycobacterium avium*: batterio che causa infezioni ai polmoni
- *Naegleria fowleri*: protozoo che provoca la meningoencefalite amebica
- *Salmonella enterica*: batterio che provoca disturbi gastrointestinali
- *Shigella sonnei*: batterio che provoca disturbi gastrointestinali e diarrea

L'utilizzo della luce, solare o artificiale, per la disinfezione e la potabilizzazione dell'acqua potrebbe costituire un importante contributo ai trattamenti delle acque in paesi in via di sviluppo e in condizioni di emergenza, per soddisfare criteri di economicità, facilità d'impiego e sostenibilità. La filtrazione delle acque e l'aggiunta di sostanze chimiche, come nei trattamenti con cloro, possono avere costi elevati, richiedere personale specializzato, ridurre la sostenibilità e aumentare gli impatti ambientali. L'uso di sostanze chimiche può inoltre produrre prodotti secondari delle reazioni chimiche con sostanze organiche, bromuri o ioduri (DBP, disinfection by-products) potenzialmente mutageni o cancerogeni [Li et al. 1996; Zoeteman et al. 1982]. I trattamenti basati sull'uso della luce potrebbero quindi essere una soluzione efficiente da applicare anche nelle condizioni più svantaggiate, oltre che in situazioni di crisi ed emergenza dovute a disastri naturali [Loo et al. 2012].

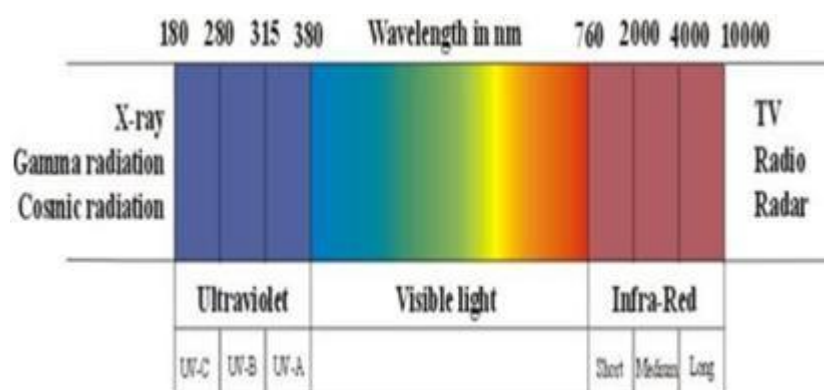
Anche nei paesi più industrializzati si cerca l'impiego di sistemi più naturali per la produzione di acqua potabile, senza ricorrere a sostanze chimiche aggressive come cloro, ammoniaca, ozono e altro

Nonostante l'utilizzo della luce solare per la purificazione dell'acqua fosse una pratica tradizionale in alcune culture, una iniziale ricerca bibliografica ha riscontrato nella letteratura scientifica e tecnica limitati riferimenti alle attività antibatterica, antivirale e antifungina operate dalla luce visibile, anche prodotta artificialmente tramite lampade [Legrini et al. 1993; Andreozzi et al. 1999; Shannon et al. 2008]. L'attività antibatterica viene nella maggior parte dei casi attribuita all'azione della radiazione ultravioletta, come nelle lampade a vapori di mercurio di impiego consolidato, oppure all'attività della luce solare nella banda dell'infrarosso e dell'ultravioletto come nel metodo SODIS – Solar Disinfection [<http://www.sodis.ch>]. Questo metodo (che sarà descritto in dettaglio successivamente) è impiegato soprattutto nei paesi in via di sviluppo e consiste nell'espore al sole per alcune ore acqua contenuta in recipienti di PET (polietilene tereftalato). L'attività di potabilizzazione dell'acqua così ottenuta non è attribuita alla radiazione visibile, ma alle radiazioni infrarosse e

UV-A, comprese nella banda di frequenze della luce solare. L'efficacia della radiazione infrarossa è comprovata dal fatto che la temperatura dell'acqua, nelle bottiglie esposte al sole, raggiunge spesso i 50°C [McGuigan et al. 2012].

Per quanto concerne l'impiego della radiazione ultravioletta per l'inattivazione dei virus e altri organismi, è prospettato l'uso concomitante di materiali fotocatalitici come il diossido di titanio reso operante dai raggi UV a circa 385 nm di lunghezza d'onda [Foster et al. 2011].

L'attuale livello di conoscenza scientifica e il relativo sviluppo della tecnica identificano la luce UV come la principale radiazione in grado di svolgere attività germicida con livelli accettabili di efficienza ed efficacia, applicata anche in campo medico e industriale. Al confronto, i raggi gamma sono ancora un'alternativa studiata e praticata in modo marginale rispetto ai raggi UV. Le lunghezze d'onda più efficaci sono tra 200 e 280 nm, radiazioni UV-C, particolarmente efficace a 254 nm (Figura 3). La lunghezza d'onda di massimo assorbimento del DNA essendo di 260 nm, la radiazione UV-C di 254 nm risulta molto prossimo ad essa, e quindi particolarmente efficace.



**Figura 3.** Spettro delle radiazioni elettromagnetiche

L'idea di studiare gli effetti antibatterici della radiazione luminosa nella banda del visibile, raramente ipotizzati nella letteratura del settore, è giustificata dalla precedente attività di studio e ricerca nel campo della terapia della luce (si veda "Premessa"), in cui si era riscontrata un'attività di contrasto alla colite derivante dall'assunzione di acqua potabile irradiata con luce blu. Ciò portò ad effettuare le analisi chimico-fisiche e microbiologiche citate, che hanno fornito una oggettiva motivazione per proseguire.

Pertanto l'attività di ricerca del presente dottorato è stata dedicata all'utilizzo della luce solare ed artificiale, avente lunghezza d'onda compresa tra 380 e 760 nm circa, per investigarne l'attività depurativa sulle acque potabili e reflue.

Irradiare luce visibile sull'acqua significa operare nell'ambito della fotochimica, che studia le reazioni chimiche prodotte dall'interazione della luce con la materia. Tra i settori investigati dalla fotochimica è opportuno citare la fotosintesi clorofilliana, in cui le piante formano amido e ossigeno partendo dall'acqua e dall'anidride carbonica grazie ai processi della luce sulla clorofilla, la biosintesi della vitamina D, molte reazioni redox, i processi di catalisi che avvengono quando la luce impressiona una pellicola fotografica oppure quando i tessuti scuri vengono sbiaditi dalla luce del sole, etc.

Nel corso del presente lavoro sono stati dunque investigati diversi aspetti del trattamento delle acque, tramite irradiazioni con diversi valori di illuminamento, con diverse lunghezze d'onda nella banda della luce visibile e con diverse esposizioni temporali:

- la risposta microbiologica di campioni d'acqua – sia potabile che reflua - contenenti diversi ceppi batterici quali *Escherichia coli*, Coliformi totali, Enterococchi fecali, in varie dosi iniziali, al fine di verificarne la riduzione nella concentrazione batterica;
- la risposta chimico-fisica di campioni d'acqua potabile.

La sperimentazione relativa alla risposta microbiologica ha mantenuto, come riferimento teorico, il seguente modello matematico, con l'obiettivo di verificarne la rispondenza col metodo sperimentale, e, possibilmente, tararne i parametri.

$$\text{fattore di riduzione RID\%} = K \cdot I \cdot t \cdot f / V$$

dove

- K = costante che dipende dalla tipologia del ceppo batterico (da determinare)
- I = intensità del flusso luminoso [lumen]
- t = tempo di esposizione [minuti]
- f = frequenza della luce visibile [Hz]
- V = volume del liquido [litri]
- RID% = [(concentrazione pre-irradiazione del ceppo batterico – concentrazione post-irradiazione) / concentrazione pre-irradiazione] • 100

- $0 \leq \text{RID}\% \leq 100\%$  (per  $\text{RID}\% = 0$  : risposta nulla ; per  $\text{RID}\% = 100\%$  : risposta max)

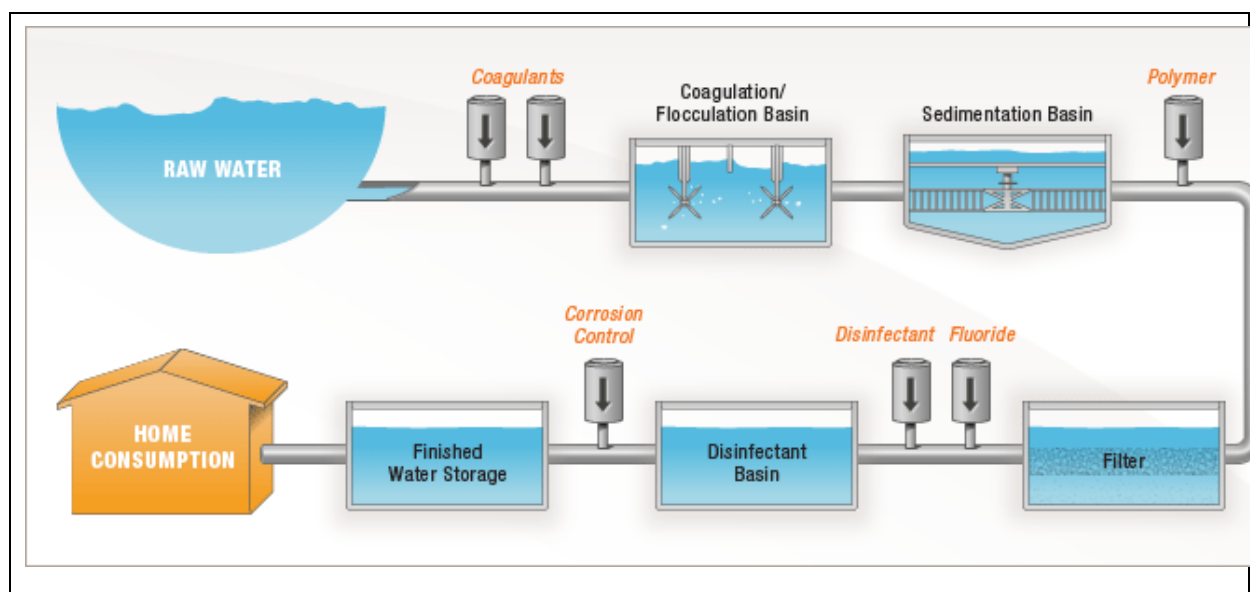
$\text{RID}\%$  tende al 100% per valori di:  $I \geq \text{sogliaI}$ ;  $t \geq \text{sogliaI}$ ;  $f \geq \text{sogliaf}$ ;  $V \leq \text{sogliaV}$

essendo

- $\text{sogliaI}$  = valore dell'intensità del flusso luminoso al di sotto del quale il processo non ha inizio (da determinare a seguito dei risultati sperimentali)
- $\text{sogliaI}$  = valore del tempo di irradiazione al di sotto del quale il processo non ha inizio (da determinare a seguito dei risultati sperimentali)
- $\text{sogliaf}$  = valore di frequenza della luce irradiante al di sotto del quale il processo non ha inizio (si ipotizza che:  $\text{sogliaf} \geq 395 \times 10^{12}$  Hz, corrispondente a 760 nm, lunghezza d'onda del rosso, sebbene valori significativi possano essere osservato nelle frequenze del verde verso il viola)
- $\text{sogliaV}$  = valore max trattabile del volume del liquido (da determinare a seguito dei risultati sperimentali)

### 3. Lo stato dell'arte sulla disinfezione dell'acqua

I procedimenti di disinfezione hanno la funzione di eliminare i microrganismi patogeni presenti nell'acqua. Questi trattamenti sono presenti, in particolare, nella potabilizzazione delle acque superficiali o trattate in apparecchiature all'aperto [[http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/information\\_en.html](http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/information_en.html)]. Il trattamento di disinfezione è posto a valle di tutto il ciclo di potabilizzazione (Figura 4).



**Figura 4.** Rappresentazione schematica del trattamento di potabilizzazione delle acque per il consumo umano.

Nel caso di acque superficiali vengono effettuati:

- una disinfezione iniziale (a valle dei trattamenti fisici semplici), con i seguenti obiettivi:
  - evitare la proliferazione di alghe e microrganismi dannosi per i successivi trattamenti; si utilizzano solitamente l'ozono e il biossido di cloro, mentre non sono adatti l'ipoclorito e il cloro gassoso poiché formano prodotti pericolosi (trialometani, THM);
  - ossidare i composti inorganici come ferro, manganese, ammoniaca;
- una disinfezione finale (a valle dell'ultimo trattamento, ad esempio dopo la clorazione), per abbattere i microrganismi residui e garantire la potabilità dell'acqua fino ai rubinetti delle singole utenze (persistenza); si usano l'ozonizzazione o

l'irraggiamento con i raggi ultravioletti, seguiti da acido ipocloroso per la persistenza, con dosaggi proporzionali al percorso dell'acqua fino alle utenze. Si possono anche utilizzare solo biossido di cloro o acido ipocloroso. I trattamenti normalmente impiegati sono:

trattamenti chimici:

- clorazione;
- cloro-ammoniazione;
- ozonizzazione;

trattamenti fisici:

- irraggiamento con raggi ultravioletti (UV-C) o attinizzazione;
- raggi gamma;
- processi oligodinamici;
- metodo SO.DIS.

La disinfezione viene sempre impiegata anche negli impianti di depurazione, benché con scopi diversi; infatti, nel trattamento delle acque reflue la disinfezione serve a ridurre la carica batterica entro i limiti richiesti dalla normativa vigente al fine di mantenere gli standard qualitativi del corpo ricettore (mare, fiumi, laghi, suolo).

### **Clorazione**

È il trattamento di disinfezione più diffuso, che garantisce l'igienicità dell'acqua per tutto il suo percorso fino all'utenza, ma può generare sottoprodotti tossici e modifica il sapore dell'acqua.

#### Azione disinfettante della clorazione

L'azione battericida è svolta dal cloro e dai suoi derivati (ipocloriti e biossido di cloro) [Junli et al. 1997]. Tale azione si esplica come azione ossidante e tossica sulle cellule e soprattutto come azione inibitrice dei processi enzimatici; l'azione ossidante è importante per la distruzione dei virus mentre l'azione tossica ed inibitrice inibisce il blocco del metabolismo dei batteri. Tuttavia il cloro è inadatto all'inattivazione di spore batteriche e protozoi, per cui sono più efficaci l'ozonizzazione, l'attinizzazione e la filtrazione su membrana.

Perché la clorazione risulti efficace è necessario che l'acqua presenti bassa torbidità, in modo da evitare che i microrganismi si aggregino alle particelle sospese, sottraendosi all'azione disinfettante.

L'agente disinfettante è l'acido ipocloroso ( $\text{HClO}$ ), che si ottiene sciogliendo il clorogas o gli ipocloriti in acqua e ottenendo ione clorito o ipoclorite ( $\text{ClO}^-$ ). L'azione disinfettante del clorogas e degli ipocloriti è fortemente influenzata dal pH.

#### Azione ossidante della clorazione

Il clorogas e gli ipocloriti sono adatti all'ossidazione di sostanze inorganiche come ferro, manganese, solfato, solfito, nitrito, ecc. Ma il cloro non è adatto all'ossidazione dei composti organici, perché questi danno origine a sottoprodotti clorati, potenzialmente più pericolosi delle sostanze da cui derivano (es. trialometani) [Li et al. 1996]. La presenza di fenoli può dare luogo ai clorofenoli, che alterano il sapore e l'odore dell'acqua.

Il biossido di cloro oltre al ferro ossida efficacemente anche il manganese: ferro e manganese vengono trasformati in ossidi insolubili eliminabili con la filtrazione. Non forma trialometani.

#### Dosaggio della clorazione

Per “clororichiesta” si intende la quantità necessaria di cloro per una completa potabilizzazione dell'acqua. Il cloro viene aggiunto all'acqua fino a che sia soddisfatta la domanda di cloro presentata dalle sostanze organiche disciolte, tutta l'ammoniaca presente sia stata ossidata e rimanga in soluzione un residuo di cloro libero. Si raggiunge il “punto di viraggio o punto di rottura” quando il tenore di cloro libero presente nell'acqua aumenta proporzionalmente alla dose di cloro introdotta.

La presenza nell'acqua di cloro libero è importante per rendere l'acqua batteriologicamente pura fino al rubinetto delle utenze, prevenendo inquinamenti accidentali lungo il percorso dell'acqua. Tuttavia è possibile che dosaggi eccessivi conferiscano all'acqua sapore e odore sgradevoli dovuti al cloro o ai clorofenoli, con rischi per l'apparato digerente degli utenti. Per immettere cloro si usano i “cloratori”, cioè pompe dosatrici di cloro.

#### Cloro gassoso

Il cloro gassoso è molto aggressivo e corrosivo, e può essere aggiunto tal quale o in soluzione: acqua di cloro ottenuta dalla dissoluzione di cloro in acqua.

Il cloro gassoso può formare i trialometani (THM) e gli acidi aloacetici (HAAs). E' poco adatto per i piccoli acquedotti a causa della sua difficile manipolazione.

#### Ipocloriti

Si utilizzano usualmente ipocloriti di sodio, di calcio e di potassio. Come il cloro gassoso, l'ipoclorito può formare trialometani (THM) e acidi aloacetici.

## Biossido di cloro

Il biossido di cloro è molto instabile e di difficile formazione; viene prodotto in appositi reattori e presenta, rispetto al cloro, i seguenti vantaggi:

- ha un potere ossidante maggiore del cloro;
- ha il vantaggio di non formare trialometani e acidi aloacetici;
- agisce efficacemente contro batteri, virus e spore che il cloro non riesce ad eliminare;
- l'effetto sulle spore e sui virus del biossido di cloro è molto elevato rispetto ad una concentrazione uguale di cloro;
- è più efficace del clorogas per l'inattivazione del *Cryptosporidium parvum* (un protozoo che infetta un'ampia varietà di vertebrati, tra cui l'uomo, provocando enterite acuta) che con il clorogas si controlla solo ad alti dosaggi;
- non ha una reazione con l'ammonio o con suoi leganti, mentre il cloro reagisce con l'ammonio e crea ammidi di cloro che hanno un effetto negativo per la disinfezione dell'acqua potabile;
- non ha l'odore tipico del cloro;
- la sua reattività non dipende dal pH dell'acqua.

Il clorito di sodio ( $\text{NaClO}_2$ ) che non ha reagito potrebbe formare cloriti o clorati, che sono potenti agenti mutageni [Zoeteman et al. 1982].

## Tecniche di clorazione

Le tecniche solitamente impiegate sono:

- la preclorazione;
- la super clorazione;
- la clorazione frazionata;
- la postclorazione o clorazione standard.

### Preclorazione

Prevede l'aggiunta di cloro a monte della filtrazione (trattamento di chiariflocculazione) in quantità tale che non si abbia cloro residuo a valle del filtro. E' opportuno che sia seguita sempre da una postclorazione per garantire la potabilità dell'acqua prodotta.

### Superclorazione

Prevede l'aggiunta occasionale di cloro ad alte concentrazioni (o in un punto del ciclo di potabilizzazione - di regola dopo la filtrazione - o frazionata in più punti dell'impianto) al fine

della rimozione degli odori e dei sapori. Per rimuovere l'eccesso di cloro che rimane nell'acqua si effettua una dechlorazione.

#### Clorazione frazionata

Prevede l'aggiunta di cloro ad alte concentrazioni in due punti distinti dell'impianto, per ridurre la carica batterica, controllare la crescita delle alghe sui filtri e ridurre sapore e odore.

#### Postclorazione

Prevede l'aggiunta di cloro a valle della filtrazione (trattamento di chiarifloc-colazione). In questo caso la quantità di cloro è minima, essendo già stata abbattuta la quasi totalità delle sostanze organiche presenti nell'acqua, pertanto l'azione del cloro si concentra solo sulla flora batterica presente. Come disinfettante viene frequentemente preferito l'ipoclorito di sodio.

### **Cloroammoniazione**

La cloroammoniazione sfrutta l'azione battericida delle clorammine prodotte dall'ammoniaca e dal cloro aggiunto separatamente all'acqua. L'acido ipocloroso, che si forma per aggiunta di cloro nell'acqua, si combina con l'azoto ammoniacale formando mono e diclorammine. Non produce quantità significanti di trihalometani.

### **Ozonizzazione**

L'ozonizzazione è una tecnica di disinfezione delle acque che impiega ozono ( $O_3$ ) [Andreozzi et al. 1999; Kasprzyk-Hordern et al. 2003]. L'azione ossidante dell'ozono avviene in due modi: direttamente tramite  $O_3$  (selettiva) e attraverso il radicale ossidrile (OH) di formazione secondaria.

#### Vantaggi e svantaggi dell'ozonizzazione

L'ozono rispetto al cloro:

- ha una maggiore efficacia nei confronti di batteri e virus, e, a dosi elevate, anche nei confronti dei protozoi;
- non determina l'insorgere di cattivi odori e sapori;
- se l'ozonizzazione è ben eseguita garantisce una quantità molto ridotta di sottoprodotti pericolosi per la salute umana:

Inoltre l'utilizzo dell'ozono porta all'ossidazione e alla conseguente rimozione delle sostanze inorganiche presenti nell'acqua, come il ferro, il manganese, il cianuro, l'arsenico, alla distruzione di diversi microinquinanti organici - come fitofarmaci, fenoli e detergenti - in maniera più efficace del cloro, essendo più attivo nella demolizione di molecole complesse. Però l'ozono ha un costo elevato, e, avendo un decadimento rapido, non consente una copertura igienica dell'acqua fino all'utenza; pertanto non può essere l'unico trattamento di disinfezione. Infine, in presenza di acque contenenti bromuri dà origine a bromati che rientrano tra i sottoprodotti della disinfezione [von Gunten e Hoigné 1994].

### Impiego dell'ozono

L'ozono, essendo instabile e non potendo essere stoccato e trasportato, deve essere prodotto nel luogo di trattamento mediante ozonizzatore. L'azione disinfettante dell'ozono risulta dall'ossigeno nascente, altamente ossidante, che si libera nella reazione di dissociazione. L'ozono ha una bassa solubilità nell'acqua; è tossico e corrosivo, pertanto deve essere immesso in corrente dal basso verso l'alto per aumentarne la miscelazione. L'immissione avviene per insufflaggio.

Le tecniche più avanzate prevedono l'impiego di ozono in combinazione con altri reagenti come il perossido di idrogeno, di radiazioni UV o ultrasuoni e di catalizzatori, per aumentare la produzione di radicali dell'ossigeno [Andreozzi et al. 1999; Kasprzyk-Hordern et al. 2003].

### **Attinizzazione**

L'attinizzazione sfrutta l'azione battericida dei raggi ultravioletti, emessi per mezzo di lampade a vapori di mercurio a bassa pressione. L'azione dei raggi UV si esercita sulle molecole di DNA, portando a legami covalenti tra basi pirimidiniche (timina e citosina) adiacenti, formando dimeri di pirimidine. La presenza dei dimeri altera la funzionalità del DNA durante la replicazione, il riparo e la trascrizione, portando ad accumulo di mutazioni oppure alla morte della cellula [Witkin 1976]. Inoltre, le radiazioni UV di minore energia portano alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS, reactive oxygen species), che possono ossidare le macromolecole presenti nelle cellule. I raggi UV hanno un potere biocida elevatissimo nei confronti di batteri, spore, virus, funghi, nematodi [Legrini et al. 1993].

L'effetto dei raggi UV sui microrganismi viene interpretato come un intervento di demolizione fotochimica del DNA, che impedisce alla cellula di riprodursi. Questo avviene

in corrispondenza dell'esposizione della cellula a radiazioni UV-C (280-100 nm). Normalmente viene utilizzata radiazione con lunghezza d'onda di 254 nanometri (lampade a media pressione).

#### Il dosaggio dei raggi ultravioletti

La capacità di disinfezione della radiazione UV si esprime in termini di percentuale di sopravvivenza di una data popolazione di microrganismi, evidenziando, percentualmente, quanti di questi sono in grado di riprodursi dopo l'esposizione agli UV. Il danno sul microrganismo è il risultato dell'energia UV che lo colpisce per il tempo a cui è sottoposto.

La funzione risultante è definita Dose UV ed è indicata, prevalentemente, in  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ .

Tra le varie specie di microrganismi, la sensibilità ai raggi UV è diversa anche in modo notevole e dipende da vari fattori, quali la frequenza nel DNA delle sequenze di basi sensibili agli UV, la disponibilità e la forza dei meccanismi cellulari per riparare i danni prodotti dagli UV, la permeabilità agli UV delle membrane cellulari esterne [Hijnen et al. 2006].

Per *Escherichia coli*, ad esempio, la dose UV necessaria per la riduzione del 90% delle sue colonie, indicata come D10, è di  $5,4 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ . Per riduzioni superiori al 90% si applicano dosi multiple in funzione del risultato desiderato. Per ogni microrganismo conosciuto e catalogato c'è un valore di D10 diverso.

Per la disinfezione dell'acqua potabile è di recente emersa la pratica di applicare la Reduction Equivalent Dose, detta RED, che basa l'efficacia del trattamento UV su valutazioni biosimetriche [Cabaj et al. 1996]. La conseguenza di questa scelta, più conservativa e in linea con la maggior tutela della salute pubblica, implica valori di energia UV anche doppi rispetto all'impiego della dose UV media, di almeno  $40 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ , considerata fino a qualche tempo fa sufficientemente adeguata. La disinfezione di acqua potabile con UV è proposta oggi con particolare attenzione per l'eliminazione di parassiti intestinali come *Cryptosporidium parvum* e *Giardia* (organismi unicellulari Protozoi apicomplexi e diplomonadidi rispettivamente) [WHO 2002].

L'efficacia massima, con uso di lunghezza d'onda di 254 nanometri, corrispondente agli UV - C, si ottiene con una densità di flusso radiativo di almeno  $6000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Poiché le lampade usate normalmente perdono efficacia nel corso del tempo, si usano lampade con densità di flusso radiativo molto superiore. I raggi UV hanno un potere biocida elevatissimo nei confronti di batteri, spore, virus, funghi, nematodi [Hijnen et al. 2006]. Questo trattamento è efficace a condizione che l'acqua sia sufficientemente limpida (Solidi Sospesi Totali <

30 mg/l), in modo tale che i raggi luminosi possano permearla completamente, poiché l'energia radiante viene intercettata dalle particelle sospese.

#### Tecnica dell'esposizione alla radiazione ultravioletta

Il trattamento consiste nell'esporre l'acqua perfettamente limpida per 1-3 secondi ai raggi UV - C, e, poiché la penetrazione dei raggi è limitata, l'acqua deve scorrere in lamine con spessore < 10 cm. L'esposizione delle acque ai raggi ultravioletti può avvenire sostanzialmente in due modi: nel primo caso l'acqua scorre all'interno di un reattore tubolare, sigillato e in pressione, in cui è posta la lampada; nel secondo caso l'acqua scorre su una superficie riflettente, al di sopra della quale è posta la lampada.

#### Vantaggi e svantaggi della radiazione ultravioletta per la disinfezione

L'utilizzo dei raggi ultravioletti, particolarmente adatto per trattare piccole portate, si pone in competizione con l'aggiunta all'acqua di sostanze chimiche, che ne causano la modifica delle proprietà organolettiche, ma presenta lo svantaggio dei costi elevati, della necessità di acqua relativamente limpida e del non garantire la persistenza; pertanto non può essere l'unico trattamento di disinfezione.

#### Raggi gamma

I raggi gamma, che sono radiazioni ionizzanti, costituiscono il massimo sistema di disinfezione ottenibile attualmente. Si sfruttano, ad esempio, quelli derivanti dal  $^{60}\text{Co}$ , o cobalto-60, un isotopo radioattivo sintetico del cobalto. Questi raggi determinano rotture e mutazioni negli acidi nucleici, sia direttamente che attraverso radicali dell'ossigeno che si producono dalla ionizzazione; questo sistema è molto efficace, ma ha un costo elevato e attualmente non viene utilizzato per la disinfezione delle acque, ma ad esempio, per la disinfezione di strumenti infetti [Taghipour 2004].

#### **Processi oligodinamici**

I processi oligodinamici, o sterilizzazione a ione d'argento [Sintubin et al. 2012], ancora in corso di sperimentazione, sfruttano l'azione inibitrice sulla vita batterica dell'argento (effetto oligodinamico). Per la sterilizzazione l'argento viene disposto su sabbia, porcellana o candele ceramiche, o aggiunto direttamente all'acqua.

## **Sottoprodotti della disinfezione**

La disinfezione può determinare la produzione di sottoprodotti, detti DBPs dall'inglese "Disinfection By Products", contaminanti dell'acqua potabile, che possono conferirle odori e sapori sgradevoli, e possono anche avere effetti nocivi per la salute (potenzialmente cancerogeni). Questo perché il cloro gassoso e gli ipocloriti formano acido ipocloroso, che, con alcune sostanze organiche e/o inorganiche presenti nell'acqua, può dare luogo a composti organo-alogenati, come trialometani (THM) e acidi aloacetici (HAA) [Schmid et al. 2008].

I trialometani presenti nell'acqua potabile sono cloroformio, bromoformio, bromodiclorometano, dibromodiclorometano, sostanze sospettate di creare danni al fegato, ai reni e al sistema nervoso centrale, considerate cancerogene per l'uomo. Gli acidi aloacetici o HAAs, dall'inglese HaloAceticAcids (acido monocloroacetico, dicloroacetico, tricloroacetico, monobromoacetico, dibromoacetico), si formano dalla reazione del cloro gassoso o degli ipocloriti con il propanone presente in acqua. Sono considerate cancerogene anche sostanze inorganiche, come i clorati, e sostanze non alogenate come aldeidi e benzene.

I fattori che influenzano la formazione dei DPBs sono la tipologia, la dose del disinfettante e il residuo di disinfezione.

Il biossido di cloro forma principalmente composti inorganici come i cloriti e i clorati; le clorammine possono dare origine ad alogenotrioli e clorammine organiche, come composti organo-alogenati; come composti inorganici possono formare nitriti, nitrati, clorati e idrazina; tra i composti non alogenati figurano aldeidi e chetoni. L'ozono può dare origine a bromoformio e acetone come composti del primo gruppo, clorati, iodati e bromati come composti inorganici e aldeidi e chetoni come composti dell'ultimo gruppo.

## **Il metodo SODIS**

Il Solar water DISinfection, conosciuto anche come SODIS è un metodo di disinfezione dell'acqua ottenuto con l'utilizzo della luce solare e delle bottiglie di plastica in polietilentereftalato (PET), di uso comune [Wegelin et al. 1994; McGuigan et al. 2012]. È un sistema economico ed efficiente per il trattamento dell'acqua in zone isolate, solitamente applicato a livello familiare, in particolare in paesi non industrializzati.

Questa metodica può portare ad un importante miglioramento della qualità dell'acqua bevuta, con una riduzione delle malattie trasmesse da batteri presenti nell'acqua (e quindi,

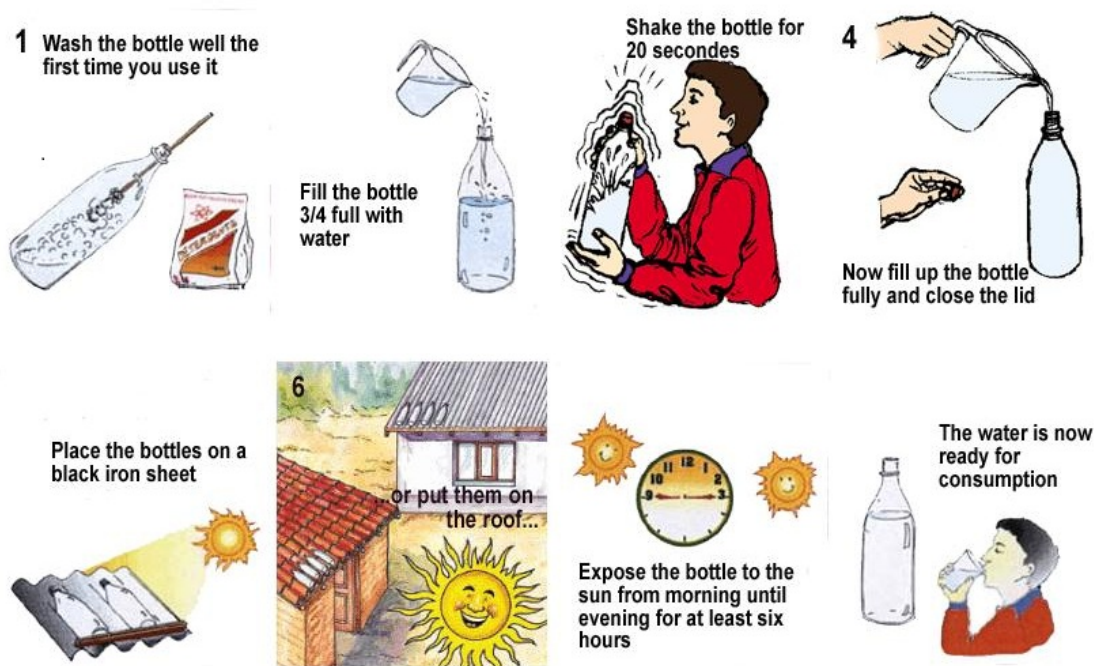
principalmente, dissenterie) agli utenti che traggono l'acqua da fiumi, laghi o acquedotti contaminati [du Preez et al. 2011, 2012; Kraemer e Mosler 2012]. I patogeni virali sembrano essere in qualche misura resistenti a questo trattamento [Fisher et al. 2012; Harding et al. 2012], mentre i protozoi sono resistenti nello stadio di cisti od oocisti con pareti spesse [Fontan-Sainz et al. 2012].

Il metodo SODIS, rispetto agli altri sistemi per la potabilizzazione dell'acqua, è caratterizzato da estrema semplicità, efficacia, indipendenza da elettricità o macchinari, manutenzione pressoché nulla, sostenibilità ambientale, bassissimo costo (l'unico costo da sostenere essendo l'educazione delle comunità familiari, che introduce una modificazione nei comportamenti alimentari). E' sponsorizzato da governi e organizzazioni non governative (Figura 5).

L'OMS raccomanda il metodo SODIS tra le tecniche per il trattamento e la conservazione dell'acqua.

#### Funzionamento del metodo SODIS

L'inertizzazione di molti batteri, responsabili della dissenteria e di altre malattie trasmissibili con l'acqua [Fisher et al. 2012; Fontan-Sainz et al. 2012; Harding et al. 2012], viene attribuita all'esposizione alla luce solare, in particolare nelle bande dell'ultravioletto (UV-A e UV-B) con attività sulle molecole di DNA e dei lipidi [Copperwhite et al. 2012; Mbonimpa et al. 2012], e nelle bande dell'infrarosso, causa del riscaldamento dell'acqua. Se la temperatura dell'acqua raggiunge i 50 °C, il processo di disinfezione dell'acqua diventa tre volte più veloce, e questo effetto è attribuito alla pastorizzazione ma anche all'effetto delle elevate temperature sull'efficienza dei meccanismi di riparo del DNA [McGuigan et al. 2012]. Gli effetti sembrano dipendere anche dallo stadio fisiologico dei microrganismi; ad esempio le cisti di protozoi sono più sensibili al SODIS se viene lasciata aumentare la temperatura oltre 40 °C [Fontan-Sainz et al. 2012; McGuigan et al. 2012].



**Figura 5.** Rappresentazione del metodo SO.DIS. [www.sodis.ch].

La luce solare, anche nelle frequenze diverse dall'ultravioletto, produce nell'acqua composti dell'ossigeno reattivi (ROS), quali radicali liberi dell'ossigeno e perossidi di idrogeno. Queste molecole contribuiscono al processo di inattivazione dei microorganismi anche dopo la fine del periodo di irradiazione. In condizioni normali, l'acqua prelevata da fiumi, torrenti, sorgenti, laghi, rubinetti contiene ossigeno in quantità sufficiente (più di 3 mg di ossigeno/litro) e non è necessario ossigenarla prima di esporla alla luce solare. Se, invece, l'ossigenazione si rendesse necessaria, è consigliato di riempire le bottiglie di acqua per tre quarti, agitarle per 20 secondi ed infine riempirle completamente.

Il tempo di esposizione alla radiazione solare delle bottiglie in PET, contenenti l'acqua da potabilizzare in quantità non superiore a 3 litri, è di circa 6-7 ore con nuvolosità coprente circa il 50% del cielo, e di 2 giorni con cielo completamente nuvoloso. In caso di pioggia il metodo SODIS è inefficace. Preferibilmente le bottiglie devono porsi, orizzontalmente, sopra tetti in lamiera ondulata, per una miglior riflessione della luce; in alternativa, all'interno di semplici collettori solari, come scatole da scarpe rivestite di alluminio.



### Limiti e controindicazioni del metodo SODIS

- Alcuni tipi di vetro o materiali PVC possono impedire alla luce ultravioletta di raggiungere l'acqua. Il policarbonato, ad esempio, blocca le radiazioni UVA e UVB; apposite buste di plastica sono state progettate per aumentare la superficie di raccolta della luce;
- l'invecchiamento e il logoramento delle bottiglie in PET riducono l'efficienza della luce solare, come le bottiglie non trasparenti, quelle di colore diverso dall'azzurro e quelle di spessore più elevato delle bottiglie in commercio;
- l'intensità della radiazione UV diminuisce rapidamente con l'aumentare della profondità dell'acqua. Alla profondità di 10 centimetri, con la torbidità moderata di 26 NTU (Nephelometric Turbidity Unit), la radiazione UV-A si riduce al 50%;
- i contenitori di plastica possono rilasciare componenti chimici o tossici come il tereftalato nell'acqua, un processo potenzialmente accelerato dal calore [Schmid et al. 2008]; il vetro sarebbe un materiale migliore, ma il suo trasporto è più difficile, costoso e pericoloso;
- risulta rilascio di antimonio da parte di bottiglie PET contenenti acqua minerale e analcolici immagazzinate per molti mesi nei supermercati [Keresztes et al. 2009];
- non si può escludere che i batteri, sopravvissuti all'esposizione alla luce solare, riprendano a riprodursi alla fine dell'esposizione. Si ritiene che il fenomeno possa efficacemente contrastarsi con l'aggiunta di perossido di idrogeno (10 parti per milione per la prevenzione della ricrescita del batterio di un tipo di salmonella);
- il metodo SODIS è inefficace per la rimozione di sostanze chimiche tossiche eventualmente presenti nell'acqua;
- l'acqua molto torbida (che non consente di leggere attraverso la bottiglia la testata di un quotidiano) deve essere precedentemente filtrata, perché una elevata torbidità dell'acqua riduce in modo significativo l'efficienza della luce solare.

#### 4. Ceppi batterici oggetto della sperimentazione

I ceppi utilizzati nel corso della tesi sono stati scelti perché comunemente usati da decenni come indicatori della sicurezza microbiologica dell'acqua potabile [Leclerc et al. 2001]. Le caratteristiche degli organismi che possono essere usati come indicatori dell'inquinamento si riferiscono al fatto che il loro ritrovamento può indicare la probabile presenza di organismi patogeni simili per fisiologia ed ecologia, anche se a livelli considerevolmente inferiori; la loro presenza in acque che hanno subito trattamenti di depurazione indica inoltre errori nelle procedure.

##### ▪ Coliformi

I Coliformi sono batteri a forma di bastoncino, appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae, che presentano alcune caratteristiche comuni, morfologiche e biochimiche, utilizzate anche per la loro identificazione. Sono Gram-negativi, asporigeni, aerobi o facoltativamente anaerobi, possiedono l'enzima beta-galattosidasi, fermentano il lattosio, con produzione di gas (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>), aldeidi, e acidi a 35-37 °C in 24-48 ore. Essendo ubiquitari, alcuni sono presenti nelle feci, e pertanto vengono utilizzati come indicatori di inquinamento delle acque e degli alimenti; altri sono di origine acquatica. Il gruppo, nella più recente classificazione [Leclerc et al. 2001] comprende 80 specie appartenenti a 19 diversi generi, tra cui *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*.

Tra questi, alcune specie dei generi *Escherichia*, in particolare *Escherichia coli* e *Klebsiella*, hanno come loro habitat naturale l'intestino dell'uomo e di altri animali a sangue caldo, e costituiscono il sottogruppo dei Coliformi fecali, cioè la parte termotollerante dei Coliformi totali. Il termine termotollerante (o termotrofico) deriva dalla capacità di queste specie di fermentare il lattosio a 44-46 °C in 24 ore.

La divisione in Coliformi totali e Coliformi fecali non è basata su rigidi criteri scientifici, ma solo sulle capacità di crescita in condizioni ambientali diverse.

I Coliformi costituiscono pertanto un raggruppamento che unisce specie diverse in grado di crescere in presenza di sali biliari e di lattosio. I sali biliari tipici dell'ambiente intestinale sono inibitori della grande maggioranza di specie batteriche e di alcune Enterobacteriaceae; il lattosio è uno zucchero che non viene utilizzato da tutte le specie di questa famiglia. Questi

due fattori esercitano, nella stessa piastra di cultura, un'azione selettiva a favore dei Coliformi e negativa per le altre Enterobacteriaceae.

#### ▪ **Enterococchi fecali**

L'*Enterococcus faecalis* è un batterio disposto in catenelle corte o in coppie, Gram-positivo, che ha come habitat naturale il tratto gastrointestinale dell'uomo e di altri mammiferi. Precedentemente identificato all'interno del genere degli streptococchi non emolitici di gruppo D, negli anni Ottanta è stato inserito in un nuovo genere a sé stante, *Enterococcus*, in cui ricopre un ruolo preminente assieme a *Enterococcus faecium*. In particolari condizioni l'*Enterococcus faecalis* subisce una trasformazione da microorganismo simbiote a patogeno opportunisto: in tali circostanze questo batterio, divenuto patogeno, può costituire un serio problema per l'uomo, dando luogo a infezioni anche letali. Questa specie è stimata essere coinvolta nell'80% delle infezioni enterococciche. L'*Enterococcus faecalis* è immobile e anaerobio facoltativo, in grado di fermentare il glucosio senza produrre gas.

Molto resistente all'ambiente, resiste a pH variabile da 4,5 a 10, si replica a temperature variabili da 10° a 45°C, cresce in terreni agar sangue fino ad una concentrazione di cloruro di sodio pari al 6,5% e sopravvive per 30 minuti a temperature di 60°C.

Nonostante sia meno virulento rispetto a stafilococchi e streptococchi, l'*Enterococcus faecalis* risulta particolarmente resistente agli antibiotici. Le infezioni mediate più spesso da *Enterococcus faecalis* comprendono endocarditi sub-acute, meningiti, sepsi, batteriemia ed infezioni a carico delle vie urinarie. L'*Enterococcus faecalis* può infettare l'uomo anche attraverso alimenti contaminati quali carne o acqua infetta.

#### ▪ **Escherichia coli**

L'*Escherichia coli* è un batterio a forma di bastoncello, Gram-negativo, aerobio e facoltativamente anaerobio, non sporigeno, che cresce alla temperatura di 44,5 °C, lattosio-fermentante, indolo-positivo in terreni contenenti triptofano, beta-D-glucuronidasi-positivo. E' la specie più nota del genere *Escherichia*: se ne distinguono almeno 171 sierotipi. Appartiene al gruppo degli enterobatteri ed è usato come organismo modello dei batteri. Normalmente presente nel colon, è il principale responsabile di infezioni urinarie, fino al 90% dei casi in assenza di complicazioni, ma con percentuale di recidive, dopo guarigione da una prima infezione urinaria, stimata al 44% nell'arco dei successivi 12 mesi.

L'*E. coli* viene spesso riscontrato nell'urina, in seguito ad esami di laboratorio condotti per indagare l'origine di sintomi riconducibili ad un'infezione delle vie urinarie. Le infezioni urinarie sostenute da *E. coli* sono più comuni nella donna.

Non tutti i ceppi di *E. coli* sono in grado di provocare infezioni urinarie; i microrganismi dotati di questa capacità sono pertanto definiti "uropatogeni". Tale caratteristica si deve alla capacità dell'*E. coli* di ancorarsi alla membrana delle cellule uroepiteliali per mezzo di strutture proteiche che si proiettano dalla parete del batterio. L'*E. coli* è normalmente suscettibile a diversi antibiotici, come trimetoprim, sulfametossazolo, ciprofloxacina e nitrofurantoina.

È una delle specie principali di batteri che vivono nella parte inferiore dell'intestino di animali a sangue caldo (uccelli e mammiferi) e può costituire circa l'1% della massa batterica totale. Questi batteri sono necessari per la corretta digestione del cibo. La sua presenza nei corpi idrici segnala l'esistenza di condizioni di fecalizzazione e insieme agli enterococchi è il principale indicatore di contaminazione fecale [Edberg et al. 2000]. Pertanto nelle acque destinate al consumo umano, nelle acque di piscina, nelle acque adibite alla balneazione, etc. è prescritta l'assenza di *E. coli*. La mancata rispondenza al valore parametrico stabilito costituisce una non-conformità del prodotto (acqua, alimento, ecc.).

Il numero di cellule di *E. coli* nelle feci che un umano espelle in un giorno va da  $10^{11}$  a  $10^{19}$ .

Nel gruppo dei coliformi, la specie *Escherichia coli* è ampiamente rappresentata ed è in esclusivo rapporto col tratto gastrointestinale dell'uomo e degli altri animali a sangue caldo, a differenza dei microrganismi appartenenti a diversi generi, tra cui *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* (che si caratterizzano per una potenziale capacità di ricrescita una volta pervenuti nell'ambiente). Infatti, le caratteristiche che ne fanno un indicatore dell'inquinamento di origine fecale nelle acque si riferiscono alla sua presenza nell'habitat dell'intestino, al suo ritrovamento in numeri maggiori rispetto a quelli dei patogeni con la stessa origine, alla sua resistenza ai disinfettanti, alla sua incapacità di crescere nell'acqua, e alla facilità con cui ne viene rilevata la presenza [Edberg et al. 2000].

## 5. Materiali e metodi

Al fine di studiare l'azione battericida della luce visibile sui microorganismi presenti in acqua, è stato utilizzato il ceppo batterico *Escherichia coli* DH-10B presente nella ceppoteca del Dipartimento di Bioscienze. Il ceppo è considerato non patogeno e quindi è definito "safe".

Gli esperimenti sono stati effettuati con modalità diverse, variando i seguenti parametri come dettagliato di seguito:

- i contenitori per il trattamento dei campioni di acqua
- la concentrazione di cellule iniziale
- la lunghezza d'onda della luce incidente, nella banda del visibile - tra 380 e 760 nanometri circa
- la sorgente luminosa, solare o artificiale con proiettori
- l'intensità luminosa

### Tipologie di contenitori utilizzati nella sperimentazione

Nei diversi esperimenti si sono utilizzati contenitori di forma, materiali e dimensioni diverse:

- capsula Petri comune da laboratorio avente diametro di 90 mm, contenente 50 ml di acqua
- bottiglia di PET incolore da 1,5 L, contenente 1,0 L di acqua
- bottiglia di vetro incolore da 1,0 L, contenente 1,0 L di acqua
- bottiglie di vetro da 1,0 L di colore viola, blu, turchese, verde chiaro, giallo paglierino, arancione, fucsia, rosso, grigio, contenenti 1,0 L di acqua (Figura 7)
- contenitore cilindrico in acciaio del diametro di cm 38 e altezza di cm 38, contenente 40 L di acqua deionizzata
- beaker di vetro avente diametro di 125 mm, contenente 1,0 L di acqua
- recipiente di plastica avente dimensioni di cm 23 x 23 x 2, contenente 500 mL di acqua
- recipiente di plastica avente dimensioni di cm 14 x 21,5 x 5, contenente 500 mL di acqua e una mattonella fotocatalizzatrice bianca al biossido di titanio Active Clean Air [mattonella di dimensioni 30 x 30 x 1 cm, prodotta tramite trattamento al biossido di titanio (che agisce da fotocatalizzatore) effettuato sulle lastre ad elevata temperatura. Le particelle di titanio, che hanno dimensioni micrometriche, consentono di realizzare

in tal modo una ceramica, usata per pavimenti e rivestimenti, con funzioni battericide e antinquinanti]

- contenitore a forma di parallelepipedo realizzato in legno smaltato internamente di bianco con funzione riflettente la luce, dimensioni interne di cm 20 x 20 x 31, contenente 10 L di acqua
- contenitore a forma di parallelepipedo realizzato in legno smaltato internamente di bianco con azione riflettente la luce - avente dimensioni interne di cm 20 x 20 x 31 con uno specchio sul fondo, contenente 10 L di acqua
- contenitore a forma di parallelepipedo realizzato con mattonelle fotocatalizzatrici Active Clean Air, dimensioni interne di cm 20 x 20 x 30, contenente 10 L di acqua
- contenitore cilindrico in acciaio inox contenente 10 L di acqua



**Figura 7.** Bottiglie di vetro da 1,0 L di colore verde chiaro, giallo paglierino, arancione, rosso, fucsia, viola, trasparente, grigio, blu scuro, turchese, azzurro

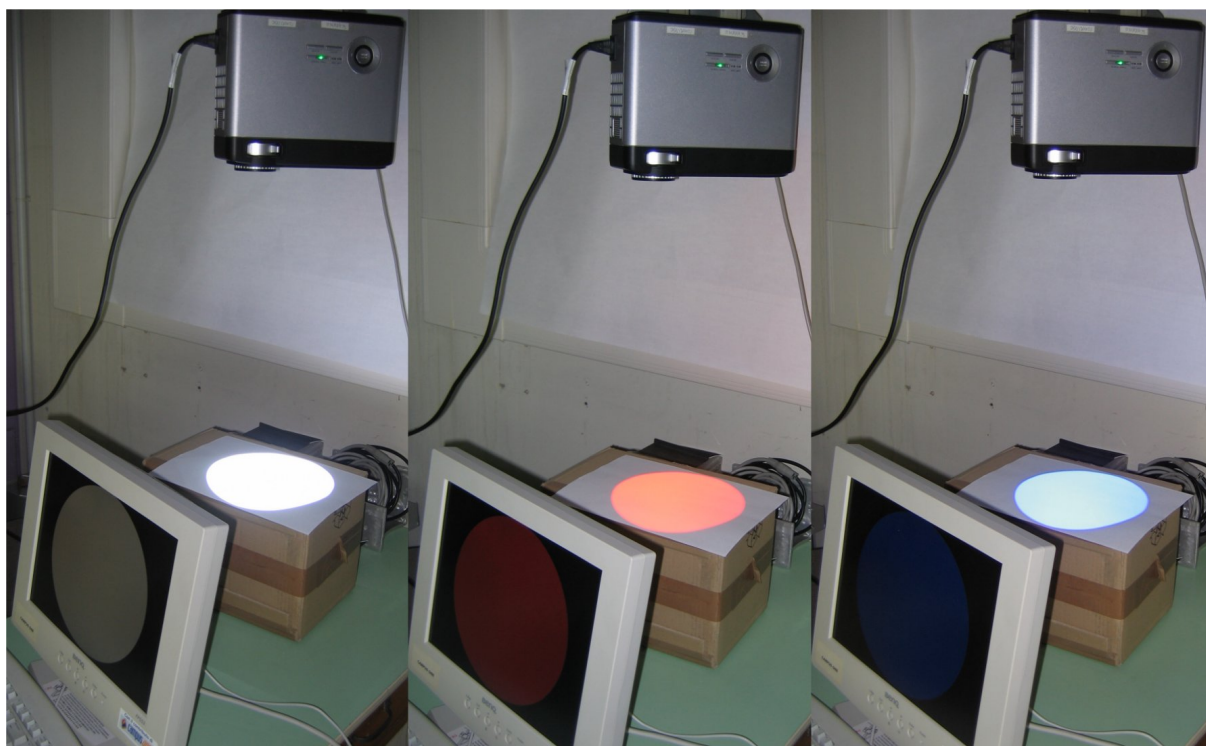
#### Illuminazione e intensità luminosa

La luce solare con cielo sereno, in campo aperto, ha fatto registrare a livello del campione valori di illuminamento compresi circa tra 120.000 lux e 160.000 lux. In un caso si è usata una copertura di una bottiglia di vetro blu con retina di plastica a 4 strati, per ridurre l'illuminamento a 22.000 lux. Negli esperimenti eseguiti presso la serra del Dipartimento di Bioscienze con cielo sereno, a livello dei contenitori sono stati misurati diversi valori di illuminamento, comunque mai superiori a 66.000 lux.

Per quanto concerne la luce artificiale, è stata prodotta tramite proiettori e lampade come sotto indicato.

1. Proiettore Acer PD523 da 2.500 lumen controllato da computer con software dedicato (sistema denominato *Tonal*, figura 8)

- Tecnologia DLP Digital Light Display
- Risoluzione nativa: XGA 1.024 x 768
- Risoluzione compressa: SXGA 1.280 x 1.024; 16.7 milioni di colori
- Flusso luminoso: 2.400 ANSI Lumen (in modalità standard) – 1.700 ANSI Lumen (in modalità ECO)
- Contrasto: 2000:1
- Lente 1.2 x zoom manuale
- Tipo di lampada: 200 W UHP sostituibile dall'utente
- Dimensioni (LxPxA): 277 x 237 x 107 mm
- Peso: 2.4 kg



**Figura 8.** Sistema denominato *Tonal*

## 2. Proiettore a led FARLIGHT FN104-80 (FAR SYSTEMS, Verona)

- Materiale armatura: corpo unico in estrusione di alluminio con ampia alettatura di raffreddamento. Chiusure laterali in stampo in ABS
- Schermo: vetro temprato 4 mm
- Gruppo ottico: moduli LED equipaggiati con collimatori secondari per il concentramento del fascio luminoso. Fotometrie a scelta in base al tipo di impiego, con fascio luminoso simmetrico oppure asimmetrico
- Tipologia LED: Power LED Neutral
- Temperatura di colore: 4.000 K – 5.300 K (luce bianca)
- Indice di Resa Cromatica (CRI):  $70 < Ra < 80$  ( $Ra' = 2A$ )
- Classe di sicurezza laser: 1M
- Efficienza della sorgente luminosa:  $\eta > 100$  lm/W
- Tempo di accensione / spegnimento:  $t_a < 1$  s;  $t_s < 1$  s
- Grado di resistenza agli urti: IK 08
- Dimensioni (l x p x h) e peso: 404 x 416 x 112 mm; 8 kg
- Potenza massima assorbita  $\leq 109$  W
- Alimentazione: 220 V ca / 50 Hz
- Flusso luminoso:  $\leq 11.660$  Lumen
- Protezione da sovratensioni/sovracorrenti/sovratemperature
- Classe di isolamento: II
- Grado di protezione: IP66
- Fattore di Potenza  $\geq 0,95$



**Figura 9.** Proiettore a led FARLIGHT FN104-80

3. Proiettore RODIO 3 (DISANO Illuminazione, Milano) dotato di lampada JM-T 400 Watt, E40, 35.000 lumen, 4.500 K

- Corpo senza telaio in alluminio pressofuso, con alettature di raffreddamento
- Riflettore simmetrico in alluminio
- Diffusore: vetro temperato sp. 5 mm resistente agli shock termici e agli urti
- Alimentazione: 230 V/50 Hz con protezione termica; morsettiera 2P +T, sezione conduttori 4 mmq
- Peso: Kg 11,30
- Dimensioni: 522 x 461 x 145 mm
- Potenza assorbita dalla lampada JM-T: 400 Watt
- Attacco: E40
- Flusso luminoso: 35.000 lumen
- Temperatura di colore: 4.500 K (luce bianca)



**Figura 10.** Proiettore DISANO RODIO 3

4. Lampade a incandescenza da 60 W, col vetro, rispettivamente, trasparente e dei colori rosso, verde, blu.

L'illuminamento a livello dei campioni è stato misurato con luxmetro LX-1108 (Lutron Electronic Enterprise, Taiwan).

#### Colture batteriche

Nelle colture in liquido *Escherichia coli* veniva coltivato in LB, così composto:

Bacto-triptone (Formedium) 1%

Yeast Extract (Formedium) 0,5%

NaCl 0.5% H 7,5

Per le colture in solido il terreno veniva solidificato con Agar (Formedium) 2% e denominato LBA.

#### Concentrazione dei batteri

Le concentrazioni batteriche, prima e dopo i trattamenti, sono state misurate tramite i seguenti metodi:

- conteggio visivo delle Unità Formanti Colonia (UFC) di *E. coli* cresciute su capsule Petri contenente 25 ml di LBA
- conteggio delle colonie cresciute su agar a 36°C, codice metodo: MP/M/051; metodo di prova APAT- CNR-IRSA 7050 Man. 29/2003

- conteggio delle colonie cresciute su agar a 22°C, codice metodo: MP/M/051; metodo di prova APAT- CNR-IRSA 7050 Man. 29/2003
- per Coliformi: codice metodo: MP/M/063; metodo di prova ISO 9308-1:2000/Cor. 1:2007
- per *Escherichia coli*: codice metodo: MP/M/064; metodo di prova ISO 9308-1:2000/Cor. 1:2007
- per Enterococchi fecali: codice metodo: MP/M/062; metodo di prova ISO 7899-2:2000
- determinazione della concentrazione cellulare per filtrazione: aliquote di 10 ml ciascuna della sospensione cellulare vengono filtrate e i filtri depositati su capsule Petri contenente terreno LBA
- determinazione della concentrazione cellulare per inclusione il LBA: aliquote di 1 ml di sospensione cellulare vengono poste ciascuna in 25 ml di LBA e tali sospensioni versate in capsule Petri.

#### Determinazione della durezza dell'acqua

La durezza dell'acqua è stata misurata col metodo complessometrico con EDTA 0,01 molare + NET (indicatore da aggiungere all'acqua con soluzione tampone a pH 10).

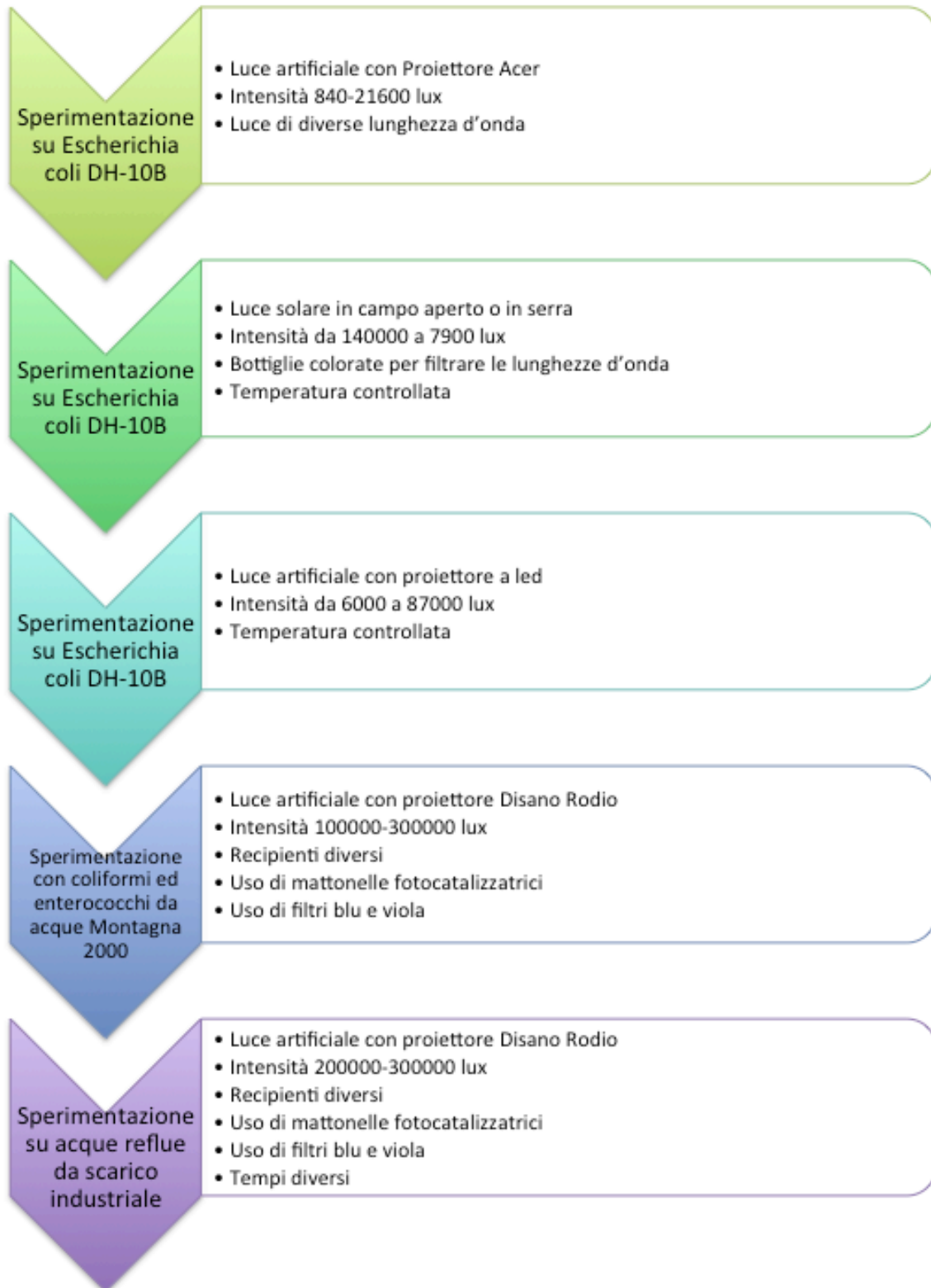
La valutazione degli ioni sodio, calcio, potassio, magnesio presenti nell'acqua è stata fatta tramite i seguenti metodi analitici: ISS.BEC.041. Rev.00, ISS.BEC.031. Rev.00, APAT CNR IRSA 2003 3030.

Il valore di pH è stato determinato con il pHmetro HI 9811-5 dotato di sonda HI 1285-5 (HANNA Instruments, USA).

La conducibilità è stata misurata con lo strumento EcoScan Handheld (Eutech Instruments, Paesi Bassi).

## 6. Attività svolta e risultati

Le sperimentazioni hanno seguito la successione logica rappresentata nello schema a seguire.



Inizialmente la sperimentazione effettuata è stata mirata a valutare la capacità battericida della luce irradiando sospensioni di un ceppo di *Escherichia coli* non patogeno, *Escherichia coli* DH-10B (da qui in poi chiamato *Escherichia coli safe*), con diversi valori di illuminamento, diverse lunghezze d'onda nella banda della luce visibile e diversi tempi.

La scelta di questo ceppo batterico è stata fatta tenendo conto del suo livello di resistenza ai trattamenti antibatterici in uso, generalmente superiore a quello, ad esempio, di coliformi totali, coliformi fecali, enterococchi fecali, etc.

In seguito a irraggiamento prodotto da:

- 1) Proiettore Acer PD523 da 2.500 lumen controllato da computer con software dedicato (sistema denominato *Tonal*)
- 2) Luce solare
- 3) Irradiatore a led FARLIGHT FN104-80

si sono osservate riduzioni significative anche elevate delle concentrazioni batteriche.

### **Sperimentazione con luce artificiale (sistema denominato *Tonal*)**

Sono stati fatti 18 esperimenti indipendenti in laboratorio. Le cellule di *Escherichia coli safe* sono state sospese in acqua deionizzata e sterilizzata, e tale sospensione introdotta in beaker di vetro avente diametro di 125 mm, per 1 L di liquido.

La sospensione batterica è stata sottoposta ad irradiazione di luce a diverse lunghezze d'onda e diversi valori di illuminamento tramite il proiettore *Tonal*, valutando la percentuale di sopravvivenza batterica come rapporto tra le UFC prima del trattamento e le UFC dopo il trattamento, ai tempi iniziale (controllo), 2 ore, 6 ore.

Gli esperimenti hanno dato luogo a valori di abbattimento anche molto diversi tra loro. Nella tabella seguente sono riportate le prove che hanno evidenziato una percentuale di sopravvivenza batterica inferiore al 40%.

**Tabella 1 Effetto delle diverse lunghezze d'onda della luce artificiale, da Proiettore Tonal, sull'attività antibatterica su *Escherichia coli* DH-10B**

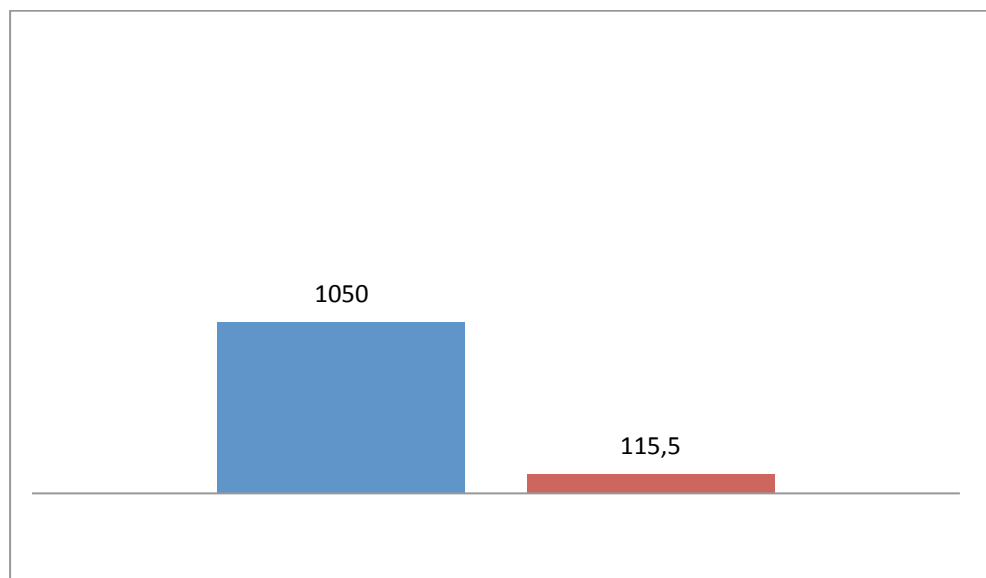
Colore luce e $\lambda$ (nm)	Illuminamento (lux) §	Concentrazione iniziale (cell/ml)	Sopravvivenza a a 2h *	Sopravvivenza a 6h *
440 blu	600 <b>840</b> 1.400	1050	inquinato	<b>11 %</b>
luce bianca	16.300 <b>21.600</b> 31.700	2860	<b>36 %</b>	<b>11 %</b>
luce bianca	16.300 <b>21.600</b> 31.700	1070	<b>35 %</b>	<b>11 %</b>
510 verde	5.500 <b>7.600</b> 11.200	190	<b>17 %</b>	<b>12 %</b>
510 verde	5.500 <b>7.600</b> 11.200	3840	44 %	<b>37 %</b>
510 verde	5.500 <b>7.600</b> 11.200	3590	57%	<b>24%</b>

§ intensità in lux misurata, rispettivamente: a base beaker, **livello liquido**, becco beaker

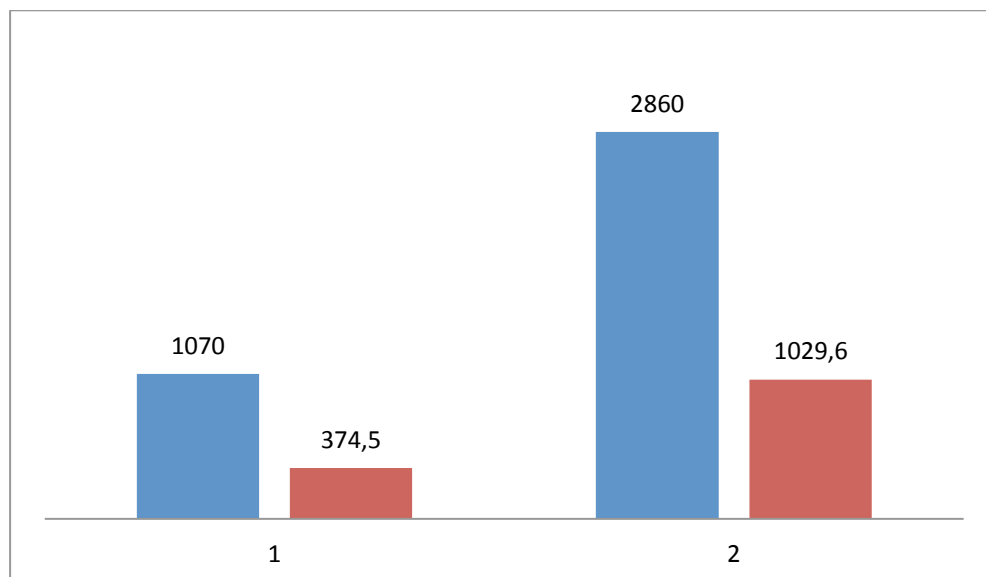
\* in grassetto sono evidenziati i valori di sopravvivenza inferiori al 40%

I risultati riportati in tabella 1 e nelle Figure 11-17 sono stati ottenuti con luce bianca (comprendente, come noto, tutte le lunghezze d'onda del visibile), blu ( $\lambda = 440$  nm) e verde (510 nm). Le altre lunghezze d'onda: rosso – giallo (780 – 580 nm circa) e indaco – viola (430 – 380 nm circa) sono risultate poco efficaci. Ciò dipende probabilmente dalla notevole diminuzione dell'illuminamento a questi valori di  $\lambda$  dovuta alle caratteristiche del videoproiettore che, pur permettendo di variare a piacimento le caratteristiche dei fasci luminosi (lunghezza d'onda, durata, forma, dimensioni) tramite computer, è però caratterizzato da un valore del flusso luminoso non superiore a 2.500 lumen. A ciò si attribuiscono i limitati valori di abbattimento batterico, e alcune “oscillazioni” nei risultati.

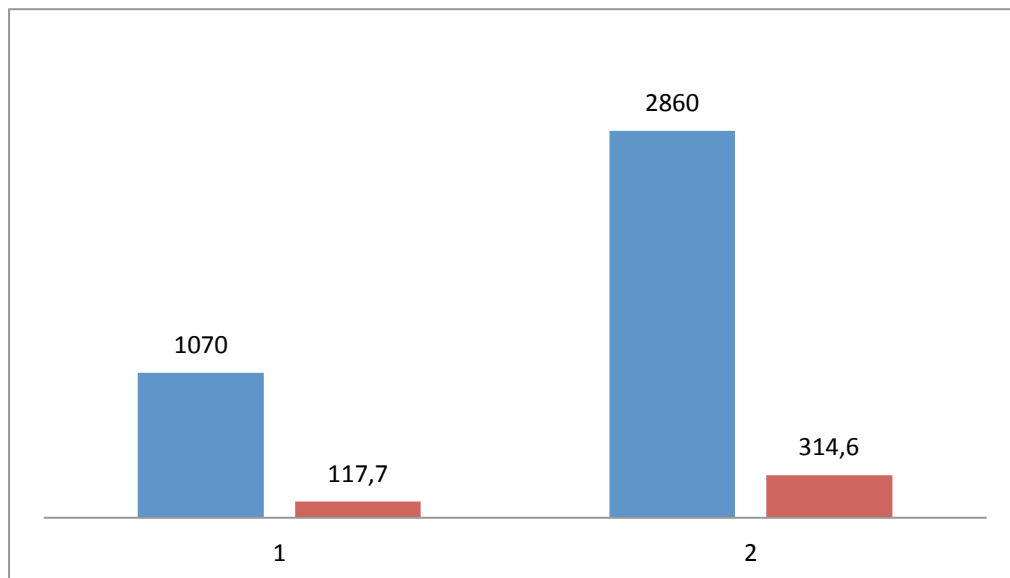
Fa eccezione la luce blu ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ) che, con valori misurati di illuminamento di oltre un ordine di grandezza inferiori a quelli misurati con altre lunghezze d'onda, porta a un abbattimento della sopravvivenza quasi del 90%.



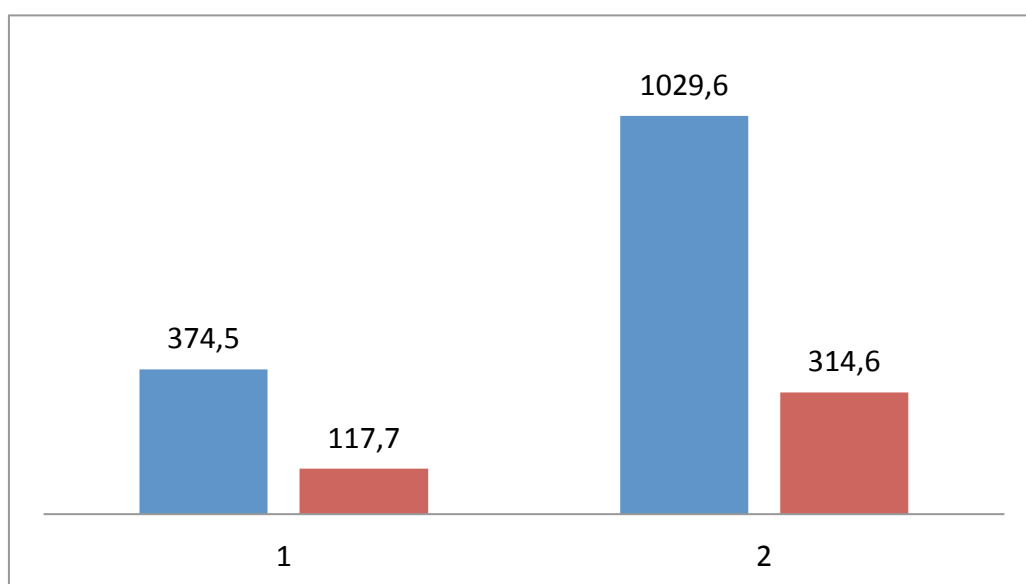
**Figura 11.** Sopravvivenza di *Escherichia coli* DH-10B in acqua in seguito a irraggiamento per 6 h con luce artificiale blu a 840 lux, da proiettore Acer PD523. Barra blu: concentrazione iniziale di cellule; barra rossa: concentrazione finale di cellule (cell/ml).



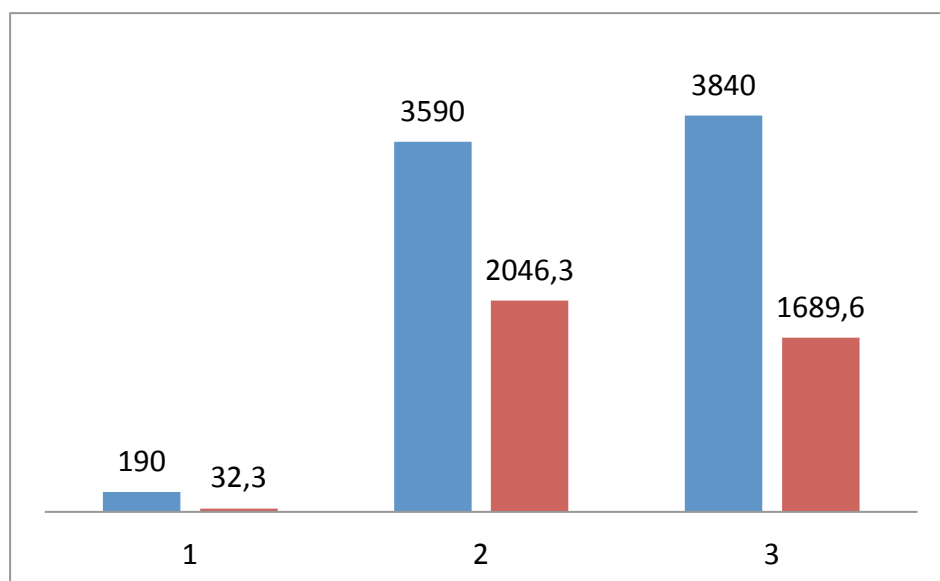
**Figura 12.** Sopravvivenza di *Escherichia coli* DH-10B in acqua in seguito a irraggiamento per 2 h con luce artificiale bianca a 21600 lux, da proiettore Acer PD523, in due esperimenti. Barre blu: concentrazioni iniziali di cellule; barre rosse: concentrazioni finali di cellule (cell/ml).



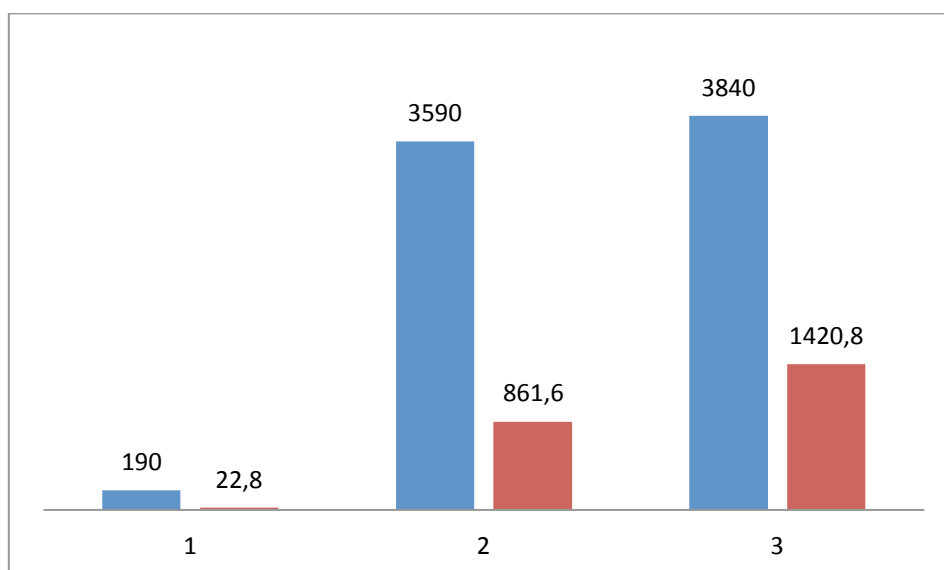
**Figura 13.** Sopravvivenza di *Escherichia coli* DH-10B in acqua in seguito a irraggiamento per 6 h con luce artificiale bianca a 21.600 lux, da proiettore Acer PD523, in due esperimenti. Barre blu: concentrazione iniziale di cellule; barre rosse: concentrazione finale di cellule (cell/ml)



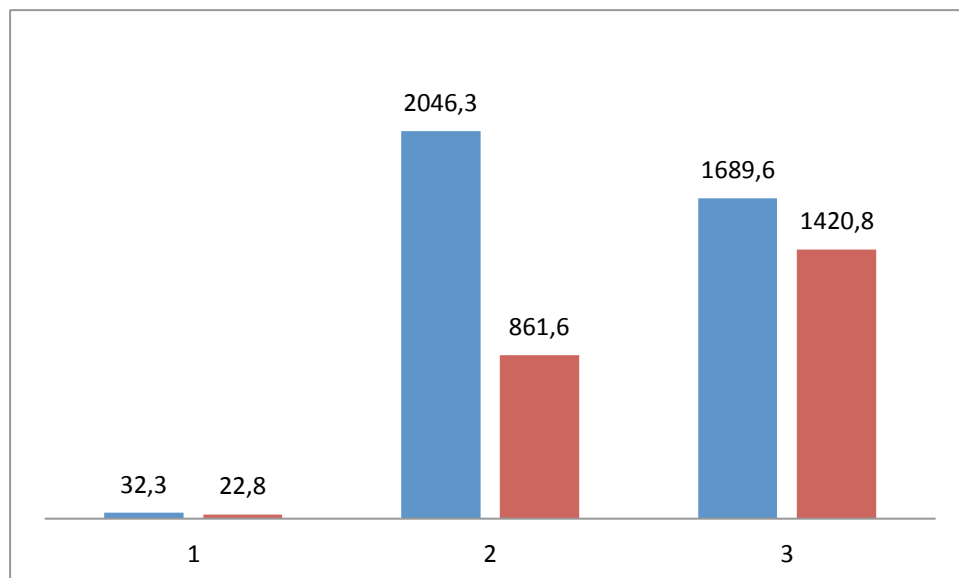
**Figura 14.** Confronto tra sopravvivenza di *Escherichia coli* DH-10B in acqua in seguito a irraggiamento, rispettivamente, per 2 h e per 6 h con luce artificiale bianca a 7.600 lux, da proiettore Acer PD523, in due esperimenti. Barre blu: concentrazione finale di cellule dopo 2 h; barre rosse: concentrazione finale di cellule dopo 6 h (cell/ml).



**Figura 15.** Sopravvivenza di *Escherichia coli* DH-10B in acqua in seguito a irraggiamento per 2 h con luce artificiale verde a 7.600 lux, da proiettore Acer PD523, in tre esperimenti. Barre blu: concentrazione iniziale di cellule; barre rosse: concentrazione finale di cellule (cell/ml).



**Figura 16.** Sopravvivenza di *Escherichia coli* DH-10B in acqua in seguito a irraggiamento per 6 h con luce artificiale verde a 7.600 lux, da proiettore Acer PD523, in tre esperimenti. Barre blu: concentrazione iniziale di cellule; barre rosse: concentrazione finale di cellule (cell/ml).



**Figura 17.** Confronto tra sopravvivenza di *Escherichia coli* DH-10B in acqua in seguito a irraggiamento, rispettivamente, per 2 h e per 6 h con luce artificiale verde a 7.600 lux, da proiettore Acer PD523, in tre esperimenti. Barre blu: concentrazione finale di cellule dopo 2 h; barre rosse: concentrazione finale di cellule dopo 6 h (cell/ml).

## Sperimentazione con luce solare

Per proseguire la sperimentazione superando i limiti del proiettore *Tonal*, nel periodo primavera – estate 2013, con condizioni meteorologiche favorevoli, è stata utilizzata la luce solare, con valori dell'illuminamento notevolmente superiori. Sono stati fatti 9 gruppi di esperimenti indipendenti, di cui 5 in campo aperto e 4 in serra.

Per gli esperimenti, come scritto, sono stati utilizzati:

- bottiglie di PET incolore da 1,5 L, riempite sia con 1 L sia con 0,75 L di acqua con inoculate da 97 cell/ml a 3.590 cell/ml di *E. coli safe*;
- bottiglie di vetro incolore da 1 L, riempite come sopra;
- bottiglie di vetro da 1 L nei colori verde chiaro, giallo paglierino, arancione, rosso, fucsia, viola, grigio, blu scuro, turchese, azzurro, riempite come sopra;
- capsule Petri, su cui venivano seminate, rispettivamente, 100 e 200.000 cellule di *E. coli safe*;
- contenitore cilindrico in acciaio del diametro di cm 38 e altezza di cm 38, ricoperto con pellicola trasparente in cellophane per isolamento da possibili inquinanti, contenente litri 40 di acqua deionizzata in cui venivano inoculati, rispettivamente, 350  $\mu$ l (OD = 0,16) e 2 ml (OD = 1,9) di coltura di *E. coli safe*.

Le bottiglie di PET incolore, di vetro trasparente incolore e di vetro trasparente colorato, poste su un ripiano ricoperto con foglio di carta stagnola riflettente, sono state esposte alla luce solare, in campo aperto.

Le capsule Petri sono state esposte alla luce solare in serra. Il contenitore cilindrico in acciaio da litri 40 è stato esposto alla luce solare in un esperimento all'aperto e in un esperimento in serra.

### Sperimentazione con luce solare in campo aperto su *Escherichia coli* DH-10B

Nel periodo giugno settembre viene effettuata una serie di esperimenti per studiare l'effetto dell'illuminazione con luce solare in campo aperto su *Escherichia coli* DH-10B al variare di:

- colore della luce
- concentrazione cellulare
- volume trattato
- illuminamento
- tempi di esposizione

I dettagli delle condizioni sperimentali sono riportati nella legenda alla Tabella 2. In tutti gli esperimenti è stato ottenuto un abbattimento della carica batterica del 100%, tranne nel caso in cui la concentrazione cellulare era di 3590 cell/ml in cui si è ottenuto un abbattimento pressoché nullo (Tabella 2)

**Tabella 2** Effetto sull'attività antibatterica della luce solare in campo aperto su *Escherichia coli* DH-10B con tempo di esposizione 6 h

	07/06/2013	17/06/2013	20/06/2013	25/06/2013	04/09/2013
contenitore	<b>a)</b>	<b>b)</b>	<b>c)</b>	<b>d)</b>	<b>e)</b>
quantità di acqua (L)	1 L	0,75 L	0.75 L	1 L	40 L
illuminamento (lux)	140.000-150.000	140.000-150.000	140.000-150.000	140.000-160.000; 22.000 su bottiglia blu scuro	120.000 esterni 100.000 sul fondo senz'acqua
tempo di esposizione (ore)	6	6	6	2	2
conc batterica iniziale (cell/ml)	3.590	97	890	850	200
% di riduzione batterica	~ 100%	100%	100%	100%	100%

Note: L'irraggiamento veniva effettuato su sospensioni cellulari contenute in: **a)** e **c)** 1 bottiglia di PET trasparente incolore, 1 bottiglia di vetro trasparente incolore, 9 bottiglie di vetro trasparente nei colori viola, blu, turchese, verde chiaro, giallo paglierino, arancione, fucsia, rosso, grigio; **b)** 3 bottiglie di PET trasparente incolore, 1 bottiglia di vetro trasparente incolore, 9 bottiglie di vetro trasparente nei colori viola, blu, turchese, verde chiaro, giallo paglierino, arancione, fucsia, rosso, grigio; **d)** 3 bottiglie di PET trasparente incolore, 1 bottiglia di vetro trasparente incolore, 10 bottiglie di vetro trasparente nei colori viola, blu, blu scuro, turchese, verde chiaro, giallo paglierino, arancione, fucsia, rosso, grigio; **e)** sospensione cellulare in contenitore cilindrico in acciaio con diametro di cm 38 e altezza di cm 38.

Poiché l'irradiazione del sole estivo produceva un elevato riscaldamento sulle bottiglie, è stato posto il quesito se l'abbattimento batterico non fosse causato dall'illuminamento o dall'aumento di temperatura, o da entrambi questi fattori. Per rispondere a questa domanda, si è deciso di esporre le bottiglie alla luce solare in serra, con temperatura mantenuta tra 28° e 32° circa.

### **Sperimentazione con luce solare in serra**

Nel periodo giugno settembre viene effettuata una serie di esperimenti per studiare l'effetto dell'illuminazione con luce solare in serra a temperatura controllata compresa tra 28° e 32°, tempo di esposizione 2 h, su *Escherichia coli* DH-10B al variare di:

- colore della luce
- concentrazione cellulare
- volume trattato
- illuminamento

I dettagli delle condizioni sperimentali sono riportati nella legenda alla Tabella 3. I risultati ottenuti, e riportati in Tabella 3, indicano che all'aumentare della concentrazione cellulare si riduce l'azione battericida della luce.

Per rispondere al quesito se l'abbattimento batterico fosse causato dall'irradiazione dell'acqua contenente i microrganismi in sospensione, è stato deciso di irradiare le cellule batteriche seminate direttamente su piastra.

**Tabella 3. Effetto della concentrazione cellulare sulla attività antibatterica della luce solare in serra su *Escherichia coli* DH-10B con tempo di esposizione 2 h**

<b>Data della sperimentazione</b>	28 giugno 2013	28 giugno 2013	28 giugno 2013	13 settembre 2013
Contenitore <sup>§</sup>	<b>a)</b>	<b>b)</b>	<b>c)</b>	<b>d)</b>
Quantità di acqua (L)	0,75	0,050	0,050	40
<b>Illuminamento (lux)</b>	7.900 - 24.000	50.000 - 60.000 all'esterno delle piastre; 40.000 -50.000 all'interno	140.000 -150.000, con calo dopo 3 ore	5.000 sul fondo del contenitore nella parte in ombra; 40.000 sul fondo nella parte in luce, senz'acqua; 37.000 - 66.000 sulla superficie dell'acqua
<b>Popolazione batterica iniziale</b>	1.000 cellule/ml	855 cellule/piastra	20.000 cellule/piastra	13.450 cellule/ml
<b>Riduzione della popolazione (%)</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>94,5%</b>	<b>84%</b>

L'irraggiamento veniva effettuato su: **a)** sospensioni cellulari contenute in 3 bottiglie di PET trasparente incolore, 1 bottiglia di vetro trasparente incolore, 10 bottiglie di vetro trasparente nei colori viola, blu, blu scuro, turchese, verde chiaro, giallo paglierino, arancione, fucsia, rosso, grigio; **b)** e **c)** cellule seminate su 4 capsule Petri; **d)** sospensione cellulare in contenitore cilindrico in acciaio con diametro di cm 38 e altezza di cm 38.

### ***Commenti relativi alla sperimentazione con luce solare***

- La sperimentazione con luce solare ha prodotto tassi di abbattimento batterico significativamente superiori a quelli ottenuti col proiettore *Tonal* (Tabella 1), a prescindere dalla lunghezza d'onda della radiazione filtrata nelle bottiglie di vetro colorato; ciò può essere messo in relazione con i valori generalmente più elevati di illuminamento della luce solare rispetto a quella prodotta dal proiettore *Tonal*.
- Poiché negli esperimenti col proiettore *Tonal* sono stati osservati valori diversi di abbattimento batterico con diverse lunghezze d'onda, negli esperimenti con la luce solare sono state usate bottiglie di vetro trasparente di vari colori, per produrre irradiazioni con diverse lunghezze d'onda. La riduzione della carica batterica è stata del 100% a prescindere dal colore delle singole bottiglie. Questo risultato, se da un

lato non ha permesso di valutare un possibile effetto delle varie lunghezze d'onda, dall'altro ci dice che al di sopra di una certa soglia di illuminamento la lunghezza d'onda della luce diventa un fattore poco rilevante. La radiazione ultravioletta viene filtrata in modo diverso nelle diverse lunghezze d'onda dal vetro delle bottiglie, maggiormente le radiazioni UV-B rispetto alle UV-A.

- Allo stesso tempo, il volume del liquido trattato e la concentrazione batterica iniziale hanno giocato un ruolo non trascurabile nel limitare l'effetto depurativo, con efficienza minore al crescere delle concentrazioni e/o del volume.
- I risultati ottenuti con semina di *E. coli* su capsule Petri suggeriscono che la presenza dell'agente gelificante (agar) non ha influenza sul processo depurativo.
- Durante la sperimentazione effettuata con luce solare in campo aperto si è prodotto un elevato aumento di temperatura delle bottiglie; gli esperimenti in serra, a temperatura controllata tra 28 e 32°C indicano che la temperatura non influisce in modo significativo sul processo depurativo.

### Sperimentazione con luce artificiale (proiettore a led)

Sono state effettuate 3 serie di esperimenti in serra a temperatura controllata, compresa tra 22° e 24°C, per valutare l'effetto della luce a led, nella lunghezza d'onda del visibile, sull'abbattimento della carica batterica dopo 2 ore di esposizione.

In Tabella 4 vengono riportati i risultati ottenuti e i dati relativi alla concentrazione batterica iniziale, l'illuminamento sul campione, e la tipologia dell'esperimento se in coltura o su piastra.

**Tabella 4 Effetto dell'intensità di illuminamento, ottenuto con luce artificiale (proiettore a led), sull'attività antibatterica su *Escherichia coli* DH-10B con tempo di esposizione 2h**

	8 novembre 2013	8 novembre 2013	11 novembre 2013
contenitore	contenitore cilindrico in acciaio $\phi$ cm 38, altezza cm 38	4 capsule Petri $\phi$ 90 mm	2 serie di capsule Petri $\phi$ 90 mm
quantità di acqua (L)	40	0,050	0,050
illuminamento (lux)	6.000 - 8.000 sul fondo del contenitore 8.600 - 12.000 alla quota del pelo libero dell'acqua	12.500 lux	26.000 lux sulla prima serie 87.000 lux sulla seconda
concentrazione batterica iniziale	10.000 cellule/ml	40.000 cellule	1.000 cellule
% di riduzione batterica	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>100%</b>

- Si è dimostrato che non vi è morte cellulare in assenza di illuminamento, il titolo vitale della coltura mantenuta al buio, dopo 8 ore dalla semina, essendo di 480 UFC in media su piastra, laddove le UFC iniziali erano 286 (poiché il valore finale di 480 non è lontano dal raddoppio del valore iniziale di 286, non solo non vi è morte cellulare, ma le cellule hanno quasi fatto una divisione cellulare). Come controllo negativo, la stessa sospensione cellulare di 1000 cell/ml veniva mantenuta al buio per 2 ore: non si ebbe variazione nel numero di cellule.

- Sulla base dei risultati ottenuti, ovvero il forte abbattimento della carica batterica di *E. coli* seminato su capsule Petri, e irradiazione solare in serra, si potrebbe ipotizzare che l'effetto fotochimico non dipenda dalla presenza dell'acqua in cui le cellule sono sospese. Non si può escludere tuttavia che i fotoni incidenti sui batteri provochino modificazioni dell'acqua intracellulare e tali modificazioni siano la causa della letalità cellulare.
- E' stato dimostrato che il PET, utilizzato nel metodo SODIS, non influenza la potabilizzazione dell'acqua, in quanto gli stessi valori di abbattimento sono stati ottenuti inoculando i batteri in bottiglie di vetro.
- Si è rilevato che l'illuminamento, la concentrazione batterica iniziale e la quantità di liquido da depurare giocano un ruolo significativo nel processo di riduzione della carica batterica.

La sperimentazione è stata proseguita con luce artificiale per definire le soglie dei valori di illuminamento e concentrazione oltre le quali si ha una sopravvivenza batterica  $\leq 10\%$  della concentrazione iniziale con irradiazione per tempi di 2 ore o inferiori.

### ***Possibili ricadute applicative***

Per i trattamenti delle acque reflue a livello industriale, è stato evidenziato da diversi operatori del settore (comunicazioni personali) interesse applicativo per abbattimenti di 5 volte di microrganismi come *E. coli* partendo da una concentrazione iniziale di 250 cell/ml in un tempo non superiore a 2 ore in seguito a trattamento con luce artificiale. Sulla base di queste considerazioni, i risultati ottenuti col proiettore *Tonal* e riportati in Tabella 1 danno una sopravvivenza a 2 ore che rientra solo in un caso nei parametri richiesti. Si riportano di seguito i valori di Tabella 1 relativi a questo caso.

<b>Tipo di luce e <math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Illuminamento (lux) §</b>	<b>Concentrazione iniziale di cellule (cell/ml)</b>	<b>sopravvivenza a 2h</b>	<b>sopravvivenza a 6h</b>
510 verde	5.500 <b>7.600</b> 11.200	190	<b>17 %</b>	<b>12 %</b>

§ I valori dell'illuminamento: 5.500, **7.600** e 11.200 lux sono misurati rispettivamente a base beaker, *livello liquido*, becco beaker.

Si sottolineano i valori dell'illuminamento relativi a questo esperimento: 5.500, **7.600** e 11.200 lux misurati, rispettivamente: a base beaker, *livello liquido*, becco beaker.

Nel corso del 2014 è proseguita la sperimentazione precedente, mirata a valutare la capacità battericida della luce, in particolare irradiando acque prelevate sul territorio parmense, contenenti Coliformi totali, Enterococchi fecali ed *Escherichia coli*, oltre alle sospensioni di *Escherichia coli safe* in acqua, con diversi valori di illuminamento, diversi contenitori e diversi tempi.

L'irradiazione è avvenuta tramite proiettore DISANO RODIO 3 dotato di lampada JM-T da 400 Watt, 35.000 lumen, 4.500 K.

Contemporaneamente, si è proceduto ad irradiare con luce visibile – tramite lampade da 60 Watt, con vetro, rispettivamente, trasparente e di colore rosso, verde, blu - acqua proveniente dall'acquedotto pubblico della Spezia, al fine di misurare le modificazioni nella composizione chimico – fisica dei campioni.

### **Sperimentazione su acque prelevate dal territorio**

In questo capitolo viene descritta la sperimentazione relativa allo studio dell'attività antibatterica esercitata dalla luce su campioni di acque di acquedotti fornite da Montagna 2000, una società partecipata che gestisce i servizi idrici nel comprensorio della montagna Parmense, nei Comuni soci. I campioni delle acque reflue venivano prelevati dall'acquedotto di Fucinello e dall'acquedotto di Fornovo.

Nel corso del 2014 è proseguita la sperimentazione precedente, mirata a valutare la capacità battericida della luce, in particolare irradiando acque prelevate sul territorio parmense, contenenti Coliformi totali, Enterococchi fecali ed *Escherichia coli*, oltre a *Escherichia coli* DH-10B, con diversi valori di illuminamento, diverse tipologie di contenitori e diversi tempi.

L'irradiazione è avvenuta tramite proiettore DISANO RODIO 3 dotato di lampada JM-T da 400 Watt, 35.000 lumen, 4.500 K.

Contemporaneamente, si è proceduto a irradiare con luce visibile – tramite lampade da 60 Watt, con vetro trasparente incolore o di colore rosso, verde, blu - acqua proveniente dall'acquedotto pubblico della Spezia, al fine di misurare le modificazioni nella composizione chimico – fisica dei campioni.

### **Sperimentazione con luce artificiale (proiettore DISANO RODIO 3)**

Nel maggio 2014 è stata fatta la sperimentazione mirata a valutare l'effetto dell'irraggiamento con luce artificiale emessa dal proiettore DISANO RODIO 3 sui campioni d'acqua forniti dall'Ente Montagna 2000, gestore del ciclo idrico per i Comuni dell'Appennino Parmense.

Nei giorni 6, 13 e 21 maggio Montagna 2000 ha fornito 6 campioni di acqua da potabilizzare, provenienti, rispettivamente, da:

- sorgente “Fucinello”
- pozzo “Micone”
- gallerie filtranti

Per ogni tipologia sono stati forniti 2 campioni (uno da esporre ad irradiazione luminosa e l'altro per controllo) che dopo il trattamento sono stati consegnati al laboratorio ACEL SERVICE S.r.l. di Langhirano (PR) per le analisi batteriologiche.

I campioni da trattare sono stati esposti, entro 3 beaker di vetro, contemporaneamente a circa 100.000 lux (valore medio delle misure effettuate in vari punti al di sopra dei beaker) per un'ora, con distanza tra la superficie del liquido e il vetro del proiettore di 26 cm. Avendo ogni beaker diametro di 125 mm e area interna di 122.65 cm<sup>2</sup>, eseguendo la conversione lux – watt si ottengono circa 42 watt per 3 beaker. Poiché il proiettore utilizzato ha una lampada da 400 Watt, la potenza dissipata risulta molto elevata.

Vengono di seguito riportati i risultati ottenuti irradiando i diversi campioni di acquedotto forniti da Montagna 2000.

**Tabella 5 Effetto dell'esposizione a luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3, 100.000 lux per 60 minuti, sull'attività antibatterica in acque prelevate dall'acquedotto di Fornovo gallerie filtranti**

	Prima del trattamento	Dopo trattamento	Unità di misura	Valori limite (D.Lgs. n.31/2001)
carica batterica a 36°C	<1	12	UFC/ml	/
carica batterica a 22°C	<1	12	UFC/ml	/
Coliformi	2	2	UFC/100 ml	0
<i>E. coli</i>	0	0	UFC/100 ml	0
Enterococchi fecali	0	0	UFC/100 ml	0

L'irraggiamento non ha prodotto diminuzioni nelle concentrazioni batteriche. L'aumento osservato nella carica batterica viene attribuito alle manipolazioni dei campioni.

Limitatamente ai parametri analizzati il campione d'acqua non risponde ai requisiti microbiologici di qualità per il consumo umano indicati nel D.Lgs. 31/2001 e successive modifiche ed integrazioni.

**Tabella 6 Effetto dell'esposizione a luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3, 100.000 lux per 60 minuti, sull'attività antibatterica in acque prelevate dall'acquedotto di Fornovo pozzo Micone**

	Prima del trattamento	Dopo trattamento	Unità di misura	Valori limite (D.Lgs. n.31/2001)
carica batterica a 36°C	39	27	UFC/ml	/
carica batterica a 22°C	64	49	UFC/ml	/
Coliformi	2	2	UFC/100 ml	0
<i>E. coli</i>	1	1	UFC/100 ml	0
Enterococchi fecali	0	0	UFC/100 ml	0

Il trattamento non ha prodotto modificazioni sostanziali della carica batterica e non ha ridotto la concentrazione di coliformi ed *E. coli*. Limitatamente ai parametri analizzati il campione d'acqua non risponde ai requisiti microbiologici di qualità per il consumo umano indicati nel D.Lgs. 31/2001 e successive modifiche ed integrazioni.

**Tabella 7 Effetto dell'esposizione a 100.000 lux per 60 minuti di luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3, sull'attività antibatterica in acque prelevate dall'acquedotto Fucinello sorgente tal quale**

	Prima del trattamento	Dopo trattamento	Unità di misura	Valori limite (D.Lgs. n.31/2001)
carica batterica a 36°C	<1	<1	UFC/ml	/
carica batterica a 22°C	<1	<1	UFC/ml	/
Coliformi	15	2	UFC/100 ml	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	UFC/100 ml	0
Enterococchi fecali	0	0	UFC/100 ml	0

Il trattamento ha ridotto la concentrazione dei coliformi senza azzerarla, pertanto il campione d'acqua anche dopo trattamento non risponde ai requisiti microbiologici di qualità per il consumo umano indicati nel D.Lgs. 31/2001 e successive modifiche ed integrazioni.

**Tabella 8 Effetto dell'esposizione a luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3, 100.000 lux per 60 minuti, sull'attività antibatterica in acque prelevate dall'acquedotto di Fornovo gallerie filtranti**

	Prima del trattamento	Dopo trattamento	Unità di misura	Valori limite (D.Lgs. n.31/2001)
carica batterica a 36°C	<1	<1	UFC/ml	/
carica batterica a 22°C	130	130	UFC/ml	/
Coliformi	1	1	UFC/100 ml	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	UFC/100 ml	0
Enterococchi fecali	0	0	UFC/100 ml	0

Il trattamento non ha prodotto cambiamenti nelle concentrazioni batteriche pertanto il campione d'acqua anche dopo trattamento non risponde ai requisiti microbiologici di qualità per il consumo umano indicati nel D.Lgs. 31/2001 e successive modifiche ed integrazioni.

**Tabella 9 Effetto dell'esposizione a luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3, 100.000 lux per 60 minuti, sull'attività antibatterica in acque prelevate dall'acquedotto Fornovo pozzo Micone**

	Prima del trattamento	Dopo trattamento	Unità di misura	Valori limite (D.Lgs. n.31/2001)
carica batterica a 36°C	<1	<1	UFC/ml	/
carica batterica a 22°C	48	22	UFC/ml	/
Coliformi	2	2	UFC/100 ml	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	UFC/100 ml	0
Enterococchi fecali	0	0	UFC/100 ml	0

Il trattamento ha prodotto un dimezzamento della carica batterica a 22°C, ma non ha ridotto la concentrazione di coliformi pertanto il campione d'acqua anche dopo trattamento non risponde ai requisiti microbiologici di qualità per il consumo umano indicati nel D.Lgs. 31/2001 e successive modifiche ed integrazioni.

**Tabella 10 Effetto dell'esposizione a luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3, 100.000 lux per 60 minuti, sull'attività antibatterica in acque prelevate dall'acquedotto di Fucinello sorgente**

	Prima del trattamento	Dopo trattamento	Unità di misura	Valori limite (D.Lgs. n.31/2001)
carica batterica a 36°C	<1	<1	UFC/ml	/
carica batterica a 22°C	34	32	UFC/ml	/
Coliformi	9	0	UFC/100 ml	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	UFC/100 ml	0
Enterococchi fecali	0	0	UFC/100 ml	0

Il trattamento effettuato 13 maggio 2014 ha prodotto limitata diminuzione della carica batterica a 22°C e totale abbattimento della concentrazione dei coliformi, pertanto il campione d'acqua dopo trattamento risponde ai requisiti microbiologici di qualità per il consumo umano indicati nel D.Lgs. 31/2001 e successive modifiche ed integrazioni.

**Tabella 11 Effetto dell'esposizione a luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3, 242.000 lux per 60 minuti, sull'attività antibatterica in acque prelevate dall'acquedotto di Fornovo gallerie filtranti**

	Prima del trattamento	Dopo trattamento	Unità di misura	Valori limite (D.Lgs.n.31/2001)
carica batterica a 36°C	<1	<1	UFC/ml	/
carica batterica a 22°C	<1	<1	UFC/ml	/
Coliformi	3	0	UFC/100 ml	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	UFC/100 ml	0
Enterococchi fecali	0	0	UFC/100 ml	0

Il trattamento ha prodotto diminuzione della concentrazione delle specie batteriche presenti, pertanto il campione d'acqua dopo trattamento risponde ai requisiti microbiologici di qualità per il consumo umano richiesti dalla legge.

**Tabella 12 Effetto dell'esposizione a luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3, 242.000 lux per 60 minuti, sull'attività antibatterica in acque prelevate dall'acquedotto di Fornovo pozzo Micone**

	Prima del trattamento	Dopo trattamento	Unità di misura	Valori limite (D.Lgs. n.31/2001)
carica batterica a 36°C	240	31	UFC/ml	/
carica batterica a 22°C	290	47	UFC/ml	/
Coliformi	2	0	UFC/100 ml	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	UFC/100 ml	0
Enterococchi fecali	0	0	UFC/100 ml	0

Il trattamento ha prodotto notevole diminuzione della carica batteriche sia a 36°C che a 22°C e azzeramento dei coliformi; pertanto il campione d'acqua dopo trattamento risponde ai requisiti microbiologici di qualità per il consumo umano richiesti dalla legge.

**Tabella 13 Effetto dell'esposizione a luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3, 242.000 lux per 60 minuti con profondità dell'acqua di 1,4 cm, sull'attività antibatterica in acque prelevate dall'acquedotto di Fucinello sorgente.**

	Risultati prima del trattamento	Risultati dopo il trattamento	Unità di misura	Valori limite (D.Lgs. n.31/2001)
carica batterica a 36°C	14	<1	UFC/ml	/
carica batterica a 22°C	16	<1	UFC/ml	/
Coliformi	3	0	UFC/100 ml	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	UFC/100 ml	0
Enterococchi fecali	0	0	UFC/100 ml	0

Il trattamento ha prodotto notevole riduzione della carica batteriche sia a 36°C che a 22°C e azzeramento dei coliformi, pertanto il campione d'acqua dopo trattamento risponde ai requisiti microbiologici di qualità per il consumo umano richiesti dalla legge.

La sperimentazione descritta in questo capitolo ha riguardato lo studio dell'attività antibatterica esercitata dalla luce su campioni di acque di acquedotti fornite da Montagna 2000. La sperimentazione è stata condotta irradiando i campioni con luce artificiale emessa da proiettore Disano Rodio, con valori di illuminamento da 100000 a 250000 lux.

In un solo caso riportato in Tabella 5 vi è un incremento della carica batterica dopo il trattamento: questo effetto viene attribuito a contaminazione. Nei successivi esperimenti i valori rimangono uguali o, più frequentemente, diminuiscono.

- nelle tabelle 6, 8, 9, 10, 12 la carica batterica a 22 °C, sia prima che dopo trattamento, è maggiore o molto maggiore della carica batterica a 36 °C: ciò dipende dal fatto che a 36 °C crescono pochi microorganismi, i mesofili, mentre a 22 °C crescono i microorganismi provenienti dai pozzi in cui sono stati prelevati i campioni d'acqua, in numero maggiore o molto maggiore rispetto ai mesofili;
- negli esperimenti sono stati osservate alcune "oscillazioni" nei valori della concentrazione dopo i trattamenti: la "variabilità" può attribuirsi a contaminazione, scarsa omogeneizzazione dei campioni d'acqua esaminati (cioè alla differente concentrazione dei solidi sospesi, che fungono da schermo per i batteri nei confronti della luce incidente), a condizione di stress dei batteri (che, in questo caso, non formano colonie), alla variabilità delle analisi, o a combinazioni di questi fattori.

### Sperimentazione su acque reflue da scarico industriale

In questo capitolo viene descritta la sperimentazione relativa allo studio dell'attività antibatterica esercitata dalla luce su campioni di acque reflue fornite da Montagna 2000. I campioni delle acque reflue venivano prelevati dal depuratore di Fornovo, dal depuratore di Rubbiano e dall'azienda alimentare.

Per ognuno dei campioni venivano forniti campioni da 1,5 litri, necessari per effettuare per due esperimenti e un controllo, che venivano mantenuti refrigerati fino alla fine delle prove.

Vengono di seguito riportati i risultati ottenuti irradiando i diversi campioni di acquedotto forniti da Montagna 2000.

**Tabella 14. Effetto del trattamento con luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3 con esposizione a 293.000 lux per 60 minuti sull'attività antibatterica in acque prelevate da impianto di depurazione azienda alimentare.**

	Valori Prima del trattamento	Valori dopo trattamento senza fotocatalisi <b>a)</b>	Valori dopo trattamento con fotocatalisi <b>b)</b>	Unità di Misura	Valori limite per scarico in acque superficiali *
<i>Escherichia coli</i>	3.600	0	0	UFC/100 ml	5000

**a)** 500 ml di acqua in contenitore di plastica (cm 23 x 23 x 2) esposti a 300.000 lux per 60 minuti, con profondità iniziale dell'acqua di cm 0,945 (senza fotocatalisi)

**b)** 500 ml di acqua in contenitore di plastica (cm 14 x 21,5 x 5), contenente mattonella fotocatalizzatrice bianca al biossido di titanio dello spessore di 1 cm, esposti a 293.000 lux per 60 minuti, con profondità iniziale dell'acqua di cm 1,66 (con fotocatalisi)

\*Valori limite per scarico in acque superficiali richiesti dal Decreto Legislativo n°152/2006, Tabella III.

Il trattamento con luce visibile ha prodotto il 100% di abbattimento della concentrazione di *Escherichia coli*, sia con che senza fotocatalisi. Questi risultati non ci permettono di capire se la presenza delle mattonelle fotocatalizzatrici possano incrementare l'effetto battericida della luce.

**Tabella 15 Effetto del trattamento con luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3 per 60 minuti, senza e con fotocatalisi, su cellule di *Escherichia coli* in acque prelevate dal depuratore di Rubbiano S. Agnese**

Specie	Valori prima del trattamento	Valori dopo trattamento senza fotocatalisi <b>a)</b>	Valori dopo trattamento con fotocatalisi <b>b)</b>	Unità di Misura	Valori limite per scarico in acque superficiali *
<i>E. coli</i>	3.200	0	0	UFC/100 ml	5000

**a)** 500 ml di acqua in contenitore di plastica (cm 23 x 23 x 2) esposti a 300.000 lux per 60 minuti, con profondità iniziale dell'acqua di cm 0,945 (senza fotocatalisi)

**b)** 500 ml di acqua in contenitore di plastica (cm 14 x 21,5 x 5), contenente mattonella fotocatalizzatrice bianca al biossido di titanio dello spessore di 1 cm, esposti a 293.000 lux per 60 minuti, profondità iniziale dell'acqua cm 1,66 (con fotocatalisi)

\* Valori limite per scarico in acque superficiali richiesti dal Decreto Legislativo n°152/2006, Tabella III.

Il trattamento con luce visibile ha prodotto il 100% di abbattimento della concentrazione di *Escherichia coli*, sia con che senza fotocatalisi. Questi risultati non ci permettono di capire se la presenza delle mattonelle fotocatalizzatrici possano incrementare l'effetto battericida della luce.

**Tabella 16. Effetto del trattamento con luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3 con e senza fotocatalisi per 60 minuti, su cellule di *Escherichia coli* prelevata dall'impianto depurazione di Fornovo capoluogo**

	Prima del trattamento	Dopo trattamento senza fotocatalisi	Dopo trattamento con fotocatalisi	Unità di Misura	Valori limite per scarico in acque superficiali *
<i>E. coli</i>	45	0	0	UFC/100ml	5000

500 ml di acqua di scarico in contenitore di plastica (cm 23 x 23 x 2), esposti a 300.000 lux per 60 minuti, con profondità iniziale dell'acqua di cm 0,945 (senza fotocatalisi)

• 500 ml di acqua di scarico in contenitore di plastica (cm 14 x 21,5 x 5), contenente mattonella fotocatalizzatrice bianca al biossido di titanio dello spessore di 1 cm, esposti a 293.000 lux per 60 minuti, con profondità iniziale dell'acqua di cm 1,66 (con fotocatalisi).

\* Valori limite per scarico in acque superficiali richiesti dal Decreto Legislativo n°152/2006, Tabella III.

Il trattamento con luce visibile ha prodotto il 100% di abbattimento della concentrazione di *Escherichia coli*, sia con che senza fotocatalisi. Questi risultati non ci permettono di capire se la presenza delle mattonelle fotocatalizzatrici possano incrementare l'effetto battericida della luce.

## Sperimentazione dell'irraggiamento a tempi brevi

In questo capitolo viene descritta la sperimentazione relativa allo studio dell'attività antibatterica esercitata dalla luce su colture campioni di *Escherichia coli* DH 10B mirate alla identificazione delle condizioni sperimentali in grado di abbattere la carica batterica in tempi brevi irraggiando il campione con luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3.

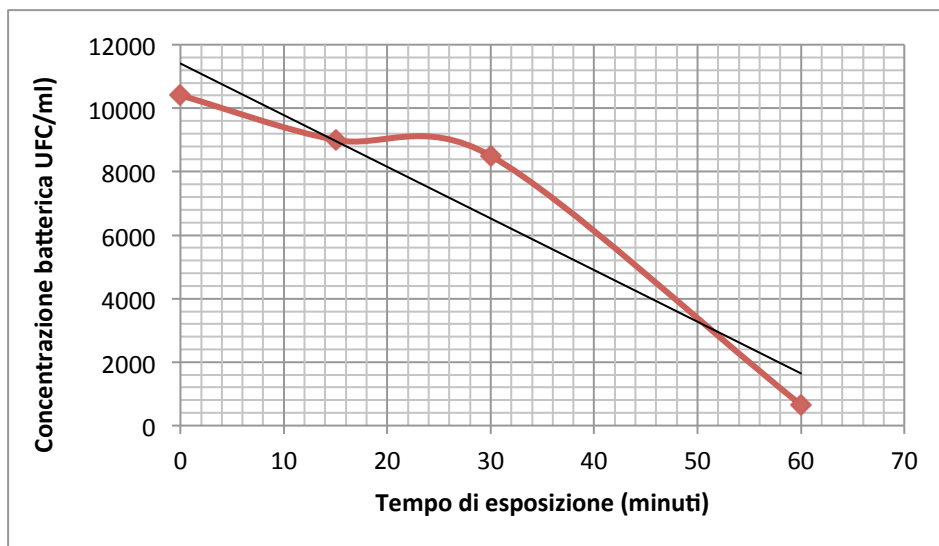
La determinazione della carica batterica veniva effettuata con due metodi: filtrazione; inclusione in LBA.

I risultati ottenuti vengono riportati nelle Tabelle 17 e 18 e nelle Figure 14-17 ad esse relative.

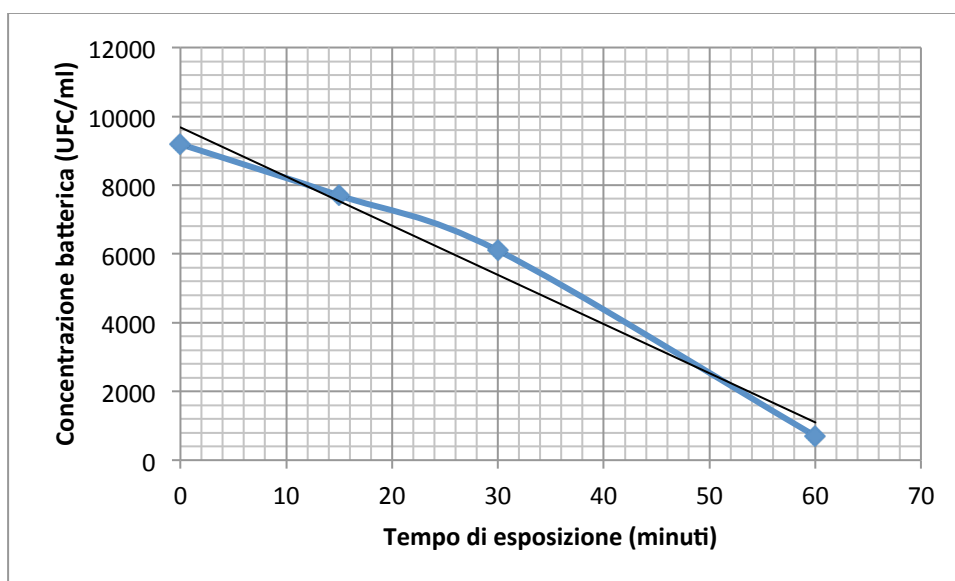
**Tabella 17. Effetto del trattamento con luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3 con esposizione a 200.000 lux per 15, 30, 60 minuti su cellule di *Escherichia coli* DH 10B**

Tempo di trattamento	Filtrazione UFC/100 ml	Filtrazione % di riduzione	Inclusione in LB UFC/100 ml	Inclusione in LB % di riduzione
0'	10.400		9.200	
15'	9.000	13 %	7.700	16%
30'	8.500	18 %	6.100	34%
60'	650	94 %	700	92%

La sospensione cellulare di *Escherichia coli* DH-10B in acqua (500 ml) posta in contenitore di plastica (14 x 21.5 x 5 cm) con foglio di carta stagnola sul fondo, viene esposta 200.000 lux per 15, 30, 60 minuti. La profondità dell'acqua è di 1,66 cm. La determinazione della concentrazione cellulare viene effettuata sia per filtrazione sia per inclusione in LBA.



**Figura 18.** Il grafico descrive l'andamento dei valori di carica batterica determinati mediante filtrazione e riportati in Tabella 17.

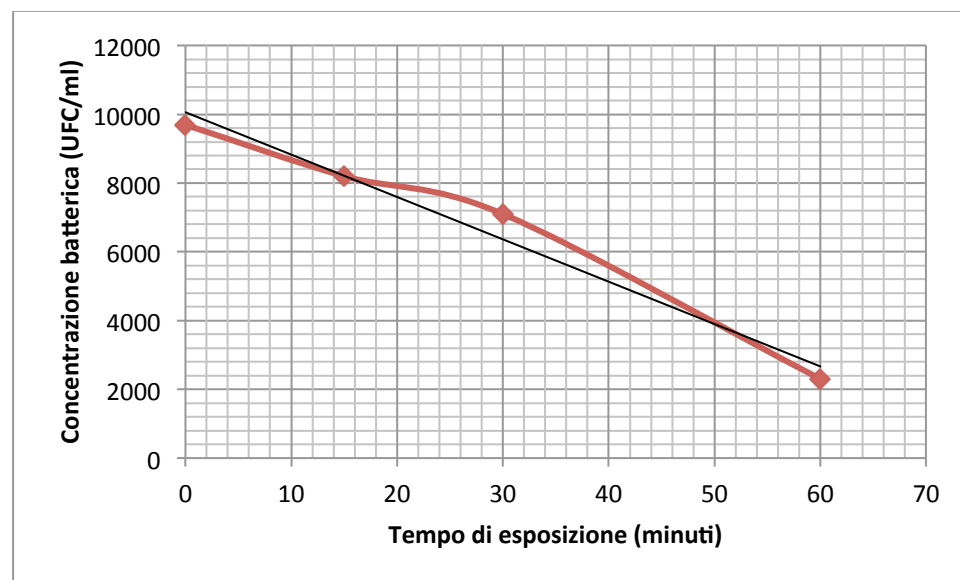


**Figura 19.** Il grafico descrive l'andamento dei valori di carica batterica determinati mediante inclusione in LBA e riportati in Tabella 17.

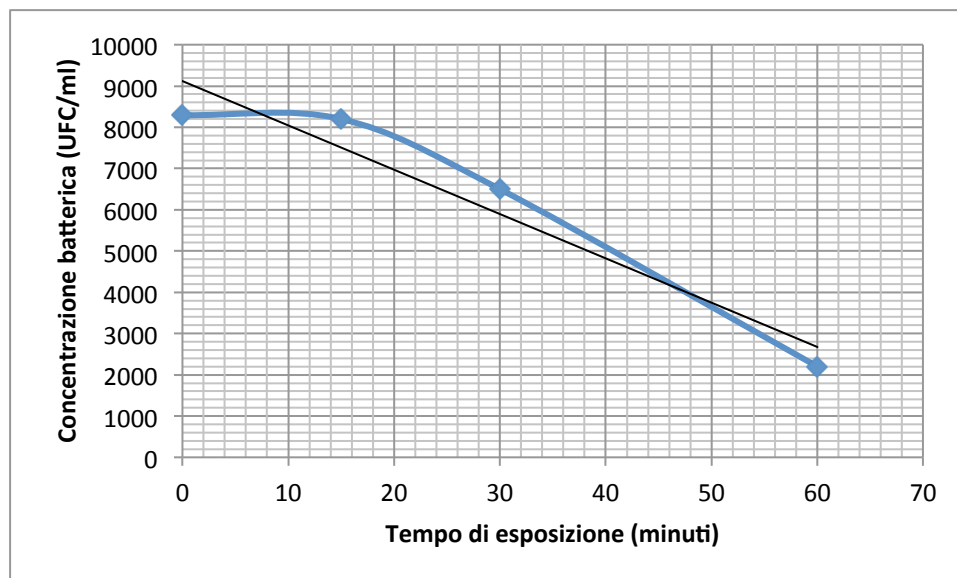
**Tabella 18** Effetto del trattamento con luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3 con esposizione a 200.000 lux per 15, 30, 60 minuti su cellule di *Escherichia coli* DH 10B

Tempo di trattamento	filtrazione UFC/100 ml	filtrazione % di riduzione	inclusione in LB UFC/100 ml	inclusione in LB % di riduzione
0'	9.700		8.300	
15'	8.200	15 %	8.200	1%
30'	7.100	27 %	6.500	22%
60'	2.300	76 %	2.200	73%

La sospensione cellulare di *Escherichia coli* DH-10B in acqua (500 ml) posta in contenitore di plastica (14 x 21.5 x 5 cm) con foglio di carta stagnola sul fondo, viene esposta 200.000 lux per 15, 30, 60 minuti. La profondità dell'acqua è di 1,66 cm. La determinazione della concentrazione cellulare viene effettuata sia per filtrazione sia per inclusione in LBA.



**Figura 20.** Il grafico descrive l'andamento dei valori di carica batterica determinati mediante filtrazione e riportati in Tabella 18.



**Figura 21.** Il grafico descrive l'andamento dei valori di carica batterica determinati mediante inclusione in LBA e riportati in Tabella 18.

I risultati ottenuti nella sperimentazione effettuata a tempi 15', 30' 45' 60' indicano una chiara risposta tempo/effetto e ci dicono che a tempi brevi il sistema illuminante utilizzato non risulta adeguato per ottenere risultati soddisfacenti con trattamenti a tempi brevi.

Lo sviluppo della ricerca ha riguardato l'identificazione di strategie mirate all'ottimizzazione del processo depurativo (battericida) mediante diverse strategie:

Abbiamo quindi deciso di

- a. valutare gli effetti di filtri nella regione blu-viola con proiettore DISANO RODIO 3, 400 Watt, dal momento che nella sperimentazione iniziale si era ottenuto un buon risultato con luce blu, ma non completamente soddisfacente a causa dell'enorme abbattimento dell'illuminamento causato dal filtro
- b. valutare i valori di illuminamento che in funzione della tipologia del contenitore relative all'incremento dell'illuminamento
- c. utilizzare di foto catalizzatori per ottenere un eventuale effetto sinergico nell'abbattere la carica batterica.

I risultati delle misure di illuminamento sono riportati in Tabella 19:

**Tabella 19. Determinazione dei valori di illuminamento prodotti da proiettore da 400 Watt in assenza e in presenza di filtri**

	contenitore di legno	contenitore di legno con filtro blu	contenitore di legno con filtro viola	contenitore fotocatalizzatore	contenitore fotocatalizzatore con filtro blu	contenitore fotocatalizzatore con filtro viola
lux misurati a livello del liquido (7,5 cm dal vetro del proiettore)	350.000	60.000	15.000	282.000	51.000	11.000

Le misure di illuminamento vengono effettuate sia su contenitore di legno, internamente smaltato di bianco con azione riflettente la luce, avente dimensioni interne 20 x 20 x 31 cm sia su contenitore realizzato con mattonelle fotocatalizzatrici Active Clean Air, avente dimensioni interne 20 x 20 x 30 cm

L'abbattimento estremamente elevato dell'illuminamento, prodotto dai filtri blu e viola, ha impedito di effettuare la sperimentazione con l'uso dei filtri; pertanto si è proceduto alla sperimentazione successiva in assenza di filtri.

03/04 settembre 2014

scarico industriale

**Tabella 20** Effetto del trattamento con luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3 con esposizione a 200.000 lux per 15, 30, 60 minuti su cellule di coliformi totali ed *Escherichia coli* in acqua di scarico industriale.

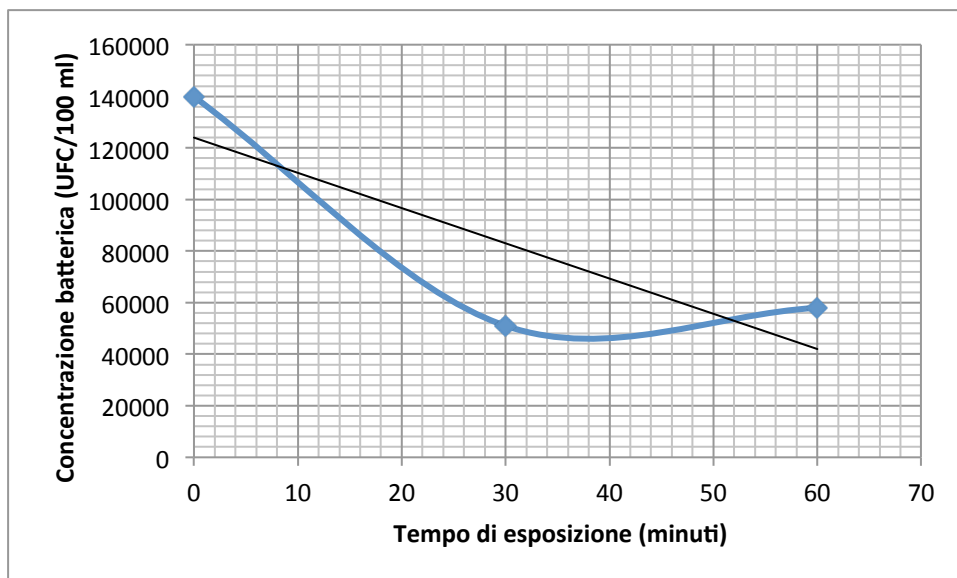
Specie	campione non trattato	campione trattato <b>senza fotocatalisi</b> 200.000 lux 30'	campione trattato <b>con fotocatalisi</b> 200.000 lux 30'	campione trattato <b>senza fotocatalisi</b> 200.000 lux 60'	campione trattato <b>con fotocatalisi</b> 200.000 lux 60'
Coliformi totali UFC/100 ml	140.000	51.000	50.000	58.000	49.000
% di riduzione dei Coliformi totali		64%	64,3%	59%	65%
<i>Escherichia coli</i> UFC/100 ml	3.200	2.100	2.400	1.600	2.000
% di riduzione di <i>Escherichia coli</i>		34%	25%	50%	37.5%

Il trattamento veniva effettuato su 10 litri d'acqua da scarico industriale entro:

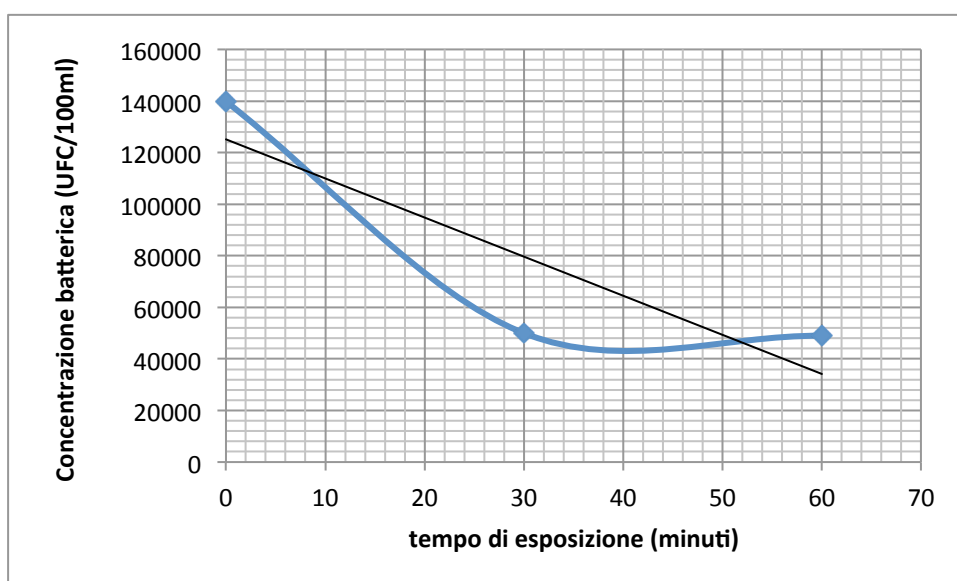
**a)** contenitore di legno, internamente smaltato di bianco con effetto riflettente la luce, avente dimensioni interne di 20 x 20 x 31 cm, esposti ad un illuminamento medio di 200.000 lux, rispettivamente per 30 e 60 minuti per gli esperimenti senza fotocatalisi

**b)** contenitore costituito da mattonelle fotocatalizzatrici Active Clean Air, avente dimensioni interne di 20 x 20 x 30 cm, esposti ad un illuminamento medio di 200.000 lux, rispettivamente per 30 e 60 minuti per gli esperimenti con fotocatalisi.

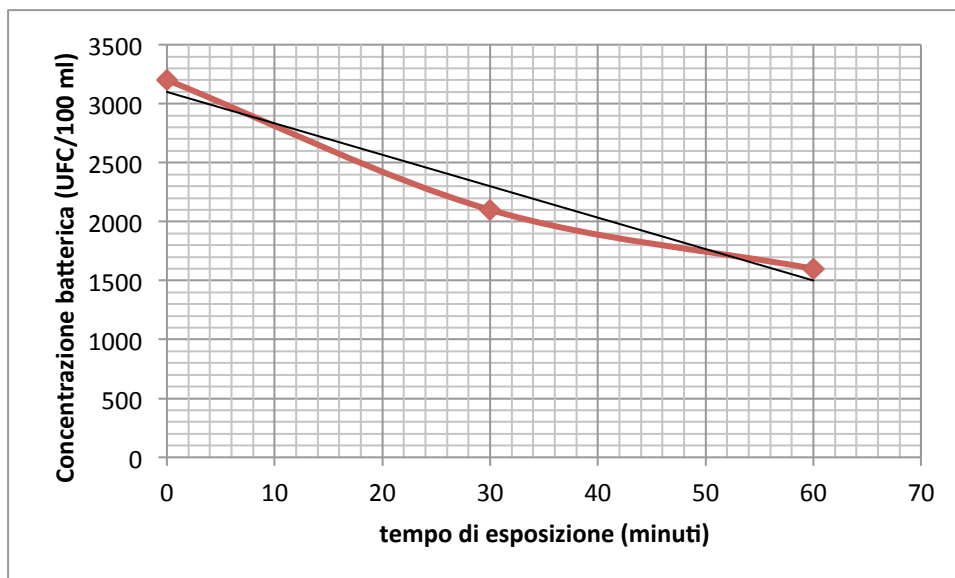
La determinazione della carica batterica veniva effettuata mediante filtrazione.



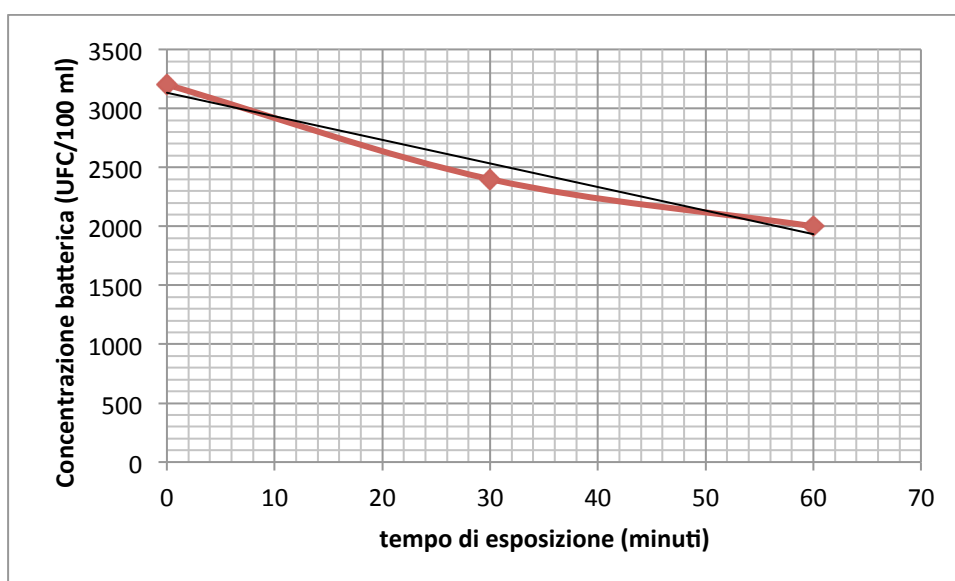
**Figura 22.** Il grafico descrive l'andamento dei valori di concentrazione di coliformi totali in seguito a irraggiamento senza fotocatalisi riportati in Tabella 20.



**Figura 23.** Il grafico descrive l'andamento dei valori di concentrazione di coliformi totali in seguito a irraggiamento con fotocatalisi riportati in Tabella 20.



**Figura 24.** Il grafico descrive l'andamento dei valori di concentrazione di *Escherichia coli* in seguito a irraggiamento senza fotocatalisi riportati in Tabella 20.



**Figura 25.** Il grafico descrive l'andamento dei valori di concentrazione di *Escherichia coli* in seguito a irraggiamento con fotocatalisi riportati in Tabella 20.

Al fine di ottenere risultati migliori, negli esperimenti successivi è stato aumentato il valore dell'illuminamento (compatibilmente con la potenza del proiettore in uso).

- Il 24 settembre 2014 Montagna 2000 ha fornito i campioni delle acque reflue provenienti da scarico industriale: 50 litri di acqua per 4 esperimenti, compiuti il 25 settembre 2014:

- 1) 10 litri di acque reflue sono stati esposti ad un illuminamento medio di circa 370.000 lux (valore max al centro della superficie del contenitore: 400.000 lux). La sospensione batterica

era contenuta in un recipiente a forma di parallelepipedo realizzato in legno smaltato internamente di bianco avente dimensioni interne di cm 20 x 20 x 31, sul fondo del quale era stato posto uno specchio;

2) 10 litri di acque reflue sono stati esposti come al punto 1), ma per 30 minuti;

3) 10 litri di acque reflue sono stati esposti come al punto 1), ma per 60 minuti;

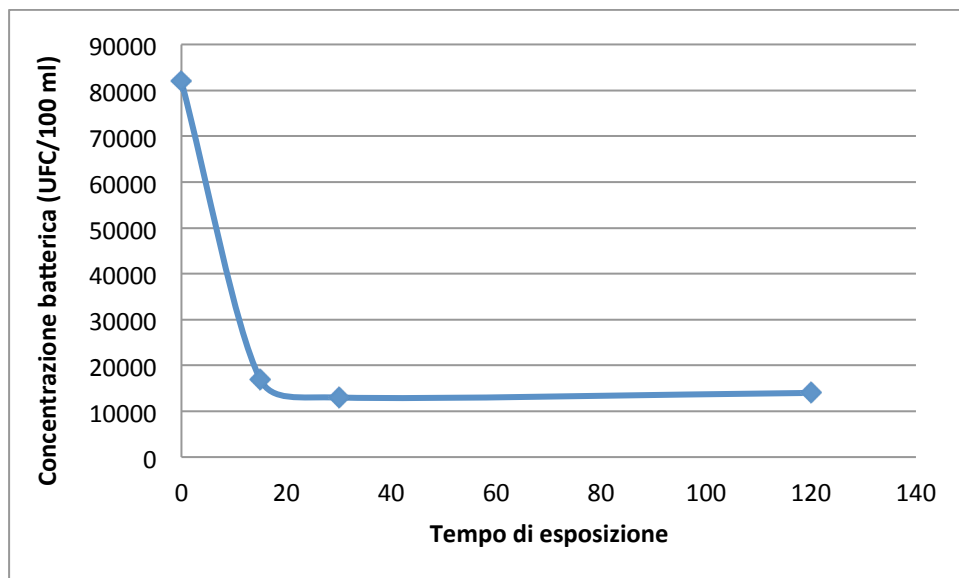
4) 10 litri di acque reflue sono stati esposti come al punto 1), ma per 120 minuti;

Non si è riscontrata evaporazione dell'acqua. La profondità del liquido entro il contenitore era di cm. 25,5, la distanza della superficie del liquido dal vetro del proiettore di cm. 6,5. La temperatura iniziale del liquido era di 18°C, quella finale di 21 °C dopo esposizione di 60 minuti, e di 25 °C dopo esposizione di 120 minuti. Essendo l'area del contenitore di legno di 400 cm<sup>2</sup>, eseguendo la conversione lux – watt si ottengono circa 170 watt effettivi, la dispersione di potenza risultando del 57,5%.

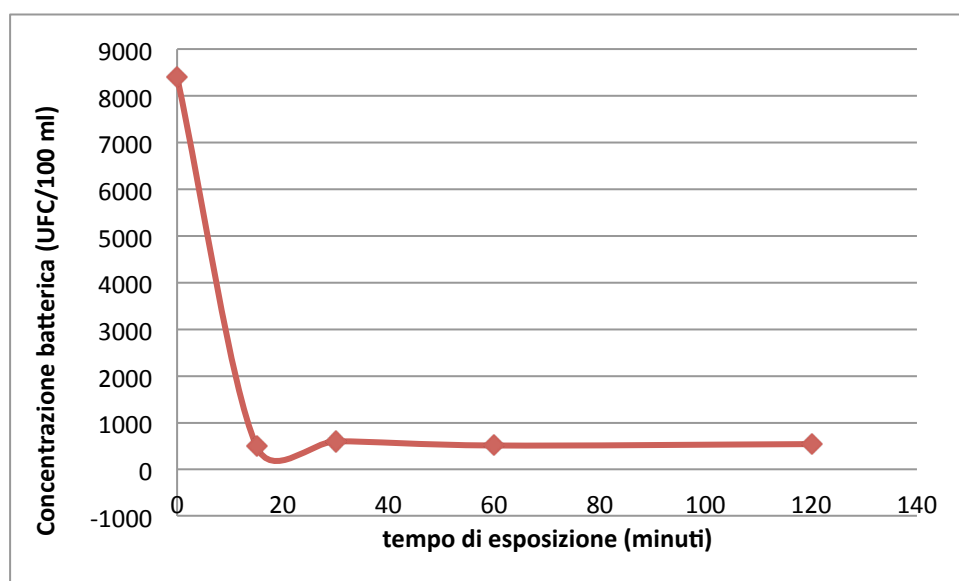
**Tabella 21 Effetto del trattamento con luce artificiale da Proiettore DISANO RODIO 3 con esposizione a 370.000 lux per 15, 30, 60 e 120 minuti su acque reflue provenienti da scarico industriale contenenti coliformi totali ed *Escherichia coli***

<b>Specie</b>	<b>campione non trattato</b>	<b>campione trattato 370.000 lux 15'</b>	<b>campione trattato 370.000 lux 30'</b>	<b>campione trattato 370.000 lux 60'</b>	<b>campione trattato 370.000 lux 120'</b>
Coliformi totali CFU/100 ml	82.000	17.000	13.000	inquinato	14.000
% riduzione dei Coliformi totali		79%	84%		83%
<i>E. coli</i> CFU/100 ml	8.400	500	600	510	540
% riduzione di <i>E. coli</i>		94%	93%	94%	93,6%

Il trattamento veniva effettuato su 10 litri entro contenitore di legno, internamente smaltato di bianco con azione riflettente la luce, avente dimensioni interne di 20 x 20 x 31 cm, con uno specchio sul fondo. La valutazione della concentrazione batterica, espressa in UFC/100ml, veniva fatta per filtrazione.



**Figura 26.** Il grafico descrive l'andamento dei valori di concentrazione di coliformi totali in seguito a irraggiamento riportati in Tabella 21



**Figura 27.** Il grafico descrive l'andamento dei valori di concentrazione di *Escherichia coli* in seguito a irraggiamento riportati in Tabella 21

#### ***Commenti relativi alla sperimentazione con proiettore DISANO RODIO 3***

- Gli esperimenti relativi, rispettivamente, alle tabelle 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, con esposizione di 1 litro di acqua entro beaker di vetro (diametro di 12,5 cm) a circa

100.000 lux per 60 minuti, hanno fornito solo diminuzioni parziali delle cariche batteriche e della concentrazione dei Coliformi, ma non di *Escherichia coli* e Enterococchi fecali;

- per ottenere risultati significativi - tabelle 14, 15 e 16 - con riduzione del 100% della concentrazione di *Escherichia coli* (partendo da concentrazioni iniziali, rispettivamente, di 3.600, 3.200 e 45 UFC/100ml), è stato necessario esporre 500 ml di acqua in bacinella di plastica (cm 23 x 23 x 2) a circa 300.000 lux per 60 minuti. Si sottolinea il fatto che la profondità iniziale dell'acqua (contenente i batteri) era, rispettivamente, di cm 0,945 e di cm 1,66, rientrando quindi nel campo della "laminazione";
- con i 4 esperimenti relativi alla tabella 21 ci si è avvicinati al massimo valore di illuminamento consentito dal proiettore DISANO RODIO 3, dotato di lampada da 400 Watt, 35.000 lumen: circa 370.000 lux (valore medio, con un valore max misurato di 400.000 lux). Ciò si è reso necessario per migliorare i risultati degli esperimenti relativi alla Tabella 20, ottenuti con un illuminamento di 200.000 lux;
- con l'illuminamento di 370.000 lux è stata ottenuta, nei tempi di esposizione di 15, 30, 60, 120 minuti, una riduzione del ceppo batterico *Escherichia coli* compresa tra il 93% e il 94%;
- un trend sostanzialmente simile, quantunque di minore entità, si è riscontrato per i Coliformi totali, per i quali si è ottenuto, nei tempi di 15 minuti, 30 minuti e 120 minuti, un abbattimento compreso tra il 79% e l'84%;
- è plausibile che la differenza tra l'abbattimento ottenuto per Coliformi totali e quello per *Escherichia coli* possa essere collegato alla diversa concentrazione iniziale rispettivamente di 82.000 UFC/100 ml e di 8.400 UFC/100 ml, concentrazione iniziale da cui dipende la resa del sistema;
- si considera di potenziale interesse anche per scopi applicativi il fatto che i valori sopra scritti siano stati ottenuti anche in trattamenti effettuati per tempi brevi: 15 minuti;
- poiché la profondità dell'acqua contenente i batteri entro il contenitore era di cm. 25,5, con gli esperimenti riportati e i dati ottenuti si apre la prospettiva di superare il metodo della "laminazione", impiegato con la radiazione UV, per il quale la profondità dell'acqua non supera i 10 cm. Si ritiene, tuttavia, necessario utilizzare proiettori di maggiore potenza (fino a 2 Kw), in grado di fornire flussi luminosi fino a 220.000 lumen e illuminamenti verosimilmente non inferiori al milione di lux. Risulta altresì

necessario utilizzare ottiche progettate al fine di concentrare la radiazione luminosa sui contenitori, così limitando le eccessive dispersioni di potenza riscontrate.

### **Attività chimico – fisica della luce visibile**

Sono state eseguite irradiazioni di campioni da 1,5 litri d'acqua sia minerale sia dell'acquedotto della Spezia, entro contenitore cilindrico in acciaio inox, tramite lampade da 60 Watt nelle bande dei colori bianco, rosso, verde, blu.

Le successive analisi chimico-fisiche dei campioni di acqua non trattata e trattata sono state effettuate presso i laboratori di chimica degli Istituti "D.Chiodo" e "N.Sauro" della Spezia e presso il laboratorio "ARYA srl" di Massa (MS), dove sono stati determinati i valori di pH, la conducibilità, la durezza e la concentrazione degli ioni sodio, potassio, calcio e magnesio.

Di seguito vengono riportati i dati ottenuti relativi a una serie di parametri per ognuno degli esperimenti effettuati. I risultati degli esperimenti dall'1 al 4 vengono riassunti in Tabella 22.

#### **1) 11/12 febbraio 2014**

#### **Irradiazione di lt 1,5 di acqua Uliveto**

- colore della lampada:	blu
- durata dell'irradiazione:	15 ore
- distanza lampada – livello acqua	28 cm
- pH controllo:	5,8
- pH trattato:	6 ↑
- conducibilità controllo:	1.380 $\mu\text{S}/\text{cm}$
- conducibilità trattato:	1.450 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ↑
- durezza controllo (in gradi francesi):	26
- durezza trattato (in gradi francesi):	47 ↑
- illuminamento:	2.300 lux a livello acqua

Le misure di pH, conducibilità e illuminamento sono state effettuate presso l'IPSIA D. Chiodo, le misure di durezza presso l'Istituto Nautico.

**2) 25/26 marzo 2014****Irradiazione di lt 1,5 di acqua Uliveto**

- colore della lampada:	blu
- durata dell'irradiazione:	15 ore
- distanza lampada – livello acqua	28 cm
- pH controllo:	5,9
- pH trattato:	6 ↑
- conducibilità controllo:	1.180 µS/cm
- conducibilità trattato:	1.320 µS/cm ↑
- durezza controllo (in gradi francesi):	52
- durezza trattato (in gradi francesi):	110 ↑
- illuminamento:	2.300 lux a livello acqua

**3) 31 marzo/1 aprile 2014****Irradiazione di lt 1,5 di acqua Sangemini**

- colore della lampada:	blu
- durata dell'irradiazione:	15 ore
- distanza lampada – livello acqua	28 cm
- pH controllo:	6,2
- pH trattato:	7,4 ↑
- conducibilità controllo:	1.390 µS/cm
- conducibilità trattato:	1.185 µS/cm ↓
- durezza controllo (in gradi francesi):	10,2
- durezza trattato (in gradi francesi):	12 ↑
- illuminamento:	2.300 lux a livello acqua

Note: dopo il trattamento, nel contenitore c'è abbondante precipitato bianco

**4) 7/8 aprile 2014****Irradiazione di lt 1,5 di acqua Sangemini**

- colore della lampada:	blu
- durata dell'irradiazione:	15 ore
- distanza lampada – livello acqua	28 cm
- pH controllo:	6,2
- pH trattato:	7,4
- conducibilità controllo:	1.390 µS/cm
- conducibilità trattato:	1.190 µS/cm ↓
- durezza controllo (in gradi francesi):	10,2
- durezza trattato (in gradi francesi):	12,2 ↑
- illuminamento:	2.300 lux a livello acqua

**Tabella 22 Effetto dell'irraggiamento di acque minerali Uliveto e Sangemini con luce artificiale prodotta tramite lampada da 60 Watt di colore blu, per 16 ore, su pH, conducibilità, durezza e concentrazione degli ioni sodio, potassio, calcio e magnesio.**

	11-12 febbraio 2014	25-26 marzo 2014	31 marzo - 01 aprile 2014	07-08 aprile 2014
tipo di acqua	Uliveto	Uliveto	Sangemini	Sangemini
pH dell'acqua non trattata	5,8	5,9	6,2	6,2
pH dell'acqua trattata	6 ↑	6 ↑	7,4 ↑	7,4 ↑
conduttività dell'acqua non trattata (μS/cm)	1.380	1.180	1.390	1.390
conduttività dell'acqua trattata (μS / cm)	1.450 ↑	1.320 ↑	1.185 ↓	1.190 ↓
durezza dell'acqua non trattata (gradi francesi)	26	52	10,2	10,2
durezza dell'acqua non trattata (gradi francesi)	47 ↑	110 ↑	12 ↑	12,2 ↑

I campioni venivano irraggiati entro contenitore cilindrico in acciaio inox, tramite lampade da 60 Watt nelle banda del blu con illuminamento sulla superficie dell'acqua di 2.300 lux e distanza lampada – superficie dell'acqua di 28 cm.

Le analisi chimico-fisiche dei campioni venivano effettuate presso i laboratori di chimica degli Istituti "D.Chiodo" e "N.Sauro" della Spezia e presso il laboratorio "ARYA srl" di Massa (MS).

Di seguito vengono riportati i dati ottenuti relativi a una serie di parametri per ognuno degli esperimenti effettuati. I risultati degli esperimenti dal 5 al 9 vengono riassunti in Tabella 23.

**5) 23/24 aprile 2014**

**Irradiazione di lt 1,5 di acqua di acquedotto prelevata presso IPSIA D.Chiodo, La Spezia**

- colore della lampada:	blu
- durata dell'irradiazione:	16 ore
- distanza lampada – livello acqua	28 cm
- pH controllo:	7,73
- pH trattato:	9,18 ↑
- conducibilità controllo:	444 µS/cm
- conducibilità trattato:	441 µS/cm ↓
- durezza controllo (in gradi francesi):	13,3
- durezza trattato (in gradi francesi):	15,4 ↑
- illuminamento:	2.300 lux a livello acqua
- illuminamento:	2.300 lux a livello acqua

**6) 7/8 maggio 2014**

**Irradiazione di lt 1,5 di acqua di acquedotto prelevata presso IPSIA D.Chiodo, La Spezia**

- colore della lampada:	trasparente (luce bianca)
- durata dell'irradiazione:	16 ore
- distanza lampada – livello acqua	28 cm
- pH controllo:	8,54
- pH trattato:	8,97 ↑
- conducibilità controllo:	425 µS/cm
- conducibilità trattato:	400 µS/cm ↓
- durezza controllo (in gradi francesi):	14,8
- durezza trattato (in gradi francesi):	15,65 ↑
- illuminamento:	2.450 lux a livello acqua

**7) 21/22 maggio 2014**

**Irradiazione di lt 1,5 di acqua di acquedotto prelevata presso IPSIA D.Chiodo, La Spezia**

- colore della lampada:	verde
- durata dell'irradiazione:	16 ore
- distanza lampada – livello acqua	28 cm
- pH controllo:	8,38
- pH trattato:	7,69 ↓
- conducibilità controllo:	535 µS/cm

- conducibilità trattato:	410 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ↓
- durezza controllo (in gradi francesi):	15,65
- durezza trattato (in gradi francesi):	15,1 ↓
- illuminamento	3.000 lux a livello acqua

Note: dopo il trattamento con luce verde, i valori di pH, conducibilità e durezza risultano diminuiti. Il campione di acqua per controllo (1 L) è stato tenuto per circa 24 ore in bottiglia di plastica blu, quantunque non esposta a luce diretta.

#### 8) 22/23 maggio 2014

#### Irradiazione di lt 1,5 di acqua di acquedotto prelevata presso IPSIA D.Chiodo, La Spezia

- colore della lampada:	blu
- durata dell'irradiazione:	16 ore
- distanza lampada – livello acqua	28 cm
- pH controllo:	7,50
- pH trattato:	8,08 ↑
- conducibilità controllo:	485 $\mu\text{S}/\text{cm}$
- conducibilità trattato:	530 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ↑
- durezza controllo (in gradi francesi):	non rilevata
- durezza trattato (in gradi francesi):	non rilevata
- [ione sodio] nel controllo:	15,7 mg/l
- [ione sodio] nel trattato:	17,3 mg/l ↑
- [ione potassio] nel controllo:	1,71 mg/l
- [ione potassio] nel trattato:	1,96 mg/l ↑
- [ione calcio] nel controllo:	64 mg/l
- [ione calcio] nel trattato:	76 mg/l ↑
- [ione magnesio] nel controllo:	7,30 mg/l
- [ione magnesio] nel trattato:	8,26 mg/l ↑
- metodi analitici:	ISS.BEC.041.Rev. 00 ISS.BEC.041.Rev. 00 ISS.BEC.031.Rev. 00 APAT CNR IRSA 2003 3030 APAT CNR IRSA 2003 3030
- illuminamento:	2.300 lux a livello acqua

Note: le misure di illuminamento sono state effettuate presso l'IPSIA "D. Chiodo", le misure di pH e conducibilità, nonché la misura della concentrazione degli ioni sodio, potassio, calcio e magnesio presso il laboratorio "ARYA srl", Via Massa Avenza n. 85, 54100 Massa

9) 28/29 maggio 2014

**Irradiazione di 1,5 litri di acqua di acquedotto prelevata presso IPSIA D.Chiodo, La Spezia**

- colore della lampada: rosso
- durata dell'irradiazione: 16 ore
- distanza lampada – livello acqua: 28 cm
- pH controllo: 7,89
- pH trattato: 7,98 ↑
- conducibilità controllo: 441 µS/cm
- conducibilità trattato: 490 µS/cm ↑
- durezza controllo (in gradi francesi): 15,0
- durezza trattato (in gradi francesi): 16,3 ↑
- illuminamento: 1.450 lux a livello acqua
- 

**Tabella 23 Effetto dell'irraggiamento con luce artificiale prodotta tramite lampada da 60 Watt, per 16 ore, di acqua di acquedotto prelevata presso IPSIA D. Chiodo, La Spezia su pH, conducibilità e durezza.**

	23-24 aprile 2014	7-8 maggio 2014	21-22 maggio 2014	22-23 maggio 2014	28-29 maggio 2014
colore della luce	blu	bianca	verde	blu	rosso
illuminamento sulla superficie dell'acqua (lux)	2.300	2.450	3.000	2.300	1.450
pH dell'acqua non trattata	7,73	8,54	8,38	7,5	7,89
pH dell'acqua trattata	9,18 ↑	8,97 ↑	7,69 ↓	8,08 ↑	7,98 ↑
conducibilità dell'acqua non trattata (µS / cm)	444	425	535	485	441
conducibilità dell'acqua trattata (µS / cm)	441 ↓			530 ↑	490 ↑
durezza dell'acqua non trattata (gradi francesi)	13,3	14,8	15,65		15,0
durezza dell'acqua trattata (gradi francesi)	15,4 ↑	15,65 ↑	15,1 ↓		16,3 ↑

I campioni d'acqua da 1,5 litri entro contenitore cilindrico in acciaio inox, venivano irradiati con luce artificiale prodotta tramite lampada da 60 Watt.

Note: dopo il trattamento con luce verde, i valori di pH, conducibilità e durezza risultano diminuiti. Il campione di acqua per controllo (1 L) è stato tenuto per circa 24 ore in bottiglia di plastica blu, quantunque non esposta a luce diretta

**Tabella 24 Effetto dell'irraggiamento di acque dell'acquedotto della Spezia con luce artificiale prodotta tramite lampada da 60 Watt di colore blu, per 16 ore, su pH, conducibilità, durezza e concentrazione degli ioni sodio, potassio, calcio e magnesio.**

pH dell'acqua non trattata	7,5
pH dell'acqua trattata	8,08 ↑
conduttività dell'acqua non trattata (μS / cm)	485
conduttività dell'acqua trattata (μS / cm)	530 ↑
[ione sodio] nell'acqua non trattata (mg/l)	15,7
[ione sodio] nell'acqua trattata (mg/l)	17,3 ↑
[ione potassio] nell'acqua non trattata (mg/l)	1,71
[ione potassio] nell'acqua trattata (mg/l)	1,96 ↑
[ione calcio] nell'acqua non trattata (mg/l)	64
[ione calcio] nell'acqua trattata (mg/l)	76 ↑
[ione magnesio] nell'acqua non trattata (mg/l)	7,30
[ione magnesio] nell'acqua trattata (mg/l)	8,26 ↑

I campioni d'acqua da 1,5 litri entro contenitore cilindrico in acciaio inox, venivano irradiati con luce artificiale prodotta tramite lampada da 60 Watt di colore blu, per 16 ore, con illuminamento sulla superficie dell'acqua di 2.300 lux e distanza lampada – superficie dell'acqua di 28 cm.

**Tabella 25 Riassuntiva delle tabelle 22, 23, 24**

	11-12 02/2014	25-26 03/2014	31/03- 01/04 2014	07-08 04/2014	23-24 04/2014	7-8 05/2014	21-22 05/2014	22-23 05/2014	28-29 05/2014
tipo di acqua	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>c</b>
colore della luce	blu	blu	blu	blu	blu	bianca	verde	blu	rosso
illuminamento a livello dell'acqua (lux)	2.300	2.300	2.300	2.300	2.300	2.450	3.000	2.300	1.450
pH dell'acqua non trattata	5,8	5,9	6,2	6,2	7,73	8,54	8,38	7,5	7,89
pH dell'acqua trattata	6	6	7,4	7,4	9,18	8,97	7,69	8,08	7,98
conducibilità acqua non trattata ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	1.380	1.180	1.390	1.390	444	425	535	485	441
conducibilità acqua trattata ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	1.450 ↑	1.320 ↑	1.185 ↓	1.190 ↓	441 ↓	400 ↓	410 ↓	530 ↑	490 ↑
durezza acqua non trattata (gradi francesi)	26	52	10,2	10,2	13,3	14,8	15,65	non rilevata	15,0
durezza acqua trattata (gradi francesi)	47 ↑	110 ↑	12 ↑	12,2 ↑	15,4 ↑	15,65 ↑	15,1 ↓	non rilevata	16,3 ↑
[ione sodio] nell'acqua non trattata (mg/l)								15,7	
[ione sodio] nell'acqua trattata (mg/l)								17,3 ↑	
[ione potassio] nell'acqua non trattata (mg/l)								1,71	
[ione potassio] nell'acqua trattata (mg/l)								1,96 ↑	
[ione calcio] nell'acqua non trattata (mg/l)								64	
[ione calcio] nell'acqua trattata (mg/l)								76 ↑	
[ione magnesio] nell'acqua non trattata (mg/l)								7,30	
[ione magnesio] nell'acqua trattata (mg/l)								8,26 ↑	

**a)** Uliveto; **b)** Sangemini; **c)** acquedotto

L'insieme dei risultati ottenuti nella sperimentazione volta a valutare una possibile attività fotochimica della luce visibile, ovvero le modificazioni del pH, della conduttività elettrica, della durezza, delle concentrazioni degli ioni sodio, potassio, calcio e magnesio osservate supportano l'ipotesi che l'effetto battericida della luce visibile sia da collegarsi al suo effetto fotochimico.

## 7. Discussione

L'effetto battericida della luce visibile risulta provato nella maggior parte degli esperimenti condotti con luce artificiale e luce solare.

Si ritiene di poter escludere che i campioni contenenti i batteri siano stati irradiati, contemporaneamente alla luce visibile, anche con la radiazione ultravioletta, sia perché esclusa da precedenti misurazioni – caso del *Tonal*, per cui l'emissione di UV venne esclusa da misurazioni precedentemente eseguite presso l'Università di Parma – sia perché tutti e tre i proiettori usati hanno la lampada schermata da lastra di vetro, che, com'è noto, esercita azione di blocco nei confronti delle radiazioni UV.

Per quanto concerne l'irradiazione con luce solare valgono considerazioni analoghe, perché essa è stata eseguita:

- su acqua contenuta in bottiglie di vetro
- su capsule Petri e contenitore cilindrico in acciaio da litri 40 all'interno di una serra con copertura schermante le radiazioni UV.

Si considera altresì generalmente ininfluenza l'effetto della radiazione infrarossa, pur presente - infatti la temperatura dell'acqua era prossima o superiore ai 50°C in alcuni esperimenti - perché gli esperimenti con luce solare condotti in serra a temperatura controllata tra 28 °C e 32 °C hanno prodotto abbattimenti della carica batterica compresi tra l'84% e il 100%, e perché negli esperimenti con luce artificiale condotti in laboratorio la temperatura finale del liquido non superava i 25 °C dopo esposizione di 120 minuti (con percentuali di abbattimento batterico superiori al 90%).

Le percentuali di abbattimento batterico ottenute nei vari esperimenti presentano elevata variabilità:

- variabilità delle concentrazioni iniziali dei ceppi batterici, in particolare nel caso di acque prelevate sul territorio, a valle di impianti di depurazione (Coliformi, Enterococchi fecali, *Escherichia coli*);
- necessità (precedente agli esperimenti) di individuare i parametri fondamentali che influenzano il processo depurativo, cioè illuminamento, tempo di esposizione, concentrazione batterica iniziale, volume del liquido contenente i batteri, profondità del liquido, lunghezza d'onda della luce incidente.

Non è stato possibile individuare in modo univoco l'ipotizzato valore di soglia della lunghezza d'onda della luce che scatena l'azione germicida, a causa dell'effetto attenuante esercitato dai filtri colorati interposti tra la luce "bianca" e i contenitori con i batteri. I filtri infatti causavano un deficit di illuminamento, rendendo il processo scarsamente efficace. Parimenti la lampada del videoproiettore (*Tonal*) presenta una banda di emissione che attenua l'illuminamento di colori come il rosso, il blu, il viola, etc. Per queste ragioni la maggior parte degli esperimenti che hanno fornito risultati significativi è stata condotta con luce "bianca" (4.500 K).

La ricerca svolta è stata focalizzata principalmente sui parametri:

- illuminamento;
- tempo di esposizione;
- concentrazione batterica iniziale;
- volume del liquido da depurare e profondità dello stesso.

L'insieme dei risultati ottenuti indica che l'illuminamento è il vero "motore" del processo, in grado, oltre determinate soglie, di rendere meno influente anche il tempo di esposizione.

Volendo stabilire un valore "limite" di depurazione, come obiettivo da perseguire nel corso della sperimentazione, è stata scelta la percentuale di riduzione batterica del 90%, tipica dei trattamenti con radiazione UV (la dose UV necessaria per la riduzione del 90% di una colonia batterica è indicata come D10 [Cabaj et al. 1996]). Questo modo di procedere ha consentito di "ancorare" la ricerca a valori di uso corrente nella tecnica dei trattamenti depurativi, ai quali fare riferimento per analizzare criticamente i risultati ottenuti con la luce visibile.

Su queste basi si è giunti alla progressiva esclusione del proiettore Acer PD523 da 2.500 lumen e del proiettore a led FARLIGHT FN104-80, che hanno dato risultati non adeguati per eventuali trattamenti depurativi. Peraltro, il lavoro svolto con essi è stato necessario, in quanto ha permesso di ottenere i valori di soglia dell'illuminamento e il tempo minimo di esposizione.

Premesso che la percentuale di abbattimento ( $\text{UFC finali/UFC iniziali} \times 100$ ) dipende dalla concentrazione batterica iniziale, non determinabile in modo univoco a priori, in particolare quando si tratta di prelievo dei campioni dal territorio, è stato necessario tenere conto di altri 2

parametri di notevole importanza: il volume del liquido e la profondità del contenitore, da cui dipende la superficie da esporre. In particolare per superfici ampie risulta difficile ottenere un valore di illuminamento costante: negli esperimenti effettuati i valori di illuminamento calcolati su diversi punti della superficie si sono dimostrati variabili, e si è fatto riferimento al loro valore medio. Questo a causa del fatto che le lampade in uso emettono un flusso luminoso generalmente variabile nello spazio.

Tuttavia, non si può prescindere dal fatto che i valori dell'illuminamento, del tempo di esposizione, del volume e della profondità del liquido sono parametri correlati, e pertanto non trattabili come variabili indipendenti.

Per quanto concerne la superficie del liquido da esporre - dopo aver individuato il valore di illuminamento efficace per volume/profondità - essa determina il numero di proiettori elettrici da utilizzare per emettere su tutta la superficie il suddetto illuminamento in modo più uniforme possibile, e dunque, in ultima analisi, il costo di impianto e quello successivo di esercizio.

Per concludere, si ritiene doveroso soffermarsi sui seguenti fatti:

- la percentuale di abbattimento del 100% per l'*Escherichia coli* è stata ottenuta con acqua "in lamina", cioè con profondità dell'ordine del cm;
- per superare la percentuale di abbattimento del 90% per l'*Escherichia coli* con campioni da 10 L, quindi con acqua non "in lamina" e concentrazione di *Escherichia coli* di 8.400 UFC/100 ml, è stato necessario aumentare l'illuminamento al valore medio di 370.000 lux, che ha fornito il suddetto superamento in 15, 30, 60 e 120 minuti di irradiazione. La necessità di riduzione dell'acqua in "lamina" è, viceversa, un limite noto della tecnica UV;
- particolare attenzione è stata posta nella verifica del metodo SODIS [McGuigan et al. 2012] alle nostre latitudini: bottiglie di PET incolore, di vetro incolore, di vetro trasparente di colore viola, blu, turchese, verde chiaro, giallo paglierino, arancione, fucsia, rosso, grigio, riempite ciascuna con 1 L o 0,75 L di acqua contenente *Escherichia coli safe* in diverse concentrazioni iniziali (da 97 cell/ml a 3.590 cell/ml), sono state esposte per tempi variabili, da 2 a 6 ore, alla luce solare in campo aperto, con illuminamento di 140.000 – 160.000 lux sopra le bottiglie, riscontrando riduzione batterica del 100%, a prescindere dalla tipologia della bottiglie (PET o vetro) e dal loro colore;

- esponendo quantità maggiori di liquido alla luce solare in campo aperto, cioè 40 L di acqua con concentrazione iniziale di 200 cell/ml, con 120.000 lux esternamente al contenitore, e 100.000 lux entro il contenitore, l'abbattimento batterico è stato del 100%, dopo 2 ore di esposizione alla luce solare;
- per quanto concerne la sperimentazione con luce solare in serra, le bottiglie sopra descritte, contenenti 0,75 L di acqua con concentrazione batterica di 1000 cell/ml, sono state esposte per 2 ore alla luce solare in serra, col duplice scopo di ridurre l'illuminamento e mantenere costante la temperatura. L'illuminamento era compreso tra 7.900 e 24.000 lux, e tra 28°C e 32°C la temperatura. La sopravvivenza dei microrganismi è stata nulla;
- seminando *E. coli* direttamente in piastra, con irradiazione di 2 ore alla luce solare, si è ottenuta riduzione del 100% con 100 cellule iniziali e riduzione del 94,5% con 20.000 cellule iniziali;
- esponendo 40 L di acqua con 13.450 cell/ml di *Escherichia coli safe*, per 2 ore, alla luce solare in serra, con temperatura compresa tra 28° e 31,6° e illuminamento compreso tra 37.000 e 66.000 lux sulla superficie dell'acqua, è stata ottenuta una percentuale di riduzione batterica dell' 84%.

**In sintesi:** i valori di riduzione batterica ottenuti con esposizione alla luce solare sono significativamente superiori a quelli ottenuti tramite luce artificiale (quantomeno con i 2 proiettori Acer PD523 e FARLIGHT FN104-80). Per avvicinarsi a questi valori è stato necessario utilizzare un proiettore, il DISANO RODIO 3, il grado di produrre un illuminamento prossimo a 400.000 lux. Questo valore è superiore al doppio dell'illuminamento misurato con la luce solare, in genere non superiore a 160.000 lux. Si sottolinea pertanto l'effetto intrinsecamente diverso della luce solare rispetto a quella artificiale.

E' stata poi dimostrata l'influenza non determinante della temperatura (non superiore a 32°C dentro la serra) e, quindi, della radiazione infrarossa, sul processo depurativo.

Inoltre l'azione schermante del vetro delle bottiglie e della copertura della serra nei confronti della radiazione ultravioletta ha dimostrato l'influenza non determinante anche dell'UV, che pertanto può essere sostituito, in determinate condizioni, dalla luce visibile.

Infine, i risultati ottenuti con semina diretta di *Escherichia coli safe* su capsule Petri hanno dimostrato che anche l'acqua, in cui i microrganismi sono stati sospesi negli altri esperimenti, non ha influenza sul processo depurativo in quanto terreno di coltura.

## 8. Conclusioni e prospettive future

Per ottenere risultati significativi di riduzione batterica con la luce artificiale (90% o superiori) è stato necessario impiegare un proiettore elettrico del tipo DISANO RODIO 3 a ioduri metallici dotato di lampada da 400 Watt, 35.000 lumen, 4.500 K.

Al fine di ottenere l'abbattimento del 100% della concentrazione iniziale di 3.600 UFC/100ml di *Escherichia coli* - in campione di 500 ml di acqua - è stato necessario raggiungere un valore di illuminamento medio di circa 300.000 lux, con esposizione di 60 minuti, in caso di acqua "in lamina", cioè con profondità iniziale dell'acqua di cm 0,945.

Viceversa, volendosi limitare a superare la percentuale di abbattimento del 90% (valore di riferimento nel trattamento con radiazione ultravioletta), ma in concentrazione iniziale superiore al doppio della precedente, cioè di 8.400 UFC/100 ml di *Escherichia coli* - in campione di 10 litri di acqua - è stato necessario raggiungere un valore di illuminamento medio di circa 370.000 lux, con varie esposizioni: 15, 30, 60, 120 minuti. Si ipotizza pertanto che, raggiunti determinati valori di illuminamento, l'apporto del tempo di esposizione al processo depurativo perda progressivamente influenza.

Il successivo e conseguente passaggio a soluzioni impiantistiche comporta l'utilizzo di proiettori aventi flusso luminoso superiore a 35.000 lumen e potenza elettrica superiore a 400 W, dotati di ottiche in grado di concentrare il flusso luminoso sui contenitori con i batteri, abbattendo in tal modo le perdite.

Per quanto concerne la depurazione con luce solare, ed in particolare il Metodo SODIS, gli esperimenti effettuati hanno enfatizzato l'azione disinfettante della luce visibile anche alle nostre latitudini [McGuigan et al. 2012]. Vale la pena di sottolineare che, sulla base della sperimentazione effettuata, possiamo affermare che l'azione depurativa della luce solare nei nostri esperimenti, effettuati con vetri schermanti in ambiente termostato attorno ai 30°C, non era dovuta né a radiazione ultravioletta né a radiazione infrarossa.

Circa l'attività fotochimica della luce, gli esperimenti svolti presso gli Istituti Tecnico-Professionali "Domenico Chiodo" e "Nazario Sauro" della Spezia, con irradiazione di acque potabili (minerali e di acquedotto) tramite lampade da 60 Watt di vetro trasparente e di vetro colorato, rispettivamente, di blu, verde, rosso, hanno evidenziato, con le relative analisi chimico-fisiche, modificazioni del pH, della conduttività elettrica, della durezza, delle concentrazioni degli ioni sodio, potassio, calcio e magnesio. Risultati analoghi, comprendenti anche aumenti degli ioni nitrato e solfato, lo scrivente aveva già riscontrato in esperimenti

effettuati in anni precedenti, a dimostrazione del fatto che i fotoni incidenti sull'acqua producono effetti ionizzanti su determinati atomi presenti nel liquido.

In particolare, si sottolinea l'aumento della concentrazione dello ione sodio – da 15,7 mg/L nel campione non trattato a 17,3 mg/L dopo l'irradiazione per 16 ore di L 1,5 di acqua di acquedotto con lampada blu da 60 Watt, quindi con potenza notevolmente inferiore a quella del proiettore DISANO RODIO 3.

***In sintesi:***

Le percentuali di abbattimento batterico hanno variato da alcuni punti percentuali al 100% della concentrazione iniziale, in funzione non lineare dei seguenti parametri:

- ceppo batterico
- concentrazione batterica iniziale
- illuminamento
- tempo di esposizione
- volume dell'acqua
- profondità dell'acqua

Nell'ambito di questi parametri, l'illuminamento svolge il ruolo più importante, rendendo, in alcuni casi, meno influente il tempo di esposizione. Le soglie di illuminamento da raggiungere variano, evidentemente, in funzione del volume dell'acqua contenente i microrganismi e della loro concentrazione iniziale.

Con riferimento al modello matematico ipotizzato all'inizio della ricerca (pag. 11):

$$\text{fattore di riduzione RID\%} = K \cdot I \cdot t \cdot f / V$$

dove

- K = costante che dipende dalla tipologia del ceppo batterico (da determinare)
- I = intensità del flusso luminoso [lumen]
- t = tempo di esposizione [minuti]
- f = frequenza della luce visibile [Hz]
- V = volume del liquido [litri]
- RID% = [(concentrazione pre-irradiazione del ceppo batterico – concentrazione post-irradiazione) / concentrazione pre-irradiazione] • 100

a posteriori si è rilevata l'elevata criticità connessa ad una modellizzazione matematica comprendente i vari aspetti di questi processi, per i seguenti motivi:

1) notevole difficoltà di effettuare gli esperimenti con identica concentrazione batterica iniziale;

2) natura tipicamente multivariabile dei processi;

3) le variabili illuminamento, tempo di esposizione, lunghezza d'onda, volume e profondità dell'acqua, concentrazione batterica iniziale, ceppo batterico sono a vario titolo correlate.

Tuttavia, per coerenza con quanto ipotizzato, il modello è rimasto come “linea guida”, portando alle seguenti conclusioni:

- non è stato possibile individuare il valore della costante  $K$ , a causa del numero troppo esiguo di ceppi batterici diversi esaminati;
- non è stato possibile discriminare i differenti effetti delle varie lunghezze d'onda, a causa delle riduzioni significative di illuminamento che si producevano al variare delle lunghezze d'onda;
- il valore di illuminamento (soglia) con il quale risulta opportuno trattare acqua “in lamina”, cioè con profondità dell'ordine del centimetro, è di circa 300.000 lux, con concentrazione iniziale non superiore a 3.600 UFC/100 ml ed esposizione di 60 minuti; in questo caso sono stati ottenuti abbattimenti del 100% con 500 ml di campione;
- il valore di illuminamento (soglia) con cui è stato possibile trattare acqua non “in lamina”, cioè con profondità dell'ordine di 25 cm e volumi di 10 L, si approssima ai 400.000 lux (valore medio 370.000 lux), anche se con concentrazione iniziale superiore: 8.400 UFC/100 ml per *Escherichia coli*. In tal caso, con esposizione di 60 minuti, la percentuale di riduzione batterica ha superato il 90%;
- per quanto concerne la soglia minima di illuminamento (al di sotto della quale l'aleatorietà diventa incontrollabile), viene stimata dell'ordine dei 1.000 lux con luce artificiale, 1 L di campione e circa 1.000 UFC/ml iniziali, ma con irradiazioni da 2 a 6 ore;
- il tempo di esposizione (soglia), per quanto scritto, viene stimato in 60 minuti;
- il volume corrispondente a 370.000 lux, 60 minuti, 90% di riduzione è, come scritto, 10 L.

Un'eventuale analisi statistica dei risultati ottenuti, oltre a richiedere un numero più elevato di esperimenti, dovrebbe fare riferimento a metodi multivarianza, di problematica realizzazione, interpretazione e utilità nel caso in esame, considerato soprattutto il fatto che l'aumento dell'illuminamento - fino ai valori limite consentiti dalla strumentazione in uso - ha fatto rilevare una progressiva perdita di significatività di alcune variabili, come il tempo e la concentrazione iniziale. Ciò si ritiene verosimile, a maggior ragione, con proiettori di potenza superiore.

Di conseguenza si auspica il proseguimento della ricerca con corpi illuminanti di maggiore potenza (2.000 Watt e 220.000 lumen), al fine di:

- proseguire gli studi sugli effetti battericidi della luce visibile
- investigare l'azione della luce visibile sui virus
- investigare l'azione della luce visibile sulle cellule umane
- studiare l'azione germicida delle varie lunghezze d'onda del visibile (si stima possibile filtrare la luce "bianca" dei proiettori da 2.000 Watt con filtri di vetro-cristallo colorato di diversi colori, senza abbattere l'illuminamento in modo tale da inibirne gli effetti, come accaduto, invece, con i proiettori impiegati)
- studiare l'azione germicida della luce "pulsata"
- progettare soluzioni impiantistiche derivanti dai risultati conseguiti.

## Segle, abbreviazioni e formule chimiche

cell	cellule
CFU	colony-forming units
$\text{ClO}^-$	ione clorito
cm	centimetri
DNA	acido desossiribonucleico
DBPs	dall'inglese "Disinfection By Products", contaminanti dell'acqua potabile
E.	Escherichia
HAAs	acidi aloacetici
HClO	acido ipocloroso
K	grado Kelvin
L	litri
LED	light-emitting diodes
man	manuale
ml	millilitri
MP	metodo di prova
$\text{NaClO}_2$	clorito di sodio ozono
nm	nanometri
OD	densità ottica
OH	radicale ossidrile
$\text{O}_3$	ozono
PET	polyethylene terephthalate
THM	trialometani
SODIS	solar disinfection
UFC	unità formanti colonia
UV	ultravioletto
UV-A	ultravioletto A: 400-315 nm
UV-B	ultravioletto B: 315-280 nm
UV-C	ultravioletto C: 280-100 nm
W	watt
$\lambda$	lunghezza d'onda della luce

## Bibliografia

- Andreozzi R., Caprio V., Insola A., Marotta R. (1999) Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today* 53:51-59
- Cabaj A., Sommer R., Schoenen D. (1996) Biodosimetry: model calculations for UV water disinfection devices with regard to dose distributions. *Water Research* 30:1003-1009
- Copperwhite R., McDonagh C., O'Driscoll S. (2012) A camera phone-based UV-dosimeter for monitoring the solar disinfection (SODIS) of water. *Sensors Journal* 12:1425-1426
- du Preez M., Conroy R.M., Ligondo S., Hennessy J., Elmore-Meegan M., Soita A., McGuigan K.G. (2011) Randomized intervention study of solar disinfection of drinking water in the prevention of dysentery in Kenyan children aged under 5 years. *Environmental Science & Technology* 45:9315–9323
- du Preez M., Conroy R.M., McGuigan K.G. (2012) Response to comment on "Randomized intervention study of solar disinfection of drinking water in the prevention of dysentery in Kenyan children aged under 5 years". *Environmental Science & Technology* 46:3036-3037
- Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J. (2000) *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology* 88:106S-116S
- Fisher M.B., Iriarte M., Nelson K.L. (2012) Solar water disinfection (SODIS) of *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., and MS2 coliphage: Effects of additives and alternative container materials. *Water Research* 46:1745-1754
- Fontan-Sainz M., Gomez-Couso H., Fernandez-Ibañez P., Ares-Mazas E. (2012) Evaluation of the solar water disinfection process (SODIS) against *Cryptosporidium parvum* using a 25-L static solar reactor fitted with a compound parabolic collector (CPC). *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 86:223-228
- Foster H.A., Ditta I.B., Varghese S., Steele A. (2011) Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90:1847-1868
- Harding A.S., Schwab K.J. (2012) Using limes and synthetic psoralens to enhance solar disinfection of water (SODIS): a laboratory evaluation with norovirus, *Escherichia coli*, and MS2. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 86:566-572

- Hijnen W.A.M., Beerendonk E.F., Medema G.J. (2006) Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research* 40:3-22
- Junli H., Li W., Nanqi R., Fang M., Juli (1997) Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research* 31:607-613
- Kasprzyk-Hordern B., Ziolk M., Nawrocki J. (2003) Catalytic ozonation and methods of enhancing molecular ozone reactions in water treatment. *Applied Catalysis B: Environmental* 46:639-669
- Keresztes S., Tatár E., Mihucz V.G., Virág I., Majdik C., Zárny G. (2009) Leaching of antimony from polyethylene terephthalate (PET) bottles into mineral water. *Science of the Total Environment* 407:4731-4735
- Kraemer S.M., Mosler H.-J. (2012) Effectiveness and effects of promotion strategies for behaviour change: solar water disinfection in Zimbabwe. *Applied Psychology* 61:392-414
- Leclerc H., Mossel D.A.A., Edberg S.C., Struijk C.B. (2001) Advances in the bacteriology of the coliform group: Their suitability as markers of microbial water safety. *Annual Reviews of Microbiology* 55:201-234
- Legrini O., Oliveros E., Braun A.M. (1993) Photochemical processes for water treatment. *Chemical Reviews* 93:671-698
- Li J.W., Yu Z., Cai X., Gao M., Chao F. (1996) Trihalomethanes formation in water treated with chlorine dioxide. *Water Research* 30:2371-2376
- Liang L., Singer P.C. (2003) Factors influencing the formation and relative distribution of haloacetic acids and trihalomethanes in drinking water. *Environmental Science & Technology* 37:2920-2928
- Loo S.-W., Fane A.G., Krantz W.B., Lim T.-T. (2012) Emergency water supply: A review of potential technologies and selection criteria. *Water Research* 46:3125-3151
- Mbonimpa E.G., Vadheim B., Blatchley E.R. III (2012) Continuous-flow solar UVB disinfection reactor for drinking water. *Water Research* 46:2344-2354
- McGuigan K.G., Conroy R.M., Mosler H.-J., du Preez M., Ubomba-Jaswa E., Fernandez-Ibañez P. (2012) Solar water disinfection (SODIS): A review from bench-top to roof-top. *Journal of Hazardous Materials* 235-236:29-46
- Meinhardt P.L. (2005) Water and bioterrorism: preparing for the potential threat to U.S. water supplies and public health. *Annual Reviews of Public Health* 26:213-237

- Richardson S.D., Ternes T.A. (2011) Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry* 83:4614-4648
- Schmid P. Kohler M., Meierhofer R., Luzi S., Wegel M. (2008) Does the reuse of PET bottles during solar water disinfection pose a health risk due to the migration of plasticisers and other chemicals into the water? *Water Research* 42:5054-5060
- Shannon M.A., Bohn P.W., Elimelech M., Georgiadis J.G., Mariñas B.J., Mayes A.M. (2008) Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature* 452:301-310
- Sintubin L., Awoke A.A., Wang Y., Van der Ha D., Verstraete W. (2012) Enhanced disinfection efficiencies of solar irradiation by biogenic silver. *Annals Of Microbiology* 62:187-191
- Taghipour F. (2004) Ultraviolet and ionizing radiation for microorganism inactivation. *Water Research* 38:3940-3948
- von Gunten U., Hoigné J. (1994) Bromate formation during ozonation of bromide-containing waters: interaction of ozone and hydroxyl radical reactions. *Environmental Science & Technology* 28:1234-1242
- Wegelin M., Canonica S., Mechsner K., Fleischmann T., Pesaro F., Metzler A. (1994) Solar water disinfection: Scope of the process and analysis of radiation experiments. *Aqua Journal Of Water Supply Research And Technology* 43:154–169
- Witkin E.M. (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews* 40:869-907
- World Health Organization (2002) Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*), in Guidelines for drinking-water quality (second edition) Addendum: Microbiological agents in drinking water. World Health Organization, Geneva, pp.70-118
- Zoeteman B.C.J., Hrubec J., de Greef E., Kool H.J. (1982) Mutagenic activity associated with by-products of drinking water disinfection by chlorine, chlorine dioxide, ozone and UV-irradiation. *Environmental Health Perspectives* 46:197-205

## **Ringraziamenti**

Desidero ringraziare il Prof. Nelson Marmioli, coordinatore del dottorato e mio docente guida, per aver creduto in questa attività di ricerca e averla resa possibile, e la Prof.ssa Iliana Ferrero, mia tutor, per la costanza, la pazienza e la gentilezza con cui mi ha seguito.

Uno speciale ringraziamento al Sig. Roberto Silva, al prezioso supporto e all'amicizia del quale sarò sempre riconoscente.

Si ringraziano le aziende e i laboratori che hanno partecipato alla ricerca.