

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI
BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI
CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA IN
TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI
VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA ANTI-BIOFILM DI SANITIZZANTI
COMMERCIALI

Tesi in
29570 – Progettazione Igienica e Sanificazione

Relatore:
Dott. Lorenzo Siroli

Correlatore:
Dott. Fabio Viviani

Candidato: Simone Camurani

Matricola N° 880576

Anno Accademico 2021/2022

Sessione unica

1	Acqua e microrganismi	4
1.1	Potabilità dell'acqua e parametri microbiologici	5
1.2	Metodi di sanificazione e conservazione dell'acqua.....	6
1.3	Microrganismi target delle procedure di disinfezione delle acque	8
1.3.1	Escherichia coli.....	8
1.3.2	Pseudomonas aeruginosa	9
2	Biofilm.....	10
2.1	Metodi di studio dei biofilm	10
2.2	Caratteristiche dei Biofilm.....	12
2.3	Resistenza a stress ambientali.....	14
2.4	Problematiche del biofilm nel sistema idrico.....	16
3	Obiettivo Sperimentale	17
4	Materiali e metodi.....	18
4.1	Prodotti antimicrobici testati nella sperimentazione.....	18
4.1.1	Legislazione del prodotto Amuchina soluzione disinfettante concentrata.....	19
4.2	Sanigen	19
4.2.1	Legislazione e principali utilizzi di "Sanigen"	20
5	Piano sperimentale	21
5.1	Valutazione delle concentrazioni minime inibenti (MIC) nei confronti di microrganismi patogeni.....	21
5.1.1	Preparazione della prova.....	21
5.2	Valutazione dell'attività antibiofilm	23
5.2.1	formazione del biofilm.....	23
5.2.2	Campionamento microbiologico dei campioni.....	27

Introduzione

Il sistema di distribuzione dell'acqua potabile (DWDS) `e una delle infrastrutture più importanti che raccolgono, trattano, immagazzinano e distribuiscono l'acqua dalla fonte al punto di utilizzo. Tuttavia, prima che l'acqua raggiunga il rubinetto, deve spesso scorrere attraverso chilometri di condotte idriche, il che può modificarne le caratteristiche di sicurezza e qualitative.

Un elemento intrinseco del DWDS sono i microrganismi che possono essere presenti in forma planctonica o più comunemente sotto forma di biofilm situato sulle superfici interne dei tubi. Il biofilm rappresenta una grande problematica nell'industria alimentare e anche in quella delle acque. Si stima infatti che delle cellule batteriche presenti in campioni di acqua, ben il 58% provenga dal biofilm. La presenza del biofilm non è solo un serbatoio di agenti patogeni, ma influisce anche su parametri qualitativi dell'acqua e favorisce la corrosione delle tubazioni. Numerose tossinfezioni causate da microrganismi patogeni come *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* sono state attribuite a contaminazioni associate all'acqua. La problematica è ancora più sentita per quelle acque che possono ristagnare per lungo tempo come quelle di serbatoi e cisterne. In questo contesto numerosi sanitizzanti sono stati proposti per la potabilizzazione e il mantenimento della sicurezza microbiologica dell'acqua. Tra questi composti a base cloro sono certamente quelli più utilizzati ma visto le nuove tendenze del mercato verso prodotti più naturali e sostenibili e a minore impatto ambientale anche nuove formulazioni sono state proposte.

In questo contesto, in questo lavoro di tesi è stata valutata l'efficacia antimicrobica e antibiofilm di un sanitizzante innovativo "SANIGEN" commercializzato dall'azienda Acquatravel rispetto a prodotti a base cloro tradizionali. Sono stati inoltre valutati gli effetti di potabilizzazione di filtri a fibre cave sempre forniti dall'azienda Acquatravel.

1 Acqua e microrganismi

L'acqua è uno degli elementi essenziali presenti sulla terra senza la quale la vita non potrebbe esistere; tuttavia ottenere acqua pulita e sicura, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, è diventata una sfida a causa della sua possibile contaminazione chimica e biologica. Malattie come il tifo, salmonellosi, colera ecc. possono essere causate da microrganismi presenti nell'acqua (Bhardwaj et al., 2021), una delle principali cause della contaminazione delle acque e dovuta alla presenza di microrganismi di origine fecale che possono provocare infezioni gastrointestinali, e quindi di vitale importanza attuare trattamenti di potabilizzazione dell'acqua prima di poterla bere o utilizzare nei processi alimentari (Bhardwaj et al., 2021). Questo aspetto è ancora più importante per acque di cisterne e serbatoi come nel caso di camper che presentano maggiori probabilità di contaminazione microbica e formazione di biofilm e nelle quali deve comunque essere garantita la sicurezza microbiologica.

Il numero e il tipo di microrganismi determinati nell'acqua corrente che scorre attraverso il sistema di distribuzione possono variare in base al:

1. il tipo di acqua trattata
2. il metodo di trattamento
3. la costruzione e il funzionamento del sistema di distribuzione (ad esempio, pressione e velocità del flusso d'acqua nella rete, tipo di materiale di installazione, residui disinfettanti)
4. stagioni

Il lungo tempo di permanenza dell'acqua nel sistema di distribuzione favorisce anche la degradazione del cloro residuo e la formazione di sottoprodotti della disinfezione, come i trialometani (THM) che hanno una elevata tossicità. L'impianto idraulico negli edifici deve affrontare ulteriori sfide, tra cui:

1. aumento del ristagno idrico
2. aumento della temperatura dell'acqua
3. tubi di piccolo diametro

Il lungo tempo di permanenza dell'acqua nel sistema, combinato con la temperatura superiore a 15 °C (causata dall'installazione in ambienti riscaldati o vicino a fonti di calore), favorisce l'intensificazione della moltiplicazione microbica.

1.1 Potabilità dell'acqua e parametri microbiologici

Secondo il ministero della salute (Ministero della salute, 2016) l'acqua deve essere conforme ad una serie di parametri microbiologici, che seguono il Decreto legislativo 31/2001 parte A, e parametri chimici, che invece fanno parte della parte B del Decreto legislativo 31/2001, ed infine anche dei parametri indicatori, parte C, che non sono direttamente correlabili a rischi per la salute del consumatore, ma sono indicatori della modifica della qualità delle acque. (Ministero della salute, 2016) Quindi il D.lgs 31/2001 prevede il controllo di ben 53 parametri, che sono così suddivisi:

- 2 parametri microbiologici, anche se aumentano se si prende in considerazione l'acqua venduta in bottiglia (Ministero della salute, 2016);
- 28 parametri chimici, legati alla presenza di elementi indesiderabili e tossici, per i quali sono fissati limiti rigorosi di concentrazione, parliamo ad esempio di: acrilammide, arsenico, benzene, nitrati, nitriti, antiparassitari ecc. (Ministero della salute, 2016);
- 21 parametri indicatori, riguardanti elementi caratterizzanti, per i quali invece sono stati stabiliti dei valori consigliati che non dovrebbero essere superati, come ad esempio: *Clostridium perfringens* (spore comprese), alluminio, cloruro, ferro, ammonio, colore, odore, sapore, torbidità, durezza ecc. (Ministero della salute, 2016);
- 2 parametri di radioattività, ovvero: trizio e dose totale indicativa (Ministero della salute, 2016);
- Per quanto riguarda i parametri microbiologici, possiamo vedere nello specifico i valori limiti riportati in tabella 1

Parametro	Valore (/100ml)
<i>Escherichia coli</i>	0
Enterococchi	0
Per le acque messe in vendita in bottiglia o contenitori: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/250 ml
<i>Escherichia coli</i>	0/250 ml

Enterococchi	0/250 ml
Conteggio colonie a 22°C	100/ml
Conteggio colonie a 37°C	20/ml

Tabella 1: Parametri microbiologici acqua potabile; Fonte: Ministero della salute, 2016

1.2 Metodi di sanificazione e conservazione dell'acqua

Uno dei principali metodi per il trattamento delle acque destinato al consumo umano è la filtrazione. Nella potabilizzazione dell'acqua il primo passo consiste nella rimozione dei solidi sospesi, che possono essere presenti in varie dimensioni (generalmente frazioni di millimetro) e di differente natura (organica, inorganica, microbiologica).

Questa prima filtrazione permette soltanto di migliorare i parametri qualitativi dell'acqua (DM 25/2012). Attraverso la separazione su membrana invece è possibile non solo separare le sostanze solide sospese ma anche microrganismi, molecole organiche e solidi disciolti, a seconda delle dimensioni delle membrane (μm) e della loro massa molecolare (Dalton) (Figura 1);

a seconda del grado di filtrazione, determinato anche dalla natura chimica e dalla struttura della membrana (DM 25/2012), si distinguono in particolare:

1. Microfiltrazione, in grado di trattenere particelle di diametro compreso fra 0,05 e 10 μm (DM 25/2012)
2. Ultrafiltrazione, in grado di trattenere particelle di diametro compreso fra 0,05 e 0,01 μm (DM 25/2012)
3. Nanofiltrazione, in grado di trattenere particelle di diametro compreso fra 0,01 e 0,001 μm (DM 25/2012)
4. Osmosi inversa ed elettrodialisi, in grado di trattenere particelle di diametro inferiore a 0,001 μm (DM 25/2012)

Oltre a queste tecniche di filtrazione, riassunte in figura 1, vengono impiegati anche diversi trattamenti antibatterici e di disinfezione con prodotti chimici; a seconda della loro natura i sistemi di disinfezione delle acque si basano sull'impiego di prodotti chimici, quali cloro gassoso, biossido di cloro, ipoclorito e/o ozono, o agenti fisici, quali calore e/o radiazione elettromagnetica UV (DM 25/2012).

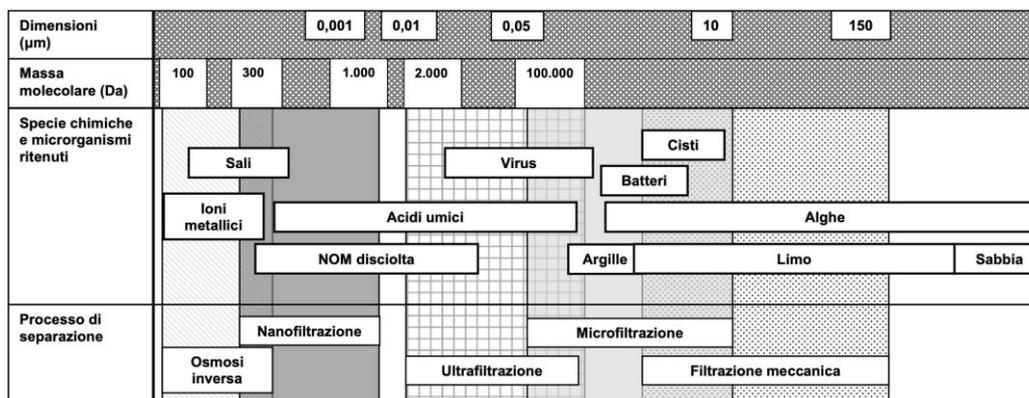


Figura 1: Principali tecniche di filtrazione Fonte: DM 25/2012

Esiste una vasta gamma di prodotti chimici da utilizzare a seconda della destinazione d'uso dell'acqua, e delle condizioni operative dell'impianto (pressione, temperatura, ecc). Uno stesso prodotto può essere impiegato in più settori, anche se, in genere, ambiti diversi ne richiedono concentrazioni e modi d'uso differenti. I prodotti di seguito descritti fanno riferimento al principio attivo, o al tipo specifico di impiego tecnico per cui sono destinati, nello specifico sono stati presi in esame quattro grandi settori del trattamento industriale delle acque: piscine, caldaie/evaporatori, impianti a membrana, impianti di potabilizzazione e depurazione. È bene precisare che in commercio tali sostanze vengono generalmente proposte con diverse denominazioni commerciali, ma l'efficacia di un prodotto, al di là di sigle e simboli, dipende dal principio attivo e dalla sua concentrazione. Per le corrette modalità di impiego occorre sempre fare riferimento alle schede di utilizzo e di sicurezza fornite dal produttore.

le acque destinate all'uso potabile vengono normalmente sottoposte ad una serie di trattamenti, più o meno intensi a seconda delle caratteristiche di partenza dell'acqua stessa. Il D.Lgs 152/2006 (Norme in materia ambientale), all'Art.80 stabilisce che le acque dolci superficiali, per essere utilizzate o destinate alla potabilizzazione, vengano

classificate nelle categorie A1, A2, A3, a seconda delle loro caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche. Le acque di categoria A3 sono le peggiori e per queste è previsto un trattamento fisico e chimico spinto, affinamento e disinfezione. I principali trattamenti chimici adottati sono:

- La **pre disinfezione** consiste nell'immissione in tubazione di biossido di cloro in soluzione acquosa, preparata in appositi reattori, allo scopo di distruggere completamente i microrganismi patogeni ed evitare la proliferazione di alghe e microrganismi dannosi per i successivi trattamenti.
- La **chiariflocculazione** è un trattamento chimico-fisico che viene adottato per eliminare i solidi sospesi non sedimentabili di natura colloidale, non eliminabili con i trattamenti fisici semplici. Nel trattamento di chiariflocculazione si sfruttano le proprietà di alcune sostanze (policloruro di alluminio), dette coagulanti, che in determinate condizioni operative, formano in acqua dei composti insolubili dotati di carica elettrica di segno opposto (carica positiva) rispetto a quella dei colloidi costituenti la torbidità da eliminare (carica negativa). I composti coagulanti interagiscono con i colloidi provocando la formazione di microflocchi. Le acque trattate vengono poi opportunamente agitate ricircolate in modo che i microflocchi si aggregino ulteriormente tra loro formando fiocchi con buone proprietà di sedimentazione che vengono trascinati verso il basso.
- La **disinfezione finale** viene effettuata subito a valle dell'ultimo trattamento (post clorazione) e ha lo scopo di distruggere completamente i microrganismi patogeni o i microrganismi presenti nell'acqua. La disinfezione deve conferire persistenza cioè garantire la potabilità dell'acqua fino al rubinetto della singola utenza. I trattamenti impiegati sono essenzialmente trattamenti chimici (clorazione) e l'azione battericida è svolta dal cloro e dai suoi derivati (ipoclorito di sodio).

1.3 Microrganismi target delle procedure di disinfezione delle acque

1.3.1 *Escherichia coli*

L'*Escherichia coli* è un microrganismo appartenente agli enterobatteri, famiglia Enterobacteriaceae, così chiamati poiché trovano il loro habitat ideale nell'intestino dell'uomo

e di vari altri animali. Oltre ad essere un ospite abituale del tratto enterico, *Escherichia coli* è diffuso nell'ambiente e si può trovare negli alimenti.

Si tratta di un batterio Gram-negativo, asporigeno e presenta una forma a bacillo, inoltre su tutta la superficie del microrganismo sono presenti numerosi flagelli, che gli permettono il movimento, e pili o fimbrie, che invece gli consentono di ancorarsi alla cellula ospite e di comunicare con altri batteri; la temperatura ottimale per la sua crescita è tra i 35 e i 40 °C ed infine possiede un metabolismo definito come aerobio facoltativo ed è in grado pure di fermentare il lattosio, proprio quest'ultima caratteristica viene sfruttata nella diagnostica microbiologica, cioè per distinguere *Escherichia coli* da altri microrganismi. Nell'uomo, *E. coli* si localizza nell'intestino, dove ha un rapporto di commensalismo con il suo ospite.

In determinate condizioni predisponenti, però, questo batterio può comportarsi come patogeno opportunista. In termini pratici gli stessi ceppi commensali di *E. coli*, normalmente innocui, possono moltiplicarsi in modo smisurato e colonizzare altre regioni corporee, fino a causare malattie al di fuori del tratto intestinale. In generale parliamo di *E. coli* enteroinvasivi (EIEC) quando sono in grado di invadere la mucosa dell'intestino crasso, causando lesioni infiammatorie e danno tissutale; la conseguenza della loro infezione sono enteriti ed alcune forme di dissenteria sanguinolenta; parliamo invece di *E.coli* enterotossigeno (ETEC), cioè produttori di enterotossine, quando agiscono sulla mucosa dell'intestino tenue, provocando la comparsa di scariche diarroiche acquose.

E. coli è il primo parametro da valutare nei programmi di monitoraggio dell'acqua (Ministero della salute, 2016). La presenza di *E. coli* (o dei coliformi fecali in generale) indica un recente inquinamento fecale, dovuto probabilmente ad una inadeguata disinfezione o ad una mancanza di integrità del sistema idrico (Ministero della salute, 2016).

1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas rappresenta un genere di batteri appartenenti alla famiglia delle Pseudomonadaceae; sono bacilli Gram-negativi, aerobi obbligati ed hanno flagelli polari che permettono loro di muoversi. Si trovano nel terreno e nelle acque ma anche sulle piante. Tra le diverse specie appartenenti al genere *Pseudomonas* ha particolare interesse igienico-sanitario la *Pseudomonas aeruginosa*, presente infatti anche nei parametri microbiologici dell'acqua potabile. Si tratta di un microrganismo che ha un ottimo di temperatura a 37°C ma può sopravvivere e svilupparsi in un ampio intervallo di temperatura compreso tra i 4°C e i 42°C (Centorrimo,2020); diversamente da altri batteri del genere *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* non è un normale componente della microflora delle acque minerali e può o essere utilizzato come

indicatore di eventuali contaminazioni (Centorrino,2020). Altra caratteristica di *P. aeruginosa* è quella di crescere anche in condizione di anaerobiosi impiegando il nitrato come accettore terminale di elettroni (Centorrino,2020).

Questo batterio è solitamente rilevato a concentrazioni piuttosto basse nelle acque, ma ciononostante riesce a sopravvivere e crescere in questo ambiente così povero di nutrienti (Centorrino,2020). *P. aeruginosa* può essere considerato come un patogeno opportunista e la presenza di questo batterio nelle acque in bottiglia è da ritenersi un rischio per le persone immunodepresse, mentre non sembra esserlo per i soggetti sani.

2 Biofilm

Il biofilm è generalmente definito come comunità organizzata di microrganismi adesi ad una superficie e inglobati in una matrice autoprodotta di sostanze polimeriche extracellulari (EPS). Le nuove tecnologie hanno reso possibile di esaminare in dettaglio tali comunità, concludendo che rappresentano sistemi biologici con un alto livello di organizzazione in cui i batteri si organizzano in strutture complesse, comunità coordinate e funzionali che conferiscono loro una maggiore resistenza e capacità di sopravvivere nel tempo a condizioni ambientali avverse.

2.1 Metodi di studio dei biofilm

La nostra conoscenza dei biofilm si è sviluppata con l'evolversi delle tecnologie per il loro studio. Gran parte dei primi lavori si sono basati sulla microscopia elettronica a scansione, mediante dei solventi che disidratano gradualmente il campione prima dell'esame e provocano artefatti.

Le sostanze polimeriche extracellulari che caratterizzano i biofilm microbici, che per il 95% sono formate da acqua, compaiono più come fibre che come spessa matrice gelatinosa che circonda le cellule. L'uso della microscopia elettronica e la colorazione specifica del polisaccaride con rutenio, invece, hanno consentito di chiarire la natura delle fibre extracellulari nei biofilm e la loro associazione con le cellule come raffigurato in 2.

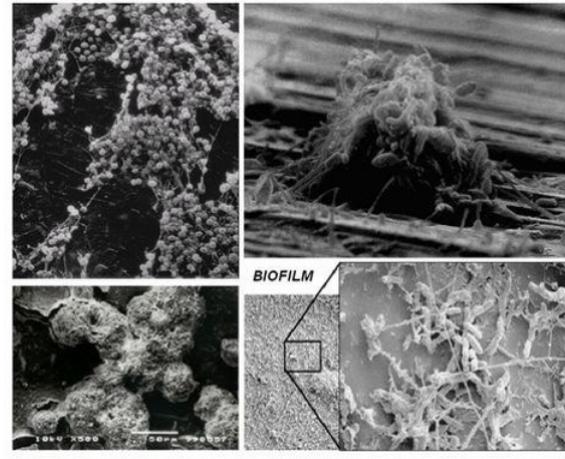


Figura 2: Micrografia elettronica a scansione SEM di un biofilm sviluppatosi in un sistema di acque industriali

Lo sviluppo della Microscopia confocale a scansione laser (CLSM), negli anni 80, ha fornito la capacità di esaminare i biofilm in situ senza le limitazioni incontrate con il microscopio elettronico a scansione, anche se a minore risoluzione.

La diminuzione nella risoluzione è stata più che compensata dalla possibilità di esaminare la matrice del biofilm invariata ed intatta. L'uso sia della CLSM sia della microscopia ad epifluorescenza necessita che gli organismi nei biofilm siano resi fluorescenti mediante l'utilizzo di ceppi batterici che esprimono la proteina fluorescente di *Aequorea victoria* denominata GFP (green fluorescent protein).

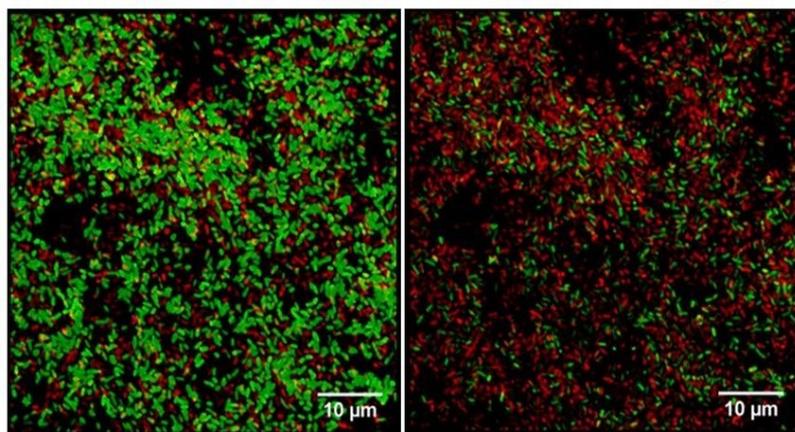


Figura 3: CLSM Biofilm di *P. Aeruginosa*

Questa tecnica ha permesso di esaminare i biofilm in maniera non invasiva, di conseguenza, la definizione di biofilm si è evoluta prendendo in considerazione non solo le caratteristiche morfologiche, ma anche altri attributi fisiologici di questi organismi. L'espressione genica dei profili batterici in questi consorzi microbici è molto diversa rispetto ai profili di espressione

degli stessi ceppi cresciuti allo stato planctonico, e tali geni includono quelli responsabile della regolazione e/o dell'espressione delle proteine di adesione superficiale, appendici come fimbriae, pili o flagelli, ecc. Pertanto, la definizione utile di un biofilm è, microbiologicamente, comunità sessile caratterizzata da cellule irreversibilmente attaccate ad un substrato, interfaccia o tra loro.

2.2 Caratteristiche dei Biofilm

Secondo Flemming et al., 2016 i biofilm vengono definiti come “aggregati di microorganismi”, dove le cellule sono spesso racchiuse in una matrice autoprodotta di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) adesi gli uni agli altri e/o ad una superficie. Come suggerito da O’toole et al (2000) e Waite et al., (2005) la formazione del biofilm avviene in 5 fasi:

- a. 1. Adsorbimento alla superficie,
- b. 2. Formazione di micro-colonie,
- c. 3. Adesione reversibile,
- d. 4. Adesione irreversibile,
- e. 5. Distacco.

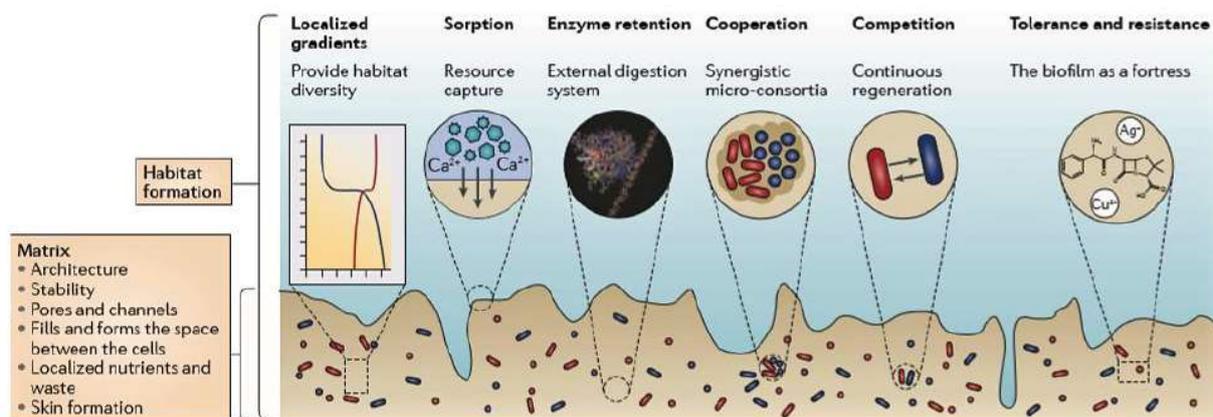


Figura 4: Formazione di habitat microbico, componenti e caratteristiche del biofilm (Flemming et al., 2016).

Tutti gli organismi superiori, compreso l'uomo possono essere colonizzati da microorganismi che formano biofilm, questo può essere associato ad infezioni persistenti nelle piante, negli animali e a contaminazioni di dispositivi ed impianti medici. Inoltre, i biofilm sono responsabili delle bio-incrostrazioni e della contaminazione delle acque di processo, questo chiaramente determina una minore qualità igienica delle acque potabili e comporta possibili rischi per la salute umana. I biofilm sono sistemi complessi, caratterizzati generalmente da più specie

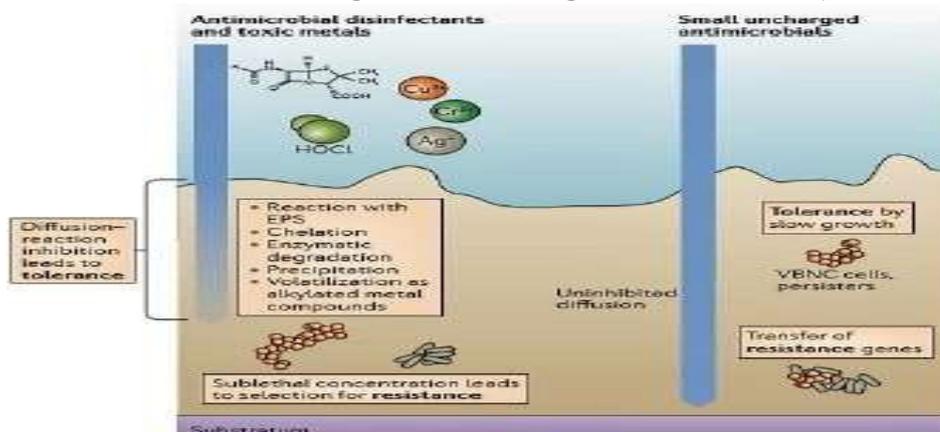
microbiche, con alta densità cellulare che può oscillare tra 10^8 e 10^{11} cellule/g di sostanza umida (Balzer et al., 2010). L'eterogeneità microbica può scaturire dalle condizioni ambientali o interazioni intra- e inter-specie, che coinvolgono l'espressione specifica di geni e proteine, tipico per la crescita e lo sviluppo di microrganismi in ecosistemi spazialmente eterogenei. La matrice è una interfaccia, o piuttosto un 'interspazio', tra il biofilm e il suo ambiente che determina i processi che avvengono all'interno del biofilm stesso e le interazioni con l'esterno. I microrganismi presenti nel biofilm multi-specie non sono distribuiti in modo casuale, piuttosto si organizzano per soddisfare al meglio le esigenze di ognuno di essi. Nel biofilm le cellule sono incorporate nella sostanza polimerica extracellulare che prende il nome esopolisaccaridi (EPS), nota anche come matrice extracellulare, questa è composta da polisaccaridi, lipidi, proteine, e acidi nucleici. La matrice, inoltre, determina l'organizzazione degli spazi nei biofilm e le complesse dinamiche che intercorrono tra le cellule microbiche, tra cui sinergie, interazioni, la comunicazione cellula-cellula, la trasmissione orizzontale di geni, migliorando le caratteristiche strutturali e funzionali del biofilm stesso, come idratazione, disponibilità di risorse nutritive, protezione dagli antimicrobici (Flemming et al., 2016). Lo sviluppo del biofilm è associato ad una maggiore resistenza agli stress ambientali, come ad esempio stress ossidativo, e alla risposta immunitaria dell'ospite. I meccanismi alla base di questi tipi di resistenza sono attribuiti all'espressione di geni specifici e cambiamenti fenotipici (Mah and O'Toole, 2001; Arciola et al., 2005; Zhang et al., 2013a). La produzione della matrice è un processo dinamico e dipende dalla disponibilità dei nutrienti nell'habitat limitrofo, che incide sulla capacità di crescita cellulare, dalla sintesi e secrezione di materiale extracellulare, dalla competizione tra di essi. È stato quindi ipotizzato che la matrice del biofilm sia un ambiente dinamico in cui le cellule sono organizzate in modo ottimale per utilizzare i nutrienti disponibili e resistere allo stress (Hall-stoodley et al., 2004; Flemming and Wingender, 2010). I microrganismi del biofilm non sono immobili, alcuni di essi posseggono dei flagelli e possono liberamente muoversi all'interno del biofilm. Questi microrganismi sono detti "nuotatori", che, spostandosi all'interno del biofilm formano pori e canali, i quali aumentano il trasferimento di massa all'interno del biofilm, causando l'aumento del flusso di nutrienti nella matrice e di conseguenza la condizione di vita nel biofilm viene migliorata. Uno dei vantaggi maggiori per i microrganismi è legato all'aumento della capacità di acquisire elementi genetici trasmissibili, quali i plasmidi (Angles et al., 1993; Hausner et al., 1999). Questo ci suggerisce che il trasferimento orizzontale di materiale genetico può avvenire rapidamente nel biofilm, rendendo perfetto l'emergere di nuovi agenti patogeni, mediante l'acquisizione di antibiotico-resistenza, fattori di virulenza e capacità di sopravvivenza ambientale. Altri vantaggi sono la resistenza ad antibiotici, cloro e detergenti

(Costerton et al., 1987). La divisione cellulare è rara in un biofilm maturo, questo potrebbe essere dovuto al fatto che sia richiesta energia in eccesso per la produzione di esopolisaccaridi, i quali rappresentano un'impalcatura commestibile che i microrganismi possono digerire ed utilizzare nel momento in cui ne necessitano. Per fare un esempio *P. fluorescens* produce una liasi in condizione di "fame" (Alison et al., 1998), questo enzima degrada l'esopolisaccaride associato al biofilm per il consumo e la liberazione della cellula dall'impalcatura del biofilm stesso, in modo tale che il microrganismo possa colonizzare nuove superfici ed evitare condizioni limitate di nutrienti. Tale processo implica il distacco attivo attraverso la scissione enzimatica dei polimeri della matrice (Boyd et al., 1994) o il cambiamento della fisiologia delle cellule attaccate (Willcock et al., 1997). Il rilascio di questi microrganismi dal biofilm può portare ad ulteriori colonizzazioni degli impianti di produzione e contaminare le superfici e linee di produzione, quindi la qualità e, chiaramente la sicurezza del prodotto finito, possono essere facilmente compromesse.

2.3 Resistenza a stress ambientali

La resistenza e la tolleranza agli antibiotici (Fig. 4) ed altri agenti antimicrobici avviene grazie all'organizzazione microbica sessile, attraverso una comparazione con la resistenza derivante dalle cellule microbiche planctoniche. Dove per 'resistenza' e 'tolleranza' si intende la maggiore abilità di un microrganismo nel sopravvivere all'esposizione a composti che sono letali (*Brauner et al., 2016*).

Figura 5: Resistenza e tolleranza agli antibiotici e agenti antimicrobici (*Flemming et al., 2016*).



L'inattivazione delle capacità antimicrobiche del composto ed il lento tasso di crescita che caratterizza le cellule in fase planctonica determinano una maggiore tolleranza nel biofilm. Potrebbe sembrare che la matrice EPS rappresenti una barriera contro la diffusione, tuttavia, è stato dimostrato che gli antimicrobici non in grado di interagire con le molecole degli EPS, si

riescano a diffondere attraverso il biofilm tanto facilmente quanto nell'acqua, e la sola barriera contro la diffusione non è neanche lontanamente larga abbastanza da poter contribuire alla minore suscettibilità dei biofilm agli antibiotici. Sebbene non sembri essere una barriera fisico-chimica alla diffusione degli antimicrobici, i componenti degli EPS della matrice possono sostanzialmente monitorare l'attività delle sostanze antimicrobiche che si diffondono attraverso il biofilm in una forma di inibizione conosciuta come "Inibizione diffusione–reazione", che può comprendere la chelazione di sistemi complessi, la degradazione enzimatica degli antimicrobici o persino "reazioni sacrificali" degli EPS (per esempio, nei confronti dei disinfettanti ossidanti). Diminuendo la concentrazione effettiva di antimicrobici a concentrazioni subletali, l'inibizione diffusione–reazione può favorire la selezione per la resistenza antimicrobica delle cellule del biofilm esposte a stress antimicrobici a cui possono sopravvivere (*Oubekka et al., 2012*).

I mezzi di sopravvivenza dei batteri nei biofilm esposti ad antimicrobici sono i tassi di crescita lenti e la dormienza. I biofilm contengono un numero sostanziale di cellule in fase stazionaria e tali cellule sono meno suscettibili ai molti antimicrobici che si affidano al metabolismo delle cellule batteriche per le proprie attività.

Con la maturazione del biofilm un gran numero di cellule entra nella fase stazionaria e, di conseguenza, alcuni antibiotici (Vancomicina), mostrano un'efficacia ridotta man mano che il biofilm invecchia ed acquisisce maggiore tolleranza ad essi (*Maisonneuve et al., 2014*). Tassi di crescita lenti possono portare ad uno stato vitale ma non coltivabile (viable-but-nonculturable state – VBNC state) dei microrganismi, o ad altre forme di dormienza, sebbene l'attività metabolica e l'integrità della membrana vengano mantenute durante lo stato dormiente (*Li et al., 2014*). La trasmissione orizzontale è un meccanismo che aumenta la resistenza delle cellule del biofilm agli antimicrobici attraverso la diffusione di geni di resistenza. È stato suggerito che l'alta densità cellulare, la maggiore competenza genetica e l'accumulo di elementi genetici mobili che si verificano nei biofilm offrono un set di fattori ideale per una efficace trasmissione orizzontale di geni, compresa la diffusione di geni di resistenza (*Madsen et al., 2012*).

La presenza di eDNA, fonte di materiale genetico, offre alla matrice un ambiente fisico stabile per il contatto cellula-cellula, fondamentale per la trasmissione genica. Ad esempio, plasmidi con geni che conferiscono resistenza a vari antibiotici sono stati trasmessi in biofilm multispecie di *P. putida* ed *E. coli*. (*Van Meervenne et al., 2014*). Inoltre, è stato dimostrato come nei biofilm di *V. cholerae* avvengano trasmissioni geniche in grado di incrementare la resistenza microbica a stress esterni e determinata dal contatto cellula-cellula, confermando come la stretta vicinanza e l'alta densità, cellulare, prerogative della struttura planctonica, siano essenziali per la trasmissione orizzontale di geni. (*Borgeaud et al., 2015*).

2.4 Problematiche del biofilm nel sistema idrico

La natura estremamente diversa e dinamica della popolazione microbica presente nei sistemi di distribuzione delle acque destinate al consumo umano contribuisce alla formazione di biofilm. I biofilm delle reti acquedottistiche possono ospitare un'ampia varietà di organismi e sono caratterizzati da un turn-over di gruppi microbici. Un distacco di cellule microbiche e l'adesione di altre sarebbe osservabile in continuo. Le specie che vanno a costituire i biofilm nei sistemi di distribuzione delle acque potabili sono piuttosto ricorrenti anche se le loro concentrazioni possono ampiamente variare. Oltre il 50% dei batteri trasportati dall'acqua si presenta sotto forma di aggregati di dimensioni maggiori di 5 μm o attaccati a particelle abiotiche di circa 5 μm di diametro che, in contatto con l'acqua, sono colonizzate dai microrganismi presenti. Sebbene i biofilm presenti nel sistema di distribuzione delle acque potabili siano comunque irregolari, un biofilm maturo può essere spesso circa 200 μm e può causare una diminuzione dei livelli di ossigeno, creando condizioni di anossia al di sotto dello strato superficiale. Tali condizioni possono portare allo sviluppo di batteri solfato-riduttori, la cui attività può corrodere e forare le pareti interne delle condotte. La corrosione nelle condotte metalliche delle reti acquedottistiche riduce l'ossigeno disciolto, liberando metaboliti corrosivi, producendo acido solforico e partecipando al processo catodico. Gli stessi organismi sono anche causa di biodeterioramento di materiali come le plastiche e le gomme utilizzate nelle tubature, che vengono quindi a rappresentare fonte di nutrienti organici favorendone la crescita ed aumentandone la carica microbica. La presenza di patogeni opportunisti nell'acqua in rete causa un aumento della richiesta di cloro, colorazione delle acque, conseguenze sulle proprietà organolettiche dell'acqua, presenza di invertebrati e corrosione. Il controllo della formazione di biofilm diviene quindi uno dei maggiori obiettivi per ottenere un'acqua potabile salubre e con caratteristiche di qualità.

3 Obiettivo Sperimentale

L'acqua è uno degli elementi essenziali presenti sulla terra senza la quale la vita non potrebbe esistere; tuttavia, ottenere acqua pulita e sicura, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, è diventata una sfida a causa della sua possibile contaminazione chimica e biologica. Malattie come il tifo, salmonellosi, colera ecc. possono essere causate da microrganismi presenti nell'acqua (Bhardwaj et al., 2021), una delle principali cause della contaminazione delle acque e dovuta alla presenza di microrganismi di origine fecale che possono provocare infezioni gastrointestinali, e quindi di vitale importanza attuare trattamenti di potabilizzazione dell'acqua prima di poterla bere o utilizzare nei processi alimentari (Bhardwaj et al., 2021). Questo aspetto è ancora più importante per acque di cisterne e serbatoi come nel caso di camper che presentano maggiori probabilità di contaminazione microbica e formazione di biofilm e nelle quali deve comunque essere garantita la sicurezza microbiologica. Infatti, i biofilm si possono formare ovunque l'acqua è in circolo, inclusi gli impianti di acqua potabile, dove solitamente non rappresentano un problema che ne influenza la qualità. In caso di crescita eccessiva, tuttavia, i biofilm possono diventare veicolo di microrganismi pericolosi per la salute umana, come *Escherichia coli*, *Legionella* e *Pseudomonas Aeruginosa*. Stagnazione e temperatura dell'acqua compresa tra i 20 °C e i 50 °C favoriscono la crescita batterica. Queste condizioni si realizzano, ad esempio, in appartamenti vuoti, in caso di scarso utilizzo degli impianti nonché nei rami morti. Questo problema riguarda anche tutte le acque di serbatoi e cisterne, come quelle dei camper, in cui l'acqua può sostare anche per lunghi periodi ad alte temperature soprattutto nel periodo estivo. Problemi igienici dovuti a una proliferazione batterica eccessiva possono essere evitati mediante una corretta progettazione e successiva gestione degli impianti e serbatoi, mirate a ridurre il rischio di stagnazione e il verificarsi di temperature favorevoli. Per queste ragioni numerosi sanitizzanti sono stati proposti per la potabilizzazione e il mantenimento della sicurezza microbiologica dell'acqua. Tra questi composti a base cloro sono certamente quelli più utilizzati ma visto le nuove tendenze del mercato verso prodotti più naturali e sostenibili e a minore impatto ambientale anche nuove formulazioni sono state proposte.

In questo contesto, in questo lavoro di tesi è stata valutata l'efficacia antimicrobica e antibiofilm di un sanitizzante innovativo "SANIGEN" commercializzato dall'azienda Acquatravel e contenente Perossidissolfato di potassio e idrogenosolfato dipotassio nei confronti di *Pseudomonas* spp., *E. coli* e *Salmonella* spp. L'efficacia del prodotto innovativo è stata confrontata rispetto a prodotti sanificanti tradizionali a base cloro.

4 Materiali e metodi

4.1 Prodotti antimicrobici testati nella sperimentazione

In questa sperimentazione è stata valutata l'azione antimicrobica del prodotto sanificante innovativo "SANIGEN" commercializzato e brevettato dall'azienda Acquatravel e di un prodotto commerciale a base cloro comunemente utilizzato per la sanificazione quale l'Amuchina.

L'amuchina commerciale utilizzata era in soluzione disinfettante concentrata, raffigurata nell'immagine 5 e a base di Ipoclorito di Sodio. È riportata esercitare una rapida e profonda azione disinfettante eliminando batteri, funghi e virus. Amuchina soluzione disinfettante concentrata è indicata per la disinfezione di frutta e verdura e per la disinfezione degli oggetti del neonato. Come descritto sul prodotto per il suo utilizzo si consiglia la diluizione in acqua fredda (20ml in 1L di acqua).



Figura 6: Amuchina soluzione disinfettante concentrata

La composizione di 100 mL di prodotto è riportata di seguito:

Principio attivo:

- Ipoclorito di sodio 1,15 g, (Cloro Attivo 1,1 g, equivalenti a 11.000 ppm o mg/l)

Eccipienti:

- Sodio cloruro 17 g

- Sodio idrato 35 mg
- Sodio tetraborato decaidrato 35 mg
- Acqua Depurata q.b

L'acido ipocloroso è il maggiore responsabile dell'azione disinfettante, la ragione è riconducibile alla sua struttura molecolare, estremamente piccola, priva di carica elettrica e del tutto assimilabile a quella dell'acqua. I composti cloroattivi in soluzione acquosa danno origine ad acido ipocloroso (HOCl), dotato di un elevato potere ossidante e in grado di danneggiare le cellule microbiche, e a ione ipocloroso (OCl), che originano l'uno dall'altro in funzione del pH della soluzione. Il meccanismo d'azione è legato principalmente all'ossidazione di componenti protoplasmatici cellulari e dei sistemi enzimatici che regolano il metabolismo energetico dei microrganismi.

4.1.1 Legislazione del prodotto Amuchina soluzione disinfettante concentrata

Il prodotto è un Presidio Medico Chirurgico Reg. n. 100/43 del Ministero della Sanità, viene prodotta e controllata in conformità alle norme e alle leggi che regolano l'autorizzazione e l'immissione in commercio dei presidi medico chirurgici (D.P.R. n.392 - ottobre '98 e successivi aggiornamenti)

4.2 Sanigen

Il prodotto "Sanigen - Professionale", è stato fornito dall'azienda Acquatravel in bustina monodose concentrata ed è consigliato per la pulizia di tutto l'impianto dell'acqua potabile: elimina biofilm, mucillagini e piccole incrostazioni dalle pareti dei tubi e del serbatoio. Come riportato in etichetta, il contenuto di una busta di SANIGEN è da utilizzare su volumi di 100/150 Litri come rappresentato in figura 7 e 8.



Figura 7: Sanigen fronte

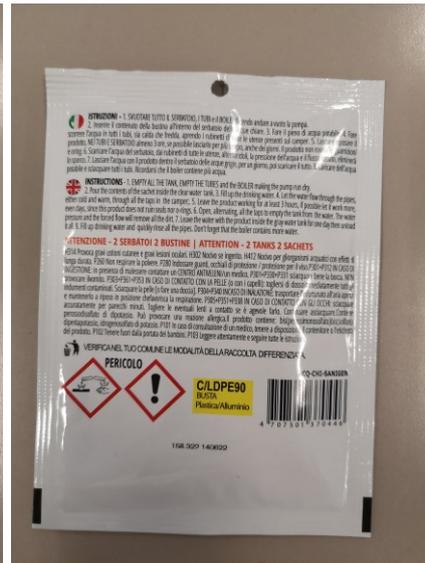


Figura 8: Sanigen retro

Presenta un effetto ossidante e igienizzante a base di perossidi stabilizzati per il trattamento shock dell'acqua ad uso professionale ed industriale. Contiene miscele in concentrazioni espresse $x = \text{Conc.} \% 100$

BIS(PEROSSIMONOSOLFATO)	BIS(SOLFATO) DI PENTAPOTASSIO	
CAS 70693-62-8	$80 \leq x < 100$	Acute Tox. 4 H302, Skin Corr. 1B H314, Eye Dam. 1 H318, Aquatic Chronic 3 H412
CE 274-778-7		LD50 Orale: 500 mg/l/4h
INDEX		
Reg. REACH 01-2119485567-22-XXXX		
IDROGENOSOLFATO DI POTASSIO		
CAS 7646-93-7	$1 \leq x < 10$	Skin Corr. 1B H314, Eye Dam. 1 H318, STOT SE 3 H335
CE 231-594-1		
INDEX 016-056-00-4		
DIPOTASSIO PEROSSIDISOLFATO		
CAS 7727-21-1	$1 \leq x < 10$	Ox. Sol. 3 H272, Acute Tox. 4 H302, Eye Irrit. 2 H319, Skin Irrit. 2 H315, STOT SE 3 H335, Resp. Sens. 1 H334, Skin Sens. 1 H317
CE 231-781-8		LD50 Orale: 700 mg/l/4h
INDEX 016-061-00-1		
Reg. REACH 01-21194945676-19-XXXX		

Figura 9: Composizione/informazioni sugli ingredienti di Sanigen

4.2.1 Legislazione e principali utilizzi di "Sanigen"

Il prodotto è classificato pericoloso ai sensi delle disposizioni di cui al Regolamento (CE) 1272/2008 (CLP) (e successive modifiche ed adeguamenti). Il prodotto pertanto richiede una scheda dati di sicurezza conforme alle disposizioni del Regolamento (UE) 2020/878.

Come si può notare dalla confezione (Figura 7 e figura 8), vengono riportati pure i principali utilizzi, come riportato precedentemente presenta vari impieghi: pulizia di membrane, saldature in acciaio, parti delicate dell'impianto, bottiglie, damigiane, taniche e catini.

5 Piano sperimentale

5.1 Valutazione delle concentrazioni minime inibenti (MIC) nei confronti di microrganismi patogeni

Per la valutazione dell'efficacia dei prodotti commerciali SANIGEN e amuchina sono state per prima cosa valutate le concentrazioni minime inibenti di entrambi i prodotti su una serie di microrganismi target: *Escherichia Coli*, *Salmonella Enteritis* e *Pseudomonas putida*;

I microrganismi utilizzati per la determinazione delle MIC appartengono al Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari (DISTAL) dell'Università di Bologna. I ceppi utilizzati sono stati:

- *Escherichia Coli* 555;
- *Pseudomonas putida* C54,
- *Salmonella enteritis* E5.

I ceppi conservati in stock in glicerolo ad una temperatura di -40°C , sono stati ripresi in brodo di coltura Brain Heart Infusion (BHI), un terreno di coltura liquido universale per la crescita di un'ampia gamma di specie batteriche, nello specifico quindi sono stati utilizzati all'incirca 200 μl degli stock ed inoculati nelle loro rispettive provette contenenti 9 ml di BHI, successivamente sono state poste a temperatura ottimale di crescita: 37°C per *E. coli* e *Salmonella* e 30°C per *P. putida* e incubate per 24 ore. I ceppi sono stati rinfrescati in un nuovo brodo di coltura BHI per ulteriori due passaggi alle medesime condizioni di tempo e temperatura prima del loro utilizzo nella nuova sperimentazione. È importante sottolineare come *Pseudomonas putida*, utilizzata in questa sperimentazione, è un surrogato di *Pseudomonas aeruginosa* microrganismo tra i più problematici potenzialmente presente nelle acque.

5.1.1 Preparazione della prova

Per la prova sono stati utilizzati *Escherichia coli* 555, *Salmonella enteritis* e *Pseudomonas putida*. Le prove sono state eseguite in Microtiter da 96 pozzetti da 200 μL . I 3 diversi ceppi, opportunamente diluiti in brodo coltura BHI sono stati inoculati nelle MICROTITER ad una concentrazione di 6 e 4 log ufc/ml e 10^{-4} ufc/ml considerando almeno 3 ripetizioni per ciascuna condizione. I prodotti testati amuchina e Sanigen sono stati addizionati in quantità tale da avere una concentrazione iniziale nel primo pozzetto pari all'1% nel primo pozzetto e soluzioni via

via dimezzate nei pozzetti successivi. Le concentrazioni testate sono state 1%, 0.5%, 0.25%, 0.13% 0.065%, 0.033%, 0.016% e 0.008%.

Una volta inoculate le microtiter, i campioni sono stati incubati a 37°C per *E. coli* e *Salmonella enteritis* e a 30°C per, *Pseudomonas putida* per 24 ore. Successivamente sono stati valutati i risultati attraverso l'osservazione della torbidità o meno dei pozzetti.

La preparazione delle microtiter è rappresentata nella figura 9 sottostante e sono state utilizzate pipette multicanale.

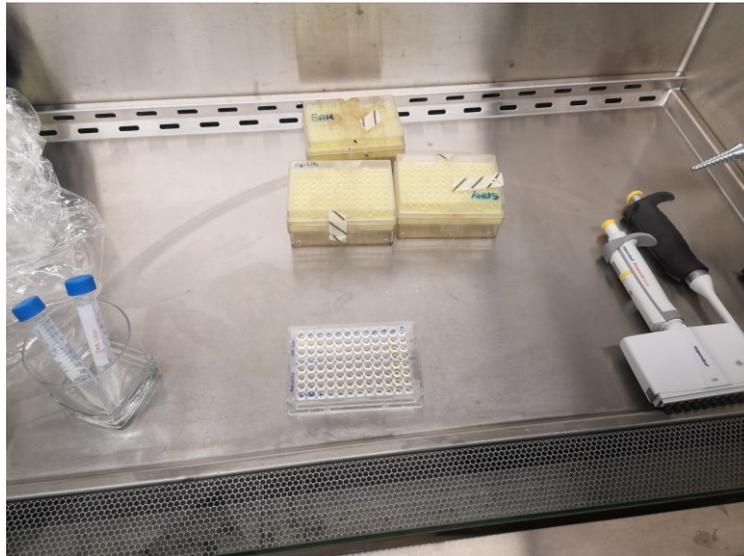


Figura 9: Piano di lavoro sotto cappa

5.2 Valutazione dell'attività antibiofilm

La valutazione dell'attività antibiofilm è stata eseguita utilizzando come microrganismo target *E. coli*. Le soluzioni antimicrobiche testate sono state:

- **Sanigen**: concentrazione 1% e 2%
- **Amuchina** concentrazione 1% e 2%

I materiali testati per lo sviluppo e formazione del biofilm microbico, sono stati Plastica e Acciaio in particolare 32 pezzi per ogni tipologia con le seguenti dimensioni di 4 x 4 cm:

5.2.1 formazione del biofilm

Il biofilm di *E. coli* su superfici in plastica e acciaio è stato ottenuto per immersione dei suddetti materiali in vasca sterile contenente coltura cellulare di *E. coli*. I materiali sono rimasti a contatto con la coltura microbica per una settimana per essere certi di aver formato un biofilm maturo.

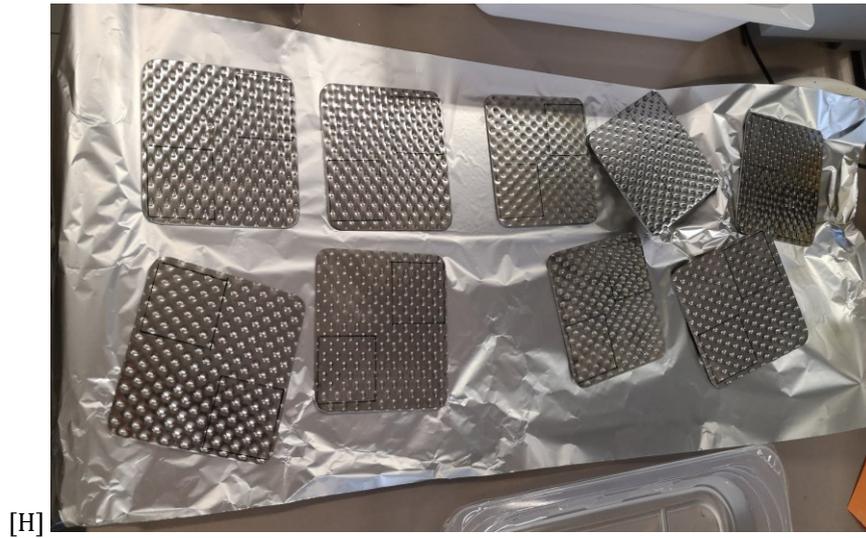
La procedura per l'esecuzione della prova è stata la seguente: i pezzi dei materiali sono stati prelevati con l'utilizzo di pinze apposite e sciacquati con acqua sterile per eliminare le cellule non adese, lasciando unicamente il biofilm. Successivamente è stato eseguito il trattamento (attraverso immersione in vaschette contenenti le soluzioni sanitizzanti testate) dei diversi materiali con le differenti soluzioni sanitizzanti per un tempo variabile (nel caso in esame 5 minuti, 10 minuti e 1 ora) a concentrazioni differenti delle soluzioni (1 e 2%). I campioni sono stati sottoposti a un risciacquo con acqua corrente e infine campionati a livello microbiologico attraverso l'utilizzo di tamponi superficiali. Come controllo sono stati utilizzati pezzi dei materiali sottoposti al solo risciacquo senza ulteriori trattamenti sanificanti. Nelle figure sottostanti sono riportate immagini della sperimentazione.



Figura 10: Vaschette in cui è stato inoculato *Escherichia coli* 555



Figura 11: Estrazione del materiale in acciaio trascorsa una settimana in ammollo.



[H]

Figura 12: Materiale in acciaio dopo il periodo in ammollo



Figura 13: Materiale plastico dopo il periodo in ammollo



Figura 14: esecuzione dei trattamenti sanificanti

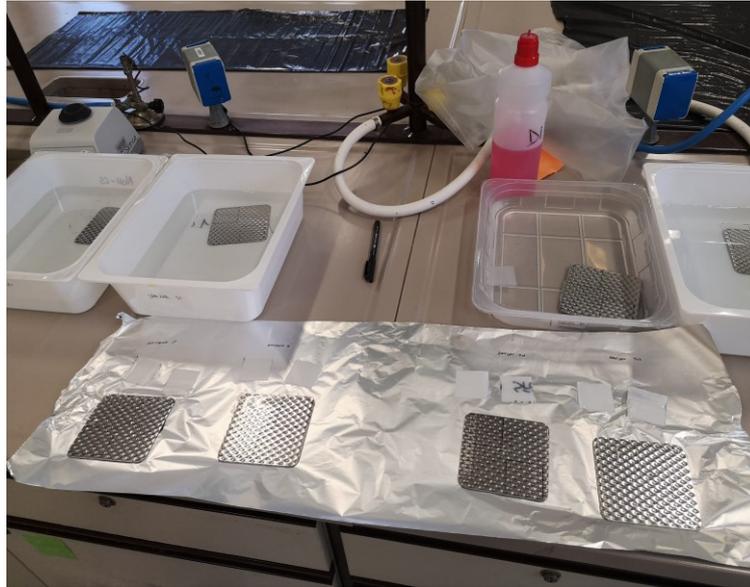


Figura 15: Estrazione del materiale dopo il trattamento sanitizzante

5.2.2 Campionamento microbiologico

A seguito dell'esecuzione dei tamponi superficiali delle diverse superfici trattate a diversi tempi e concentrazioni dei sanificanti, sono stati eseguiti i campionamenti microbiologici su terreni di coltura selettivi per *E. coli*.

I campioni ottenuti con i tamponi superficiali sono stati classificati e marcati come segue:

- 1/2 AA 5' = Amuchina Acciaio 5' 1% 2%
- 1/2 AA 10' = Amuchina Acciaio 10' 1% 2%
- 1/2 SA 5' = Sanigen Acciaio 5' 1% 2%
- 1/2 SA 10' = Sanigen Acciaio 10' 1% 2%
- 1/2 AP 5' = Amuchina Plastica 5' 1% 2%
- 1/2 AP 10' = Amuchina Plastica 10' 1% 2%
- 1/2 SP 5' = Sanigen Plastica 5' 1% 2%
- 1/2 SP 10' = Sanigen Plastica 10' 1% 2%
- 1/2 P 5' = Controllo Plastica 5' 1% 2%
- 1/2 P 10' = Controllo Plastica 10' 1% 2%
- 1/2 A 5' = Controllo Acciaio 5' 1% 2%
- 1/2 A 10' = Controllo Acciaio 10' 1% 2%

Per l'enumerazione di *E. coli* è stato impiegato apposito terreno di coltura selettivo quale BRIEC (Brilliance™ *E. coli*/coliform Selective Agar, BRIEC). Nel caso fosse stato necessario sono state eseguite opportune diluizioni seriali della soluzione contenente il tampone.. Per il campionamento si è proceduto nel modo seguente:

- predisposizione del materiale di laboratorio (provette fisiologica, pipette, puntali, tamponi ecc.); diluizione decimale del campione;

- prelevare 1 ml di sospensione batterica dalla soluzione del tampone e addizionarla ai 9 ml di soluzione fisiologica sterile presente nella provetta (10^{-2});
- agitare in vortex per pochi secondi per rendere omogenea la sospensione;
- ripetere tali operazioni fino alla diluizione desiderata
- prelevare 0,1 ml da ciascuna diluizione, grazie all'utilizzo della pipetta, e versarli al centro della piastra petri contenente il terreno di coltura BRIEC;
- distribuire con una spatola monouso la sospensione batterica su tutta la superficie della piastra;
- capovolgere le piastre e incubarle alla temperatura desiderata per circa 24-48 ore, nel nostro caso:
37 °C E. coli;
- conta del numero di colonie cresciute nelle varie piastre;
- calcolo del carico microbico di *E. coli* (ufc/ml) ed elaborazione dati.

6 RISULTATI

Nella prima parte di questa sperimentazione sono state valutate le concentrazioni minime inibenti di due sanitizzanti commerciali quali SANIGEN e amuchina nei confronti di tre patogeni generalmente associati alla possibile contaminazione delle acque quali *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas putida*.

I test sono stati condotti utilizzando due differenti livelli di inoculo dei microrganismi patogeni quali 5 e 3 log ufc/mL e le concentrazioni di sanificante testate sono state nel range tra l'1% e lo 0.008%. I risultati ottenuti sono stati osservati dopo 24 e 48h di incubazione.

In tabella 2 sono riportate le MIC di SANIGEN e amuchina nei confronti dei 3 microrganismi patogeni testati.

	<i>Escherichia coli</i>			
	MIC 24h		MIC 48h	
	5 log ufc/ml	3 log ufc/ml	5 log ufc/ml	3 log ufc/ml
SANIGEN	0.50%	0.12%	0.5%	0.12%
AMUCHINA	0.33%	0.12%	0.5%	0.12%

	<i>Salmonella enteritidis</i>			
	MIC 24h		MIC 48h	
	5 log ufc/ml	3 log ufc/ml	5 log ufc/ml	3 log ufc/ml
SANIGEN	0.25%	0.06%	0.25%	0.06%
AMUCHINA	0.25%	0.12%	0.25%	0.12%

	<i>Pseudomonas putida</i>			
	MIC 24h		MIC 48h	
	5 log ufc/ml	3 log ufc/ml	5 log ufc/ml	3 log ufc/ml
SANIGEN	0.25%	0.06%	0.25%	0.06%
AMUCHINA	0.25%	0.12%	0.33%	0.12%

Tabella 2) Concentrazioni minime inibenti di SANIGEN e amuchina nei confronti di *E. coli*, *S. enteritidis* e *P. putida*.

Nella figura 16 sono invece riportati le immagine di alcune delle microtiter da cui sono stati ottenuti i risultati di questa sperimentazione.

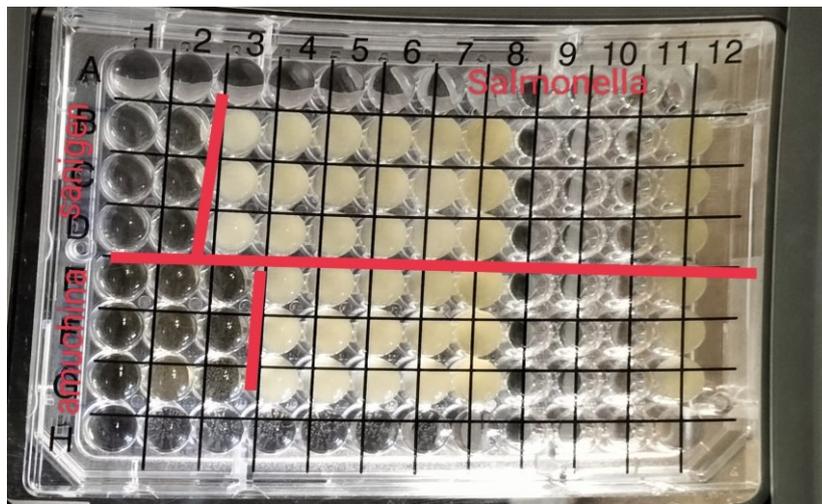
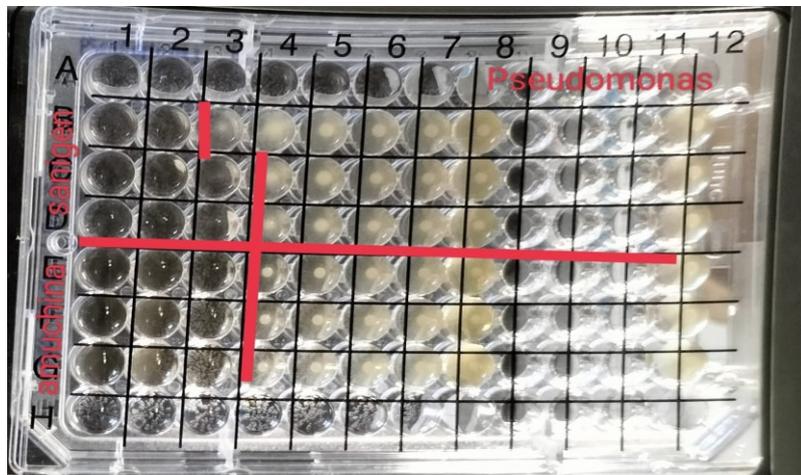
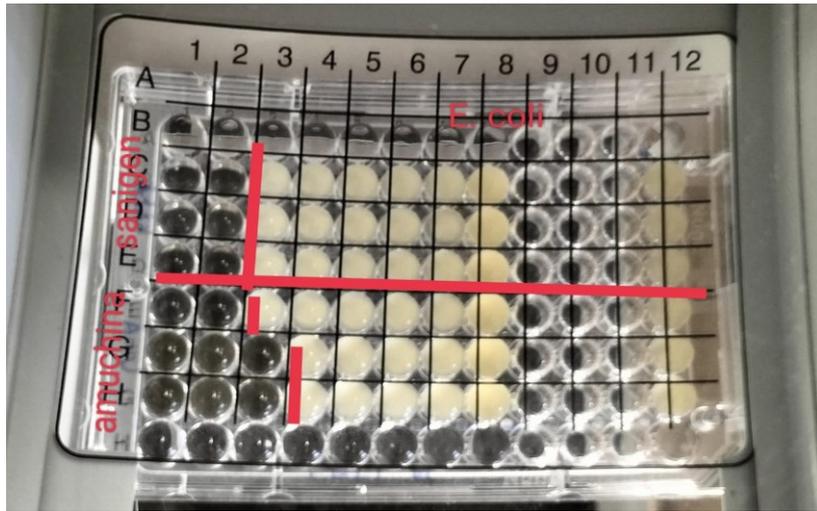


Figura 16) Immagini delle microtiter utilizzate per la determinazione delle MIC

Come osservabile da tabelle e figure sopra riportate l'attività antimicrobica dei due sanificanti testati nei confronti di *E. coli*, *Salmonella* e *Pseudomonas* è risultata abbastanza simile.

Escherichia coli è risultato il microrganismo più resistente ai sanificanti testati e le MIC dopo 24h, per un inoculo del microrganismo pari a 5 log ufc/mL sono state 0.5% per SANIGEN e 0.33% per amuchina. Per l'inoculo più basso la concentrazione di sanificanti necessaria per inibire il patogeno è risultata inferiore e pari allo 0.12% per entrambi i sanificanti. Dopo 48h le MIC di SANIGEN nei confronti di *E. coli* sono risultate uguali a quelle osservate dopo 24h, indipendentemente dal livello di inoculo del microrganismo mentre nel caso di amuchina la MIC dopo 48h per il livello di inoculo è aumentata allo 0.5% mostrando dunque una attività simile a quella di SANIGEN.

Salmonella e *Pseudomonas* hanno mostrato un comportamento simile rispetto ai due sanificanti testati. Le MIC dopo 24h per il carico cellulare di 5 log ufc/mL sono risultate pari allo 0.25% per entrambi i sanificanti. Tuttavia, per questo livello di carico, nel caso di *Pseudomonas* amuchina ha mostrato un aumento della MIC fino allo 0.33% cosa non osservata nel caso di SANIGEN dove la MIC è rimasta pari allo 0.25%. Sia su *Salmonella* che *Pseudomonas* ad un livello di carico cellulare pari a 3 log ufc/mL, SANIGEN si è dimostrato più efficace dell'amuchina facendo registrare delle MIC più basse (0.06%) rispetto a quelle osservate con amuchina (0.12%). Per questo livello di inoculo non sono state registrate differenze della MIC dopo 48h rispetto a quelle osservate dopo 24h.

In generale, i due sanificanti testati sono risultati molto attivi nei confronti di tre dei più pericolosi patogeni associati alla contaminazione delle acque mostrando delle MIC sempre inferiori all'1% e per livelli bassi di inoculo inferiori allo 0.25%. SANIGEN ha mostrato un effetto più battericida che batteriostatico ed infatti non sono state osservate differenze tra le MIC osservate dopo 48h rispetto a quelle alle 24h, cosa non avvenuta per l'amuchina dove si è in molti casi osservato un incremento della MIC passando dalle 24 alle 48h. Inoltre, per basse concentrazioni di *Salmonella* e *Pseudomonas* SANIGEN è risultato più efficace di amuchina.

Le prove eseguite sono state condotte su cellule allo stato planctonico generalmente più suscettibili ad agenti antimicrobici rispetto a quelle in forma di biofilm, e si sa inoltre bene come soprattutto nel campo delle acque sono i microrganismi in forma di biofilm quelli che comportano i maggiori rischi igienico-sanitari e che sono più difficili da eradicare.

Per queste ragioni è stata eseguita una valutazione dell'attività dei 2 sanificanti testati nei confronti di biofilm maturi di *E. coli*. Nello specifico sono state valutate due differenti concentrazioni di SANIGEN e amuchina (pari all'1 e al 2%), sono stati considerati differenti tempi di trattamento (5, 10 e 60 minuti), e due differenti superfici di interesse dell'industria alimentare (acciaio, plastica). A seguito dei trattamenti previsti le superfici sono state

campionate attraverso l'utilizzo di tamponi superficiali e ne è stato stabilito il carico microbico per unità di superficie (cm^2). I controlli erano rappresentati dalle superfici con biofilm di *E. coli* sottoposte al semplice risciacquo con acqua corrente.

In tabella 3 sono riportati i risultati ottenuti su plastica.

PLASTICA	concentrazione	tempo di trattamento		
		5 min log ufc/cm ²	10 min log ufc/cm ²	60 min log ufc/cm ²
SANIGEN	1%	2.43	0.96	<0.5
	2%	1.47	<0.5	<0.5
amuchina	1%	2.88	1.28	<0.5
	2%	1.88	<0.5	<0.5
controllo		6.35		

Tabella 3) Carico cellulare di biofilm di *E. coli* su superficie in plastica a seguito dei differenti trattamenti eseguiti con sanificanti a differente concentrazione e per diversi tempi di trattamento

Come osservabile da tabella 3, la procedura di formazione del biofilm su plastica è stata eseguita in modo corretto e dopo 7gg di immersione in soluzione contenente *E. coli*, il biofilm presente sulla superficie, a seguito di risciacquo, era comunque presente con un carico cellulare pari a 6.35 log ufc/cm².

I trattamenti con le sue soluzioni sanificanti testati sono stati estremamente efficaci e l'efficacia, per entrambi è aumentata con l'aumentare della concentrazione testata e del tempo di trattamento. Infatti, quando impiegate al 2% sia SANIGEN che amuchina sono state in grado di ridurre il carico di biofilm di *E. coli* al di sotto del limite di rilevabilità dopo 10 minuti di trattamento, mostrando un abbattimento del carico del patogeno superiore a 5 log ufc/cm². Con concentrazioni pari all'1% il tempo di trattamento necessario a far scendere il carico di biofilm di *E. coli* al di sotto del limite di rilevabilità (0.5 log ufc/cm²) è stato invece di 60 minuti per entrambi i sanificanti. Comunque, sebbene non abbiano rimosso l'intera biomassa di biofilm, tempi di trattamento di 5 minuti hanno ridotto il carico iniziale di *E. coli* (6.35 log ufc/cm²) di 3.9 e 4.9 log ufc/cm² nel caso di SANIGEN applicato all'1% e al 2% rispettivamente, e di 3.5 e 4.5 log ufc/cm² nel caso di amuchina applicata all'1% e al 2% rispettivamente. Dunque, in base ai dati ottenuti su plastica, seppure entrambi i prodotti abbiano mostrato una elevata attività antibiofilm, SANIGEN si è dimostrato maggiormente efficace.

In tabella 4 sono infine riportati i risultati ottenuti su superfici in acciaio.

ACCIAIO	concentrazione	tempo di trattamento		
		5 min log ufc/cm ²	10 min log ufc/cm ²	60 min log ufc/cm ²
SANIGEN	1%	4.47	3.28	<0.5
	2%	3.19	2.66	<0.5
amuchina	1%	4.71	3.71	<0.5
	2%	3.51	2.88	<0.5
controllo		5.72		

Tabella 4) Carico cellulare di biofilm di *E. coli* su superficie in acciaio a seguito dei differenti trattamenti eseguiti con sanificanti a differente concentrazione e per diversi tempi di trattamento

Come osservabile da tabella 4, su acciaio l'efficacia antibiofilm dei due sanitizzanti testati è risultata inferiore a quella osservata su plastica. Anche in questo caso il biofilm maturo di *E. coli* si era formato adeguatamente sulle superfici mostrando un carico pari a 5.72 log ufc/cm². L'efficacia antibiofilm, per entrambi i trattamenti è aumentata con l'aumentare della concentrazione testata e del tempo di trattamento, tuttavia, in questo caso gli abbattimenti di biofilm al di sotto del limite di rilevabilità sono stati osservati solamente dopo 60 minuti di trattamento. Anche se l'effetto antibiofilm è risultato inferiore a quello osservato su plastica, riduzioni significative del carico di biofilm sono state osservate sia dopo 5 che soprattutto 10 minuti di trattamento, indipendentemente dalla concentrazione testata di ciascun sanificante. Anche in questo caso SANIGEN è risultato maggiormente efficace di amuchina mostrando una riduzione del carico di biofilm di *E. coli* su acciaio leggermente superiore a quella osservata con amuchina.

CONCLUSIONI

La disinfezione e potabilizzazione delle acque rappresenta uno step necessario e obbligatorio per consentire il consumo e l'utilizzo in ambito alimentare. In questo settore, una problematica oggigiorno di grande rilievo è quella di mantenere, entro i limiti microbiologici di legge le acque di serbatoi e cisterne che ristagnando anche per lunghi periodi possono facilmente prestarsi a contaminazioni microbiche accidentali o favorire la formazione di biofilm microbici con rischi potenziali per la salute umana anche di grave entità. Problemi igienici dovuti a una

proliferazione batterica eccessiva possono essere evitati mediante una corretta progettazione e successiva gestione degli impianti e serbatoi, mirate a ridurre il rischio di stagnazione e il verificarsi di temperature favorevoli. Per queste ragioni numerosi sanitizzanti sono stati proposti per la potabilizzazione e il mantenimento della sicurezza microbiologica dell'acqua. Tra questi composti a base cloro sono certamente quelli più utilizzati ma visto le nuove tendenze del mercato verso prodotti più naturali e sostenibili e a minore impatto ambientale anche nuove formulazioni sono state proposte.

In questo contesto, in questo lavoro di tesi è stata valutata l'efficacia antimicrobica e antibiofilm di un sanitizzante innovativo "SANIGEN" commercializzato dall'azienda Acquatravel e contenente Perossidisolfato di potassio e idrogenosolfato dipotassio nei confronti di *Pseudomonas* spp., *E. coli* e *Salmonella* spp. L'efficacia del prodotto innovativo è stata confrontata rispetto a prodotti sanificanti tradizionali a base cloro.

I risultati ottenuti sia su patogeni in stato planctonico che in forma di biofilm hanno indicato le ottime potenzialità del prodotto innovativo SANIGEN nei confronti di biofilm microbici su varie superfici. L'efficacia è stata pari e in molti casi superiore rispetto a quella di prodotti tradizionali a base cloro.

L'efficacia antibiofilm di *E. coli* da parte di SANIGEN è stata elevata sia su superfici in acciaio dove in 60 minuti è stata ottenuta la completa eradicazione del biofilm sia con concentrazioni dell'1% che del 2% che soprattutto su superfici in plastica dove con concentrazioni del 2% di SANIGEN anche trattamenti di 10 minuti sono stati sufficienti a eradicare il biofilm.

Nonostante i risultati interessanti di questa sperimentazione è auspicabile continuare gli studi al fine di comprendere i meccanismi d'azione del prodotto sanificante nei confronti di biofilm microbici e non solo di *E. coli* ma di altri patogeni alimentari.

Elenco delle tabelle

1	Parametri microbiologici acqua potabile; Fonte: Ministero della salute, 2016	4
2	Composizione del Biofilm microbico.....	12
3	Risultati espressi in ufc/ml dei campioni dopo il trattamento	26
4	Risultati espressi in ufc/ml dei campioni controllo	26

Elenco delle figure

1	Principali tecniche di filtrazione Fonte: DM 25/2012	5
2	Micrografia elettronica a scansione SEM di un biofilm sviluppatosi in un sistema di acque industriali	8
3	CLSM Biofilm di <i>P. Aeruginosa</i>	9
4	Fasi di sviluppo del biofilm	10
5	Amuchina soluzione disinfettante concentrata	15
6	Sanigen fronte	16
7	Sanigen retro	16
8	Composizione/informazioni sugli ingredienti di Sanigen	17
9	Vaschette in cui è stato inoculato <i>Escherichia coli 555</i>	21
10	Estrazione del materiale in acciaio trascorsa una settimana in ammollo	21
11	Materiale in acciaio dopo il periodo in ammollo	22
12	Materiale plastico dopo il periodo in ammollo	22
13	Esecuzione del trattamento con Sanigen	22
14	Esecuzione del trattamento con Amuchina	22
15	Estrazione del materiale dopo il trattamento sanitizzante	23
16	Piano di lavoro sotto cappa	28
17	MICROTITER di <i>Escherichia Coli</i>	28
18	MICROTITER <i>Pseudomonas putida</i>	29
19	MICROTITER <i>Salmonella enteritis</i>	29

Bibliografia e Sitografia

- [1] Abhishek Kumar Bhardwaj et al. «An overview of silver nano-particles as promising materials for water disinfection». In: *Environmental Technology & Innovation* 23 (2021), p. 101721. issn: 2352-1864. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101721>. url: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186421003692>.

- [2] *Biofilm: caratteristiche generali e funzioni; Microbiologia Italia; Spinosa, 2021*. url: <https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/biofilm-caratteristiche-generalie-funzioni/>.
- [3] Bojana Boh et al. «Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds». In: *Biotechnology annual review* 13 (2007), pp. 265–301.
- [4] L Bonadonna, G Memoli e G Chiaretti. *Biofilm formation on materials into contact with water: hygienic and technical aspects*. Rapp. tecn. Istituto Superiore di Sanita (Italy), 2008.
- [5] Lucia Bonadonna, Giuliana Memoli e Gianluca Chiaretti. «Formazione di biofilm su materiali a contatto con acqua: aspetti sanitari e tecnologici». In: (giu. 2008).
- [6] Mahmoud Ghannoum et al. *Microbial biofilms*. John Wiley & Sons, 2020.
- [7] Bernhard Meyer. «Approaches to prevention, removal and killing of biofilms». In: *International Biodeterioration & Biodegradation* 51.4 (2003). Hygiene and Disinfection, pp. 249–253. issn: 0964-8305. doi: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00047-7). url: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830503000477>.
- [8] *Scheda di sicurezza sanigen e sanigen professionale*. url: <https://acquatravel.it/schedetecniche-disicurezza/>.