



REPORT FINALE ATTIVITA' SPERIMENTALE LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA/BATTERIOLOGIA DEL DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA E MALATTIE INFETTIVE DELL'UNIVERSITA' SAPIENZA DI ROMA.

TITOLO ATTIVITÀ DI RICERCA

Valutazione dell'effetto battericida/batteriostatico delle lampade LP60-600-1B8(2B8) e LP81-600-1B8(2B8) con tecnologia Biovitae® su matrici abiotiche ed alimentari.

INTRODUZIONE E DESCRIZIONE PROGETTO

Il controllo microbiologico in campo alimentare è di fondamentale importanza per la salute pubblica. Oltre alle procedure definite dal metodo HACCP sulla sicurezza alimentare, diverse sono le strategie che possono essere adottate per limitare la contaminazione e/o replicazione microbica sugli alimenti e sulle superfici su cui sono posizionati. Tali strategie risultano ancor più rilevanti nella grande distribuzione alimentare (supermercati, pasticcerie, macellerie, negozi alimentari in genere), dove gli alimenti devono essere conservati prima di essere venduti ai consumatori. Recentemente, la tecnologia LED è stata utilizzata per l'allestimento di strip contenenti LED che emettono luce alla lunghezza d'onda tra 400 e 420 nm, come la lampada Master Light Biovitae®



ed i dispositivi con tecnologia Biovitae®. Tali lunghezze d'onda sono note per avere una attività microbica (Maclea et al., 2014, DOI: 10.1016/j.jhin.2014.06.004). Questa tecnologia è versatile e facilmente collocabile in diversi ambienti quali, ad esempio, quelli preposti al mantenimento degli alimenti (banchi e frigoriferi da supermercato). Quindi, lo scopo di questo accordo sperimentale è quello di valutare la capacità battericida/batteriostatica della lampada Master Light Biovitae® e dei dispositivi con tecnologia Biovitae® applicati su due tipi di superfici precedentemente contaminate con due ceppi batterici di riferimento appartenenti alle specie maggiormente associate ad infezioni di origine alimentare.

In particolare, verranno utilizzate due diverse superfici rappresentate da acciaio inox e vetro. Tali superfici verranno esposte a due soluzioni contenenti concentrazioni note del ceppo di *Escherichia coli* MG1655 ed il ceppo di *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a (www.who.int/activities/assessing-microbiological-risk-in-food).

I risultati di questa analisi potranno contribuire allo sviluppo di sistemi integrativi di controllo della contaminazione e/o replicazione batterica associata agli alimenti da utilizzare negli esercizi commerciali della grande e piccola distribuzione alimentare.

PIANO SPERIMENTALE

Il piano sperimentale prevede l'esposizione di superfici di acciaio inox e vetro alla lampada Master Light Biovitae® (LED ad attività microbica + LED a luce bianca) ed ai dispositivi Biovitae® LP60-600-1B8-11 [LP60-600-1B8 (2B8)] e LP81-600-1B8 (2B8) precedentemente contaminate con quantità note di ceppi batterici rappresentativi di specie comunemente associate ad infezioni di origine alimentare. I ceppi selezionati sono batteri Gram negativi, ovvero il ceppo di *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 700926) ed il ceppo di *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a (ATCC 33459). La attività



battericida/batteriostatica sarà valutata in esperimenti di time course, attraverso l'enumerazione delle colonie post-esposizione rispetto al controllo non esposto, rispettando gli standard qualitativi descritti dalla ISO 4833-2:2013 (Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms). La procedura di condizionamento della superficie da testare con la coltura batterica utilizzerà il protocollo descritto dalla ISO 22196:2011.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici e superfici testate

Nella seconda fase dello studio sono stati utilizzati il ceppo di *Escherichia coli* MG1655 ed il ceppo di *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a. Tali ceppi sono stati coltivati in terreno ricco di Luria-Bertani per 16 ore a 37°C e, dopo la lettura della densità ottica a 600 nm (OD₆₀₀), le colture batteriche sono state diluite alla concentrazione di 10⁴ batteri/ml in tampone fosfato salino (PBS). Di queste soluzioni batteriche, 1ml è stato depositato sulle superfici da testare. Le superfici testate consistevano in: quadrati 30x30 mm² di acciaio inox e quadrati 24x24 mm² di vetro da microscopia. Tutte le superfici sono state



sterilizzate tramite irraggiamento UV all'interno di una cappa BSL2 prima dell'utilizzo. (Fig.1).

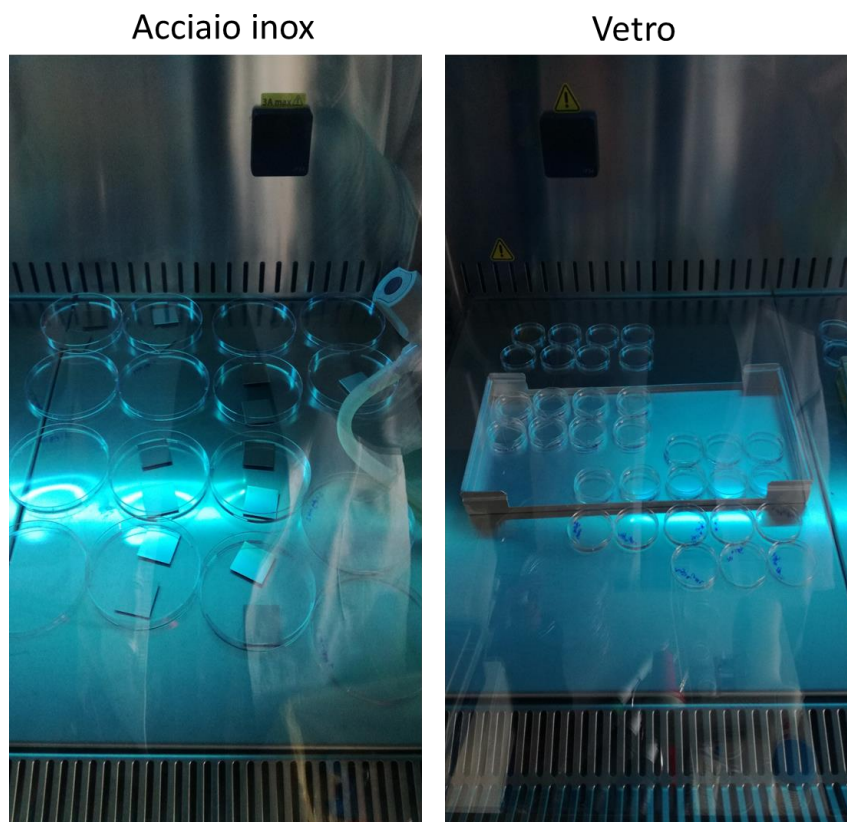


Fig. 1 Sterilizzazione superfici con lampada UV all'interno di una cappa BSL2

Lampade e condizioni di irraggiamento

Le lampade: a) Master Light Biovitae®, b) LP60-600-1B8-11, c) LP81-600-1B8 (2B8) e d) UV (312 nm) sono state posizionate ad una distanza di 25 cm dalle superfici e i tempi di esposizione utilizzati sono stati 4 e 24 ore. In parallelo, superfici gemelle sono state posizionate all'interno di una scatola di polistirolo e sono state utilizzate come controllo non irradiato. Gli esperimenti sono stati condotti all'interno di una camera fredda ad una temperatura di $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.



Conta delle colonie batteriche e rappresentazione dei risultati

I batteri sono stati recuperati tramite prelievo di una aliquota dalle superfici dopo 4 e 24 ore di esposizione. Le aliquote sono state diluite scalarmente e piastrate su piastre agarizzate. Dopo 16-24 ore di incubazione a 37°C le colonie batteriche sono state enumerate. I risultati, mostrati negli istogrammi, sono stati espressi come la media \pm deviazione standard (sd) delle conte di CFU/ml ottenute dalla media del primo e del secondo duplicato biologico per entrambi i ceppi selezionati. La conta delle colonie è stata eseguita in triplicato su due diluizioni scalari.

RISULTATI

La lampada Master Light Biovitae® mostra un effetto battericida su acciaio e vetro a tempi brevi di esposizione. I dispositivi Biovitae® LP60-600-1B8-11 e LP81-600-1B8 (2B8) hanno un effetto battericida su acciaio e vetro a tempi più lunghi di esposizione.

Il secondo test effettuato, esponendo il ceppo di *E. coli* MG1655 all'irraggiamento con le diverse lampade, ha confermato i risultati precedentemente ottenuti. Infatti, la lampada Master Light Biovitae®, sulla superficie acciaio inox, ha causato una riduzione di circa 1 logaritmo del numero delle CFU dopo 4 ore di esposizione ed una riduzione totale dopo 24 ore di esposizione rispetto ai controlli non trattati (percentuale di riduzione della sopravvivenza batterica del 96% e del 100%, rispettivamente), come precedentemente osservato (Fig. 2). Il dispositivo Biovitae® LP60-600-1B8-11 conferma il suo effetto inibitorio sulla vitalità batterica dopo 24 di esposizione (100% di riduzione della sopravvivenza batterica) (Fig. 2). Il dispositivo Biovitae® LP81-600-1B8 (2B8) ha mostrato un effetto totalmente paragonabile al dispositivo LP60-600-1B8-11 e questo è probabilmente dovuto alla sovrapposibilità degli spettri di emissione di questi due dispositivi (Fig. S2 ed S3). L'effetto battericida della lampada Master Light Biovitae® su vetro ha mostrato una riduzione del 98% della sopravvivenza cellulare dopo 4 ore di esposizione e del 100% dopo 24 ore, come precedentemente osservato. I dispositivi Biovitae® LP60-600-1B8-11 e LP81-600-1B8 (2B8) mantengono



l'effetto battericida, su vetro, sempre dopo 24 ore di esposizione. Come atteso, la lampada UV determina la riduzione totale della sopravvivenza batterica sia dopo 4 che dopo 24 ore di esposizione.

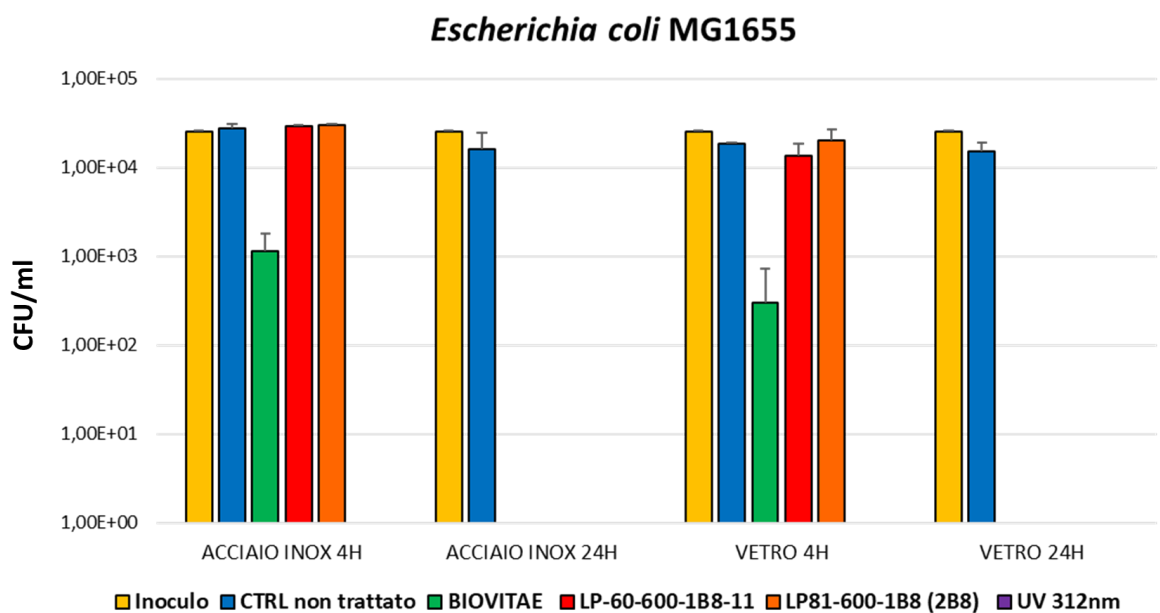


Fig. 2 Conta delle CFU/ml relative all'inoculo iniziale (barre gialle), alle diverse superfici non irradiate (barre blu) ed irradiate con la lampada Master Light Biovitae® (barre verdi), il dispositivo Biovitae® LP60-600-1B8-11 (barre rosse), il dispositivo Biovitae® LP81-600-1B8 (2B8) (barre arancioni) e la lampada UV (barre viola) a 4 e 24 ore. I risultati sono espressi come la media \pm sd di due duplicati biologici. La conta delle colonie è stata eseguita in triplicato su due diluizioni scalari.

Il ceppo di *S. Typhi* Ty21a è stato diluito alla concentrazione di 1×10^4 CFU/ml e 1ml di tale soluzione è stata posizionata sulle diverse superfici.

L'esposizione alla lampada Master Light Biovitae® sia su acciaio inox che su vetro ha determinato il 100% della riduzione della sopravvivenza batterica già dopo 4 ore di esposizione (Fig. 3). Alla stessa tempistica, si è osservata una riduzione della sopravvivenza batterica del 72,20% e del 68,75% rispettivamente per i dispositivi Biovitae® LP60-600-1B8-11 e LP81-600-1B8 (2B8) quando utilizzati per irradiare la superficie vetro. L'effetto battericida è



risultato essere totale (100% di riduzione della sopravvivenza batterica) dopo 24 ore di esposizione su entrambe le superfici testate (Fig. 3).

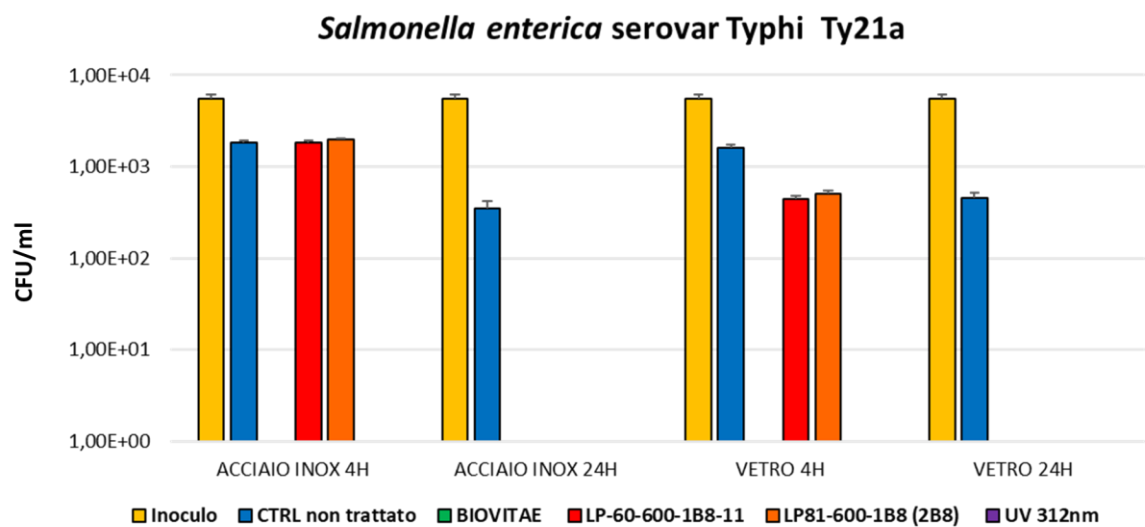


Fig. 3 Conta delle CFU/ml relative all'inoculo iniziale (barre gialle), alle diverse superfici non irradiate (barre blu) ed irradiate con la lampada Master Light Biovitae® (barre verdi), il dispositivo Biovitae® LP60-600-1B8-11 (barre rosse), il dispositivo Biovitae® LP81-600-1B8 (2B8) (barre arancioni) e la lampada UV (barre viola) a 4 e 24 ore. I risultati sono espressi come la media \pm sd di due duplicati biologici. La conta delle colonie è stata eseguita in triplicato su due diluizioni scalari.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I test eseguiti dimostrano che la lampada Master Light Biovitae® ha un effetto battericida su acciaio inox e vetro già a tempi ridotti di esposizione (4 ore) nei confronti di entrambe le specie batteriche testate.

I dispositivi Biovitae® LP60-600-1B8-11 e LP81-600-1B8 (2B8) esercitano una attività battericida nei confronti del ceppo di *S. Typhi* a tempi ridotti di esposizione (4 ore) sulla superficie vetro, inducendo una riduzione della sopravvivenza batterica del 72,20% e del 68,75% rispettivamente. A tempi lunghi di esposizione (24 ore) l'effetto battericida è totale (100% riduzione della sopravvivenza batterica) nei confronti di entrambe le specie batteriche testate e questo effetto si riscontra sia su vetro che su acciaio inox. Da questo studio si può concludere che la tecnologia Biovitae® rappresenta uno strumento di controllo della contaminazione batterica su superfici che sono utilizzate per il deposito degli alimenti in aree refrigerate (banchi frigo o frigoriferi) come l'acciaio inox o il vetro.



Figure supplementari

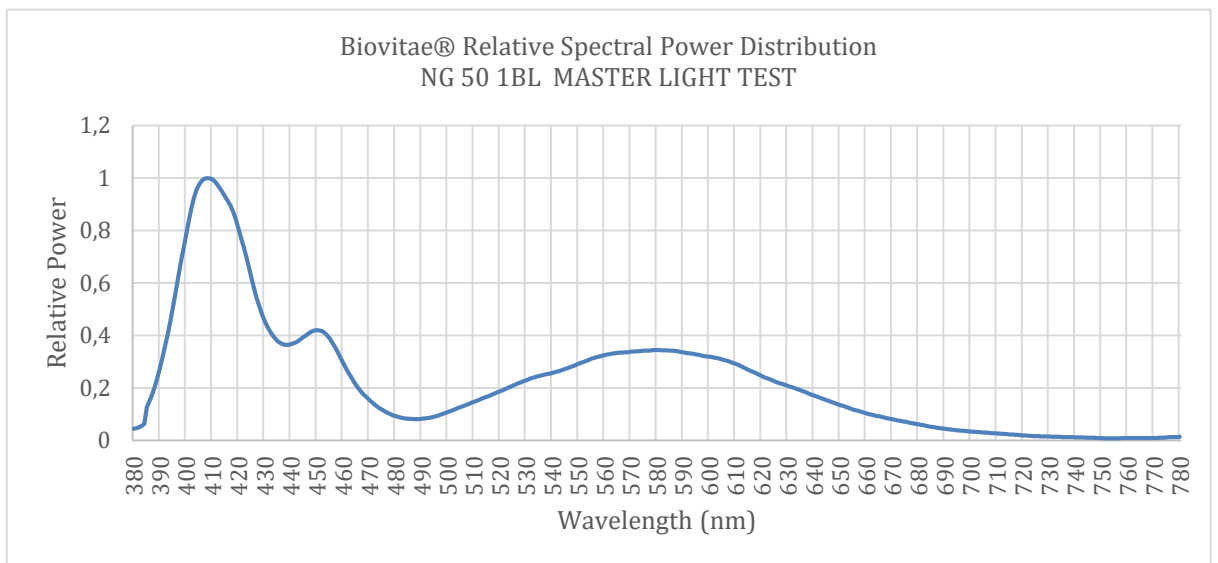


Fig S1 Spettro di emissione lampada Master Light Biovitae®

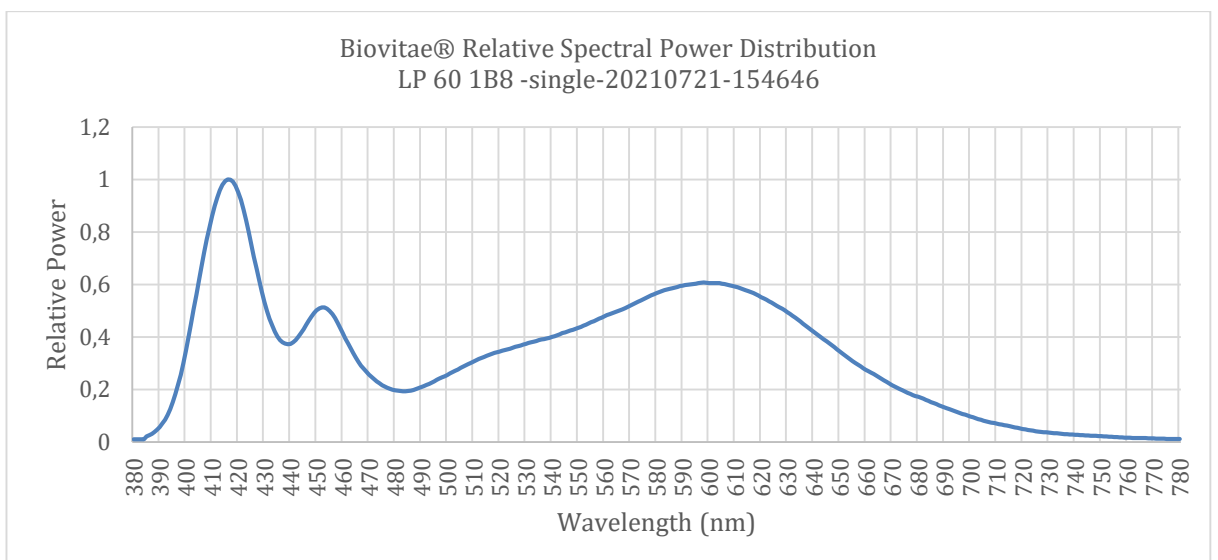


Fig. S2 Spettro di emissione dispositivo Biovitae® LP60-600-1B8-11

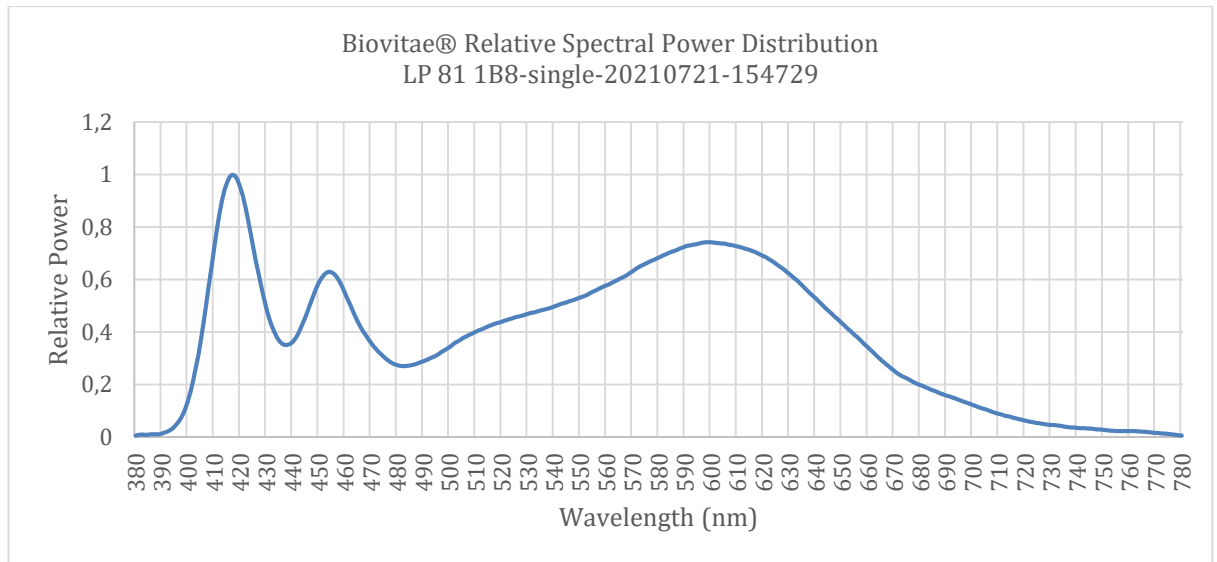


Fig. S3 Spettro di emissione dispositivo Biovitae® LP81-600-1B8 (2B8)

LUOGO E DATA

Roma, 25 novembre 2021

Nome e Cognome: Lucia Nencioni

Qualifica: Responsabile scientifico
del progetto

Firma:

DIPARTIMENTO DI SANITÀ
PUBBLICA E MALATTIE INFETTIVE



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**FINAL REPORT EXPERIMENTAL ACTIVITY MICROBIOLOGY /
BACTERIOLOGY LABORATORY OF THE DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH
AND INFECTIOUS DISEASES OF THE SAPIENZA UNIVERSITY OF ROME.**

RESEARCH ACTIVITY TITLE

**Evaluation of the bactericidal / bacteriostatic effect of
LP60-600-1B8 (2B8) and LP81-600-1B8 (2B8) lamps with
Biovitae® technology on abiotic and food matrices.**

INTRODUCTION AND PROJECT DESCRIPTION

Microbiological control in the food sector is of fundamental importance for public health. In addition to the procedures defined by the HACCP method on food safety, there are several strategies that can be adopted to limit microbial contamination and / or replication on foods and on the surfaces on which they are placed. These strategies are even more relevant in large food distribution (supermarkets, pastry shops, butchers, food shops in general), where food must be stored before being sold to consumers. Recently, LED technology has been used for the preparation of strips containing LEDs that emit light at a wavelength between 400 and 420 nm, such as the Master Light Biovitae® lamp.

University of Rome "Sapienza" Piazzale Aldo
Moro 5, 00185 Rome T (+39) 06 49911

CF 80209930587 PI 02133771002
www.uniroma1.it



and devices with Biovitae® technology. Such wavelengths are known to have microbicidal activity (Macleán et al., 2014, DOI: 10.1016 / j.jhin.2014.06.004). This technology is versatile and can be easily placed in different environments such as, for example, those used for the maintenance of food (supermarket counters and refrigerators). Therefore, the purpose of this experimental agreement is to evaluate the bactericidal / bacteriostatic capacity of the Master Light Biovitae® lamp and the devices with Biovitae® technology applied on two types of surfaces previously contaminated with two reference bacterial strains belonging to the most associated species. to food-borne infections.

In particular, two different surfaces will be used represented by stainless steel and glass. These surfaces will be exposed to two solutions containing known concentrations of the *Escherichia coli* MG1655 and the *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a (www.who.int/activities/assessing-microbiological-risk-in-food).

The results of this analysis will contribute to the development of integrative systems for the control of bacterial contamination and / or replication associated with foods to be used in commercial establishments of large and small food distribution.

EXPERIMENTAL PLAN

The experimental plan provides for the exposure of stainless steel and glass surfaces to the Master Light Biovitae® lamp (LED with microbicidal activity + white light LED) and to the Biovitae® LP60-600-1B8-11 [LP60-600-1B8 (2B8)] and LP81-600-1B8 (2B8) previously contaminated with known quantities of bacterial strains representative of species commonly associated with foodborne infections. The strains selected are Gram negative bacteria, i.e. the strain of *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 700926) and the *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a (ATCC 33459). The activity



bactericidal / bacteriostatic will be evaluated in time course experiments, through the enumeration of post-exposure colonies compared to the unexposed control, respecting the quality standards described by ISO 4833-2: 2013 (Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms). The conditioning procedure of the surface to be tested with bacterial culture will use the protocol described by ISO 22196: 2011.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and surfaces tested

In the second phase of the study, the strain of *Escherichia coli* MG1655 and the *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a. These strains were grown in Luria-Bertani-rich medium for 16 hours at 37 ° C and, after reading the optical density at 600 nm (OD₆₀₀), the bacterial cultures were diluted to a concentration of 10⁴ bacteria / ml in phosphate buffered saline (PBS). Of these bacterial solutions, 1ml was deposited on the surfaces to be tested. The surfaces tested consisted of: squares 30x30 mm² of stainless steel and squares 24x24 mm² glass for microscopy. All surfaces were



sterilized by UV irradiation inside a BSL2 hood before use. (Fig.1).

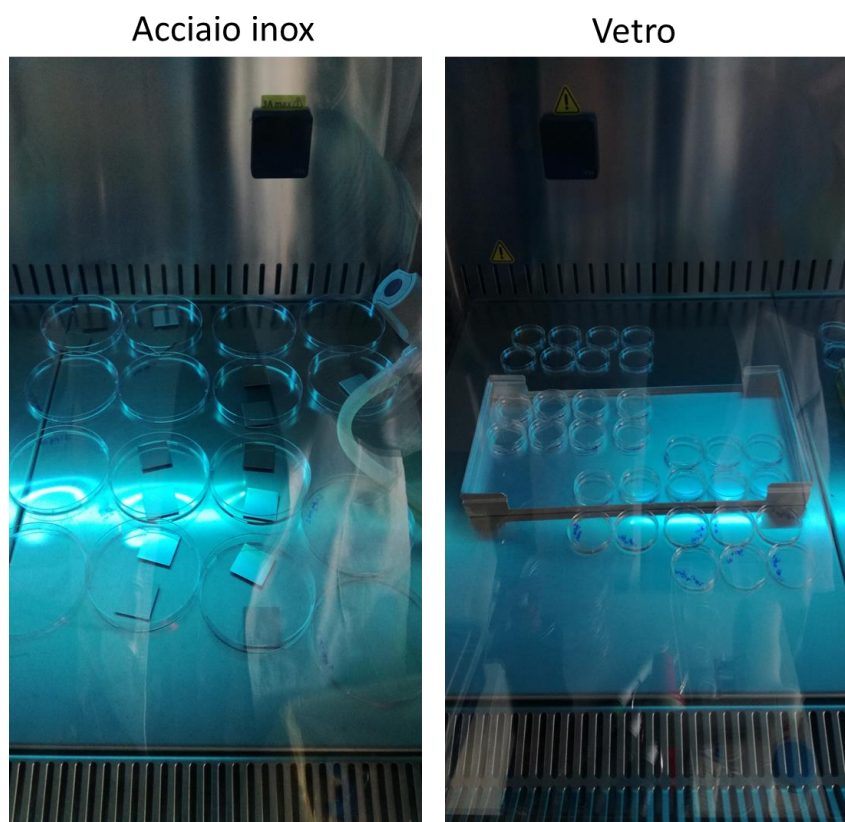


Fig. 1 Surface sterilization with UV lamp inside a BSL2 hood

Lamps and irradiation conditions

The lamps: a) Master Light Biovitae®, b) LP60-600-1B8-11, c) LP81-600-1B8 (2B8) and d) UV (312 nm) were positioned at a distance of 25 cm from the surfaces and of exposure used were 4 and 24 hours. In parallel, twin surfaces were placed inside a styrofoam box and used as a non-irradiated control. The experiments were conducted inside a cold chamber at a temperature of 4 ± 1 ° C.



Counting of bacterial colonies and representation of the results

The bacteria were recovered by taking an aliquot from the surfaces after 4 and 24 hours of exposure. The aliquots were diluted stepwise and plated on agar plates. After 16-24 hours of incubation at 37 ° C the bacterial colonies were enumerated. The results, shown in the histograms, were expressed as the mean \pm standard deviation (sd) of the CFU / mL counts obtained from the mean of the first and second biological duplicates for both selected strains. Colony counts were performed in triplicate on two scaled dilutions.

RESULTS

The Biovitae Master Light lamp® shows a bactericidal effect on steel and glass at short exposure times. Biovitae devices® LP60- 600-1B8-11 and LP81-600-1B8 (2B8) have a bactericidal effect on steel and glass at longer exposure times.

The second test performed, exposing the strain of *E. coli* MG1655 when irradiated with the different lamps, confirmed the results previously obtained. In fact, the Master Light Biovitae® lamp, on the stainless steel surface, caused a reduction of about 1 logarithm in the number of CFUs after 4 hours of exposure and a total reduction after 24 hours of exposure compared to untreated controls (percentage reduction of bacterial survival of 96% and 100%, respectively), as previously observed (Fig. 2). The Biovitae® LP60-600-1B8-11 device confirms its inhibitory effect on bacterial viability after 24 exposure (100% reduction in bacterial survival) (Fig. 2). The Biovitae® LP81-600-1B8 (2B8) device showed an effect totally comparable to the LP60-600-1B8-11 device and this is probably due to the superimposition of the emission spectra of these two devices (Fig. S2 and S3). The bactericidal effect of the Biovitae® Master Light lamp on glass showed a 98% reduction in cell survival after 4 hours of exposure and 100% after 24 hours, as previously observed. Biovitae® LP60-600-1B8-11 and LP81-600-1B8 (2B8) devices maintain



the bactericidal effect, on glass, always after 24 hours of exposure. As expected, the UV lamp determines the total reduction of bacterial survival after both 4 and 24 hours of exposure.

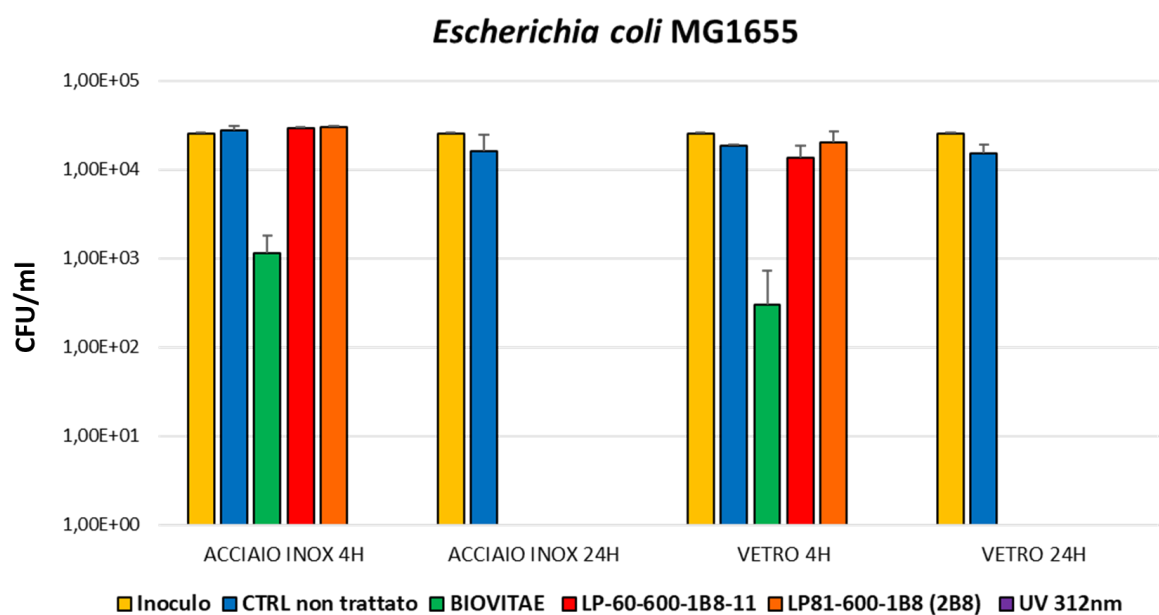


Fig. 2 Count of the CFU / ml relative to the initial inoculum (yellow bars), to the different non surfaces irradiated (blue bars) and irradiated with the Biovitae Master Light lamp® (green bars), the Biovitae® LP60-600-1B8-11 device (red bars), the Biovitae® LP81-600-1B8 (2B8) device (orange bars) and the UV lamp (purple bars) at 4 and 24 hours . The results are expressed as the mean \pm sd of two biological duplicates. Colony counts were performed in triplicate on two scaled dilutions.

The strain of *S. Typhi* Ty21a was diluted to a concentration of 1×10^4 CFU / ml and 1ml of this solution was placed on the different surfaces. Exposure to the Biovitae® Master Light lamp on both stainless steel and glass resulted in a 100% reduction in bacterial survival already after 4 hours of exposure (Fig. 3). At the same time frame, a reduction in bacterial survival of 72.20% and 68.75% was observed for the Biovitae® LP60-600-1B8-11 and LP81-600-1B8 (2B8) devices, respectively, when used to irradiate the glass surface. The bactericidal effect is



found to be total (100% reduction in bacterial survival) after 24 hours of exposure on both surfaces tested (Fig. 3).

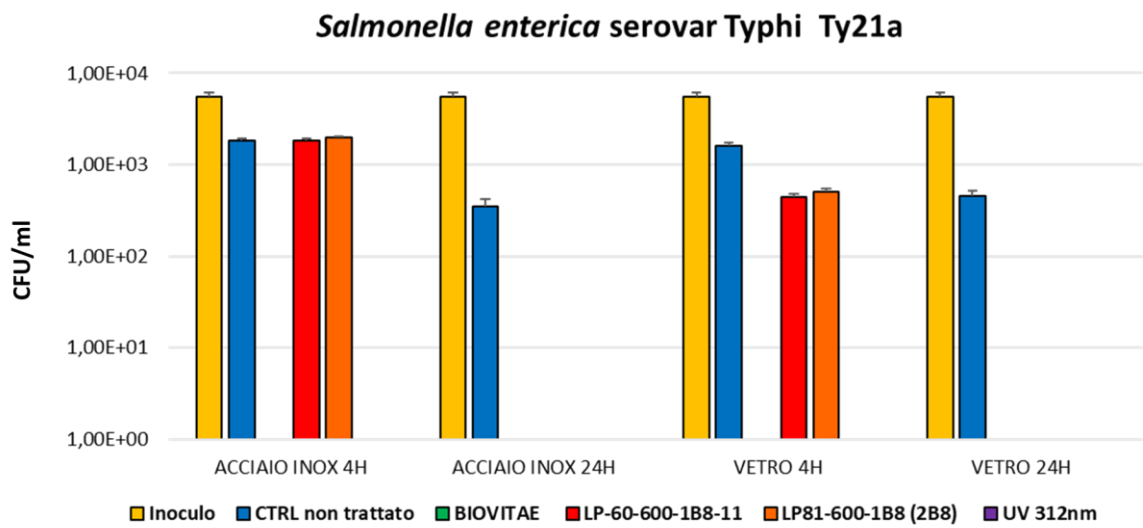


Fig. 3 Count of CFU / ml related to the initial inoculum (yellow bars), to the different non-irradiated surfaces (blue bars) and irradiated with the Biovitae Master Light lamp® (green bars), the Biovitae device® LP60-600-1B8-11 (red bars), the Biovitae device® LP81-600-1B8 (2B8) (orange bars) and the UV lamp (purple bars) at 4 and 24 hours. The results are expressed as the mean \pm sd of two biological duplicates. Colony counts were performed in triplicate on two scaled dilutions.



DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The tests performed show that the Master Light Biovitae® lamp has a bactericidal effect on stainless steel and glass already at reduced exposure times (4 hours) against both bacterial species tested. Biovitae® LP60-600-1B8-11 and LP81-600-1B8 (2B8) devices exert bactericidal activity against the strain of *S. Typhi* with reduced exposure times (4 hours) on the glass surface, inducing a reduction in bacterial survival of 72.20% and 68.75% respectively. At long exposure times (24 hours) the bactericidal effect is total (100% reduction in bacterial survival) against both bacterial species tested and this effect is found both on glass and on stainless steel. From this study it can be concluded that Biovitae® technology represents a tool for controlling bacterial contamination on surfaces that are used for storing food in refrigerated areas (refrigerated or refrigerated counters) such as stainless steel or glass.



Additional figures

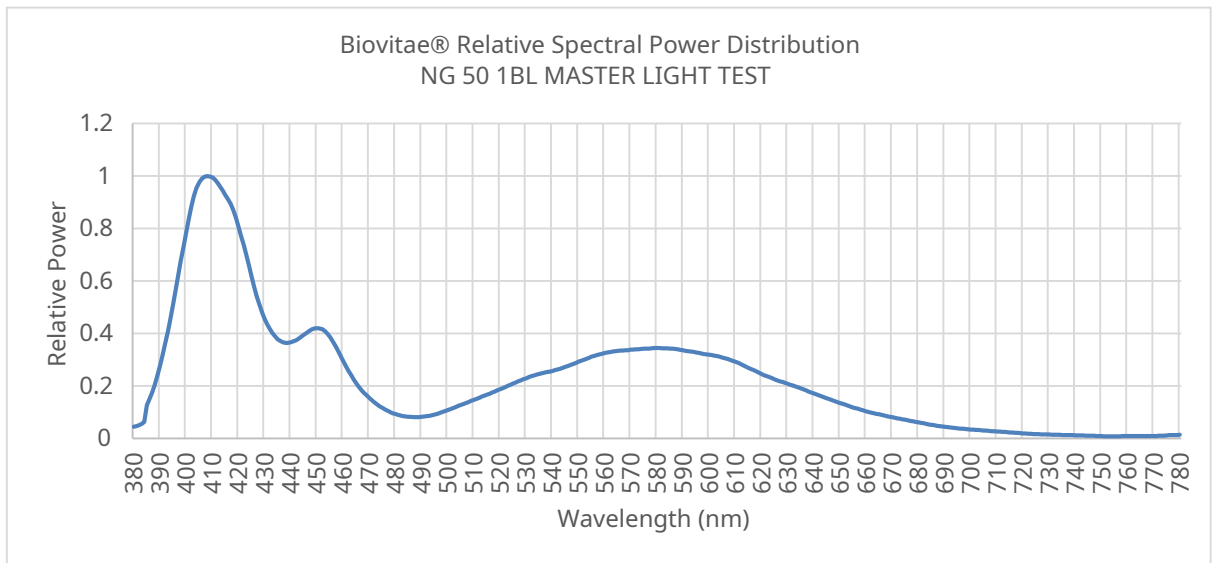


Fig S1 Emission spectrum of Biovitae® Master Light lamp

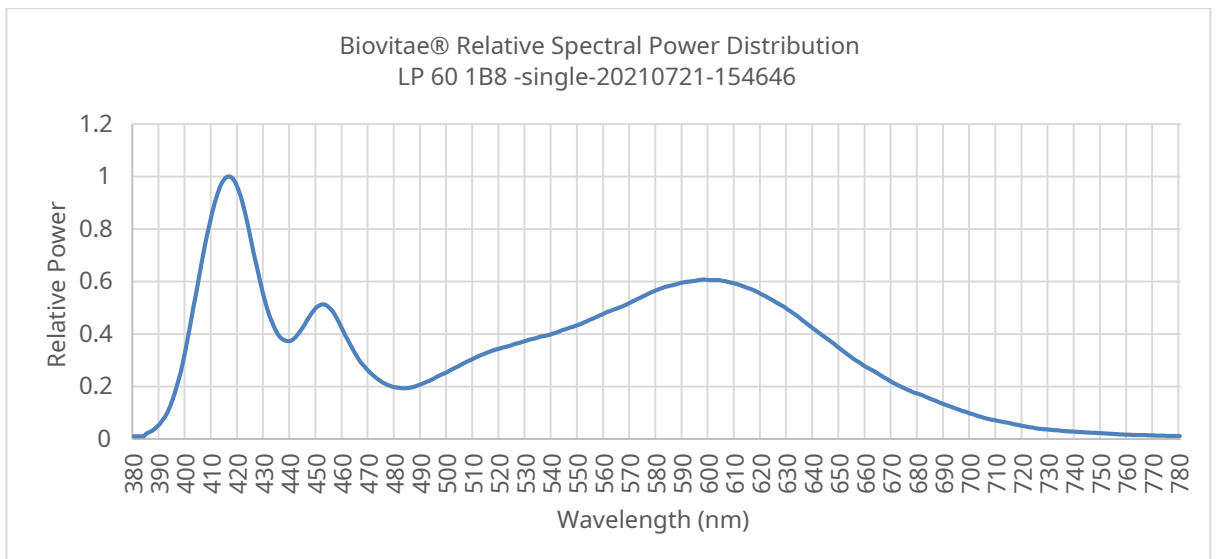


Fig. S2 Device emission spectrum Biovitae® LP60-600-1B8-11

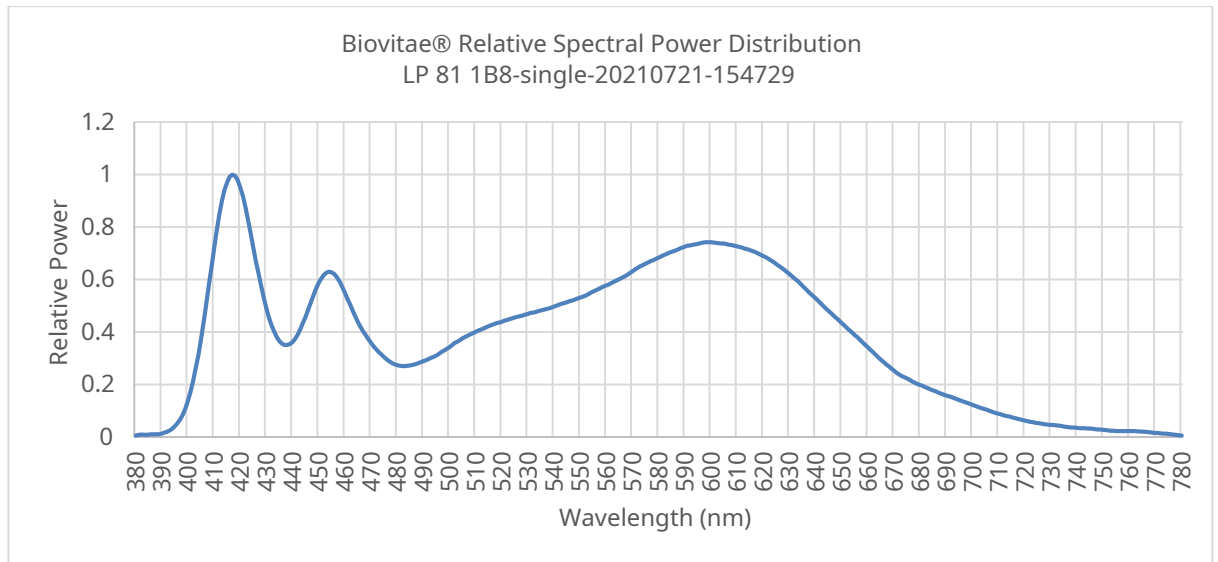


Fig. S3 Device emission spectrum Biovitae® LP81-600-1B8 (2B8)

PLACE AND DATE

Rome, November 25, 2021

Name and Surname: Lucia Nencioni

Qualification: Scientific manager
of the project

Signature:



misura nei controlli non trattati. Per risolvere questo problema tecnico, gli esperimenti saranno ripetuti diminuendo i tempi di esposizione e/o aumentando la soluzione batterica depositata sulle superfici. Tale setting permetterà di verificare l'attività esclusivamente delle lampade rispetto alla percentuale di riduzione della sopravvivenza batterica dovuta all'evaporazione del liquido di risospensione.

Durante la seconda fase dello studio sarà inoltre inclusa una matrice organica costituita da frutta per testare l'efficacia delle lampade su superfici biotiche.

Nome Cognome
Lucia Nencioni

Qualifica
Responsabile scientifico

Firma

LUOGO E DATA

Roma, 31 luglio 2021