

## “Study on the efficacy of UV-C emitters in inactivating *Aspergillus fumigates* spores”.

---

A. Mansi, A. Militello\*, R. Bruni, M. Borra\*, A.M. Marcelloni, E. Paba, A. Chiominto, N. L’Episcopo, R. Sisto\*.

Laboratory of Biological Agents, \*Laboratory of Physical Agents - ISPEL Occupational Hygiene Department – Via Fontana Candida, 1 00040 Monte Porzio Catone (RM)

### INTRODUCTION

Biological contamination in the indoor environment is recognised as a major health concern and the reducing occupant exposure to indoor air pollutants is the primary goal of the majority of Indoor Air Quality (IAQ) research.. It is well recognised that fungi can colonise and grow on a variety of building materials if sufficient nutrients and moisture are present. Mold contamination has been associated with a variety of building and furnishing materials including carpet, ceiling tile, gypsum wallboard, flooring, insulation, and heating and air-conditioning components (**Menetrez M.Y. et al., 2004**). In indoor environment the fungal contamination of air-handling units (AHUs) is a widespread phenomenon in buildings with central heating, ventilation, and air-conditioning (HVAC) systems and is a potential source of contamination for occupied spaces . Fungi have been found growing on air filters, insulation, and cooling coils, as well as in ducts. This contamination often contributes to building-related diseases, including both infectious diseases and hypersensitivity diseases, such as allergic rhinitis, asthma, and hypersensitivity pneumonitis. Various manufacturers are marketing germicidal UV emitters for controlling contamination and some studies have shown that these measures may be effective for controlling the spread of microbial diseases (**Levetin E. et al, 2001**). Commercially available low-pressure mercury-vapor lamps are commonly used for ultraviolet

## “Studio sull’efficacia degli emettitori UV-C nell’inattivazione delle spore di *Aspergillus fumigates*”

---

A. Mansi, A. Militello\*, R. Bruni, M. Borra\*, A.M. Marcelloni, E. Paba, A. Chiominto, N. L’Episcopo, R. Sisto\*.

Laboratorio di agenti biologici, \* Laboratorio di agenti biologici – ISPEL Dipartimento di Igiene occupazionale - Via Fontana Candida, 1 00040 Monte Porzio Catone (RM)

### INTRODUZIONE

La contaminazione biologica di ambienti chiusi è riconosciuta come una preoccupazione di primaria importanza per la salute e la riduzione dell’esposizione degli occupanti agli inquinanti dell’aria è un obiettivo principale per la maggior parte della ricerca sulla qualità dell’aria interna (Indoor Air Quality – IAQ).E’ ben noto che funghi possano colonizzare e crescere su una varietà di materiali edilizi se sono presenti sufficienti nutrienti e umidità. La muffa è stata associata ad una varietà di materiali di costruzione ed arredamento inclusi tappeti, moquette, controsoffitti, cartongesso, pavimentazioni, isolamento e componenti per riscaldamento e condizionamento(**Menetrez M.Y. et al., 2004**). In ambienti chiusi la contaminazione di funghi di unità di trattamento dell’aria (U.T.A.) è un fenomeno assai diffuso negli edifici con riscaldamento centralizzato, ventilazione e sistemi di condizionamento dell’aria (HVAC)ed è una potenziale fonte di contaminazione per spazi occupati. Si è visto che funghi crescono su filtri per l’aria,isolamento e batterie di raffreddamento così come nei condotti d’aria. Questa contaminazione spesso contribuisce alle malattie relative agli edifici, incluse le malattie infettive e ipersensibili, così come riniti allergiche, asma, e polmoniti ipersensibili. Diversi produttori stanno mettendo in vendita emettitori germicidi UV per controllare la contaminazione ed alcuni studi hanno mostrato che queste misure possono essere efficaci per controllare la diffusione di malattie microbiche

germicidal air irradiation applications. Since about 90% of the ultraviolet energy from these lamps is radiated at the 254 nm line, which is near the peak of the maximum bactericidal activity at 265 nm, these lamps are nearly ideal generators for this purpose (**Kujundzic E. et al. 2007**). Susceptibility of microorganisms to UVC depends on the complexity of the microorganism's structure, its ability to repair structural damages, and its general sensitivity (**Ko G. et al., 2002**). Short-wave ultraviolet radiation, in the "C" band (100 to 280 nanometers) has been used for over 100 years. The production of UV light employs an electrical discharge through low-pressure mercury vapor enclosed in a glass tube. This technique produces a tube type bulb with a primary wavelength of 253.7 nm, and is within the "C" band of UV (UVC).

The UV-C form of irradiation is also referred to as UVGI (ultraviolet germicidal irradiation). It has been demonstrated to deactivate bacteria, fungi, viruses, and mycoplasma by penetrating the outer structure of the cell and alters the DNA molecule, preventing replication and causing cell death (**Nagy R., 1964; Menetrez M.Y. et al., 2006**).

In the past years, the application of UVGI irradiation has been limited to controlling the transmission of infectious diseases (mainly tuberculosis) in medical facilities (Andersen B.M. et al., 2005). Recently, a growing trend in UVGI applications is in the use of heating, ventilating, and air-conditioning (HVAC) duct mounted treatment of indoor air. The dominant fungi found within the HVACs air samples included *Penicillium Aspergillus* and *Cladosporium spp.* These three taxa accounted for more than 90% of all viable fungi isolated (**Ko G. et al., 2002, Niemeier J. et al., 2006, Wilson S.C. et al., 2007**).

(**Levetin E. et al, 2001**).

Le lampade a vapori di mercurio a bassa pressione disponibili sul mercato sono comunemente utilizzate per applicazioni con irradiazioni germicide ultraviolette dell'aria. Dal momento che circa il 90 % dell'energia ultravioletta da queste lampade viene irradiata a 254 nm, che è vicino al picco della massima attività battericida, queste lampade sono quasi generatori ideali per questo scopo (**Kujundzic E. et al. 2007**). La suscettibilità dei microorganismi agli UVC dipende dalla complessità della struttura del microorganismo, la sua abilità di riparare danni strutturali, e la sua sensibilità generale (**Ko G. et al., 2002**). Le radiazioni ultraviolette ad onda corta, nella banda "C" (da 100 a 280 nanometri) sono stati usati per più di cento anni. La produzione di luce UVC impiega una scarica elettrica attraverso i vapori di mercurio a bassa pressione racchiusi in un tubo di vetro. Questa tecnica produce una lampada a tubo con una primaria lunghezza d'onda di 253.7 nm, ed è all'interno della banda "C" degli UV (UVC).

La forma di irradiazione UV-C viene anche chiamata UVGI (irradiazione germicida ultravioletta). E' stato dimostrato disattivare batteri, funghi, virus, e micoplasmi attraverso la penetrazione della struttura esterna della cellula e altera il DNA della molecola, impedendo la replicazione e provocando la morte della cellula (**Nagy R., 1964; Menetrez M.Y. et al., 2006**).

Negli anni scorsi l'applicazione delle radiazioni UVGI è stata limitata al controllo della trasmissione di malattie infettive (principalmente la tubercolosi) nei presidi medici (Andersen B.M. et al., 2005). Recentemente, una tendenza in crescita nelle applicazioni UVGI è nell'uso nel trattamento dell'aria interna nel riscaldamento, ventilazione e condizionamento (HVAC) canalizzati. Il fungo dominante trovato nei campioni di aria all'interno dei sistemi di ventilazione riscaldamento e condizionamento (HVAC) includeva *Penicillium Aspergillus* and *Cladosporium spp.* Questi tre taxa rappresentavano più del 90 % di tutti i funghi vitali isolati (**Ko G. et al., 2002, Niemeier J. et al., 2006, Wilson S.C. et al., 2007**).

## AIM OF THE STUDY

Although it has been known for many years that UV light has various effects on microorganisms, only a few studies have specifically focused on the effects of UV-C radiation for controlling fungal contamination in HVAC systems. The present investigation was undertaken to determine the germicidal efficacy of an UVC emitter tested on *Aspergillus fumigatus* by (i) characterizing the factors affecting UVC light placement with regard to target surfaces, (ii) calculating the reduction in microbial populations after exposure to UVC.

## MATERIALS AND METHODS

### **Preparation of *Aspergillus* spores**

The microorganism used in the current study was a well characterized strain of *Aspergillus fumigatus* (KM 8001). Fungi were grown on Malt Extract Agar (MEA) plates at 25°C for 5-7 days. Spore stocks were prepared according to the method described by **Couvert et al. (1999)**. Briefly, fungal spores were collected by scraping the surface of the agar and suspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. Appropriate dilutions were performed in order to get the right concentration for counting in a cell-counting hemacytometer. The number of viable spores per milliliter was determined by serially diluting the preparation and spread plating the spore suspension onto triplicate MEA plates. The MEA plates were incubated as described above, and the mean number of viable spores released in each trial was then estimated. The number of spores used to inoculate each plate was sufficiently high to provide an adequate challenge but at a level that is realistic to quantify. Purified spores of the strains were diluted in order to obtain a density of 100–150 CFU per ml. Once the proper dilution was obtained, 1 mL of *Aspergillus* spores was spread onto a Petri dishes filled with Malt Extract Agar (MEA). The plates were pre-labeled with the organism name, time of exposure and the exact position on the platform holding samples in the exposure chamber.

## SCOPO DELLO STUDIO

Sebbene sia stato ben noto per molti anni che la luce UV ha vari effetti sui microorganismi, solo pochi studi si sono specificatamente concentrati sugli effetti della radiazione UV-C per controllare la contaminazione di funghi nei sistemi HVAC. La presente investigazione è stata fatta per determinare l'efficacia germicida di un emettitore UVC provato su *Aspergillus fumigatus* attraverso (i) la qualificazione dei fattori che influenzano la posizione della luce UVC con riguardo alla superficie dell'obbiettivo, (ii) il calcolo della riduzione della popolazione di microbi dopo l'esposizione agli UVC.

## MATERIALI E METODI

### **Preparazione delle spore di *Aspergillus***

Il microorganismo usato in questo studio era una specie ben definita di *Aspergillus fumigatus* (KM 8001). I funghi sono sviluppati in dischi di Malt Extract Agar (MEA) a 25 ° C per 5 – 7 giorni. I ceppi di spore sono stati preparati secondo il metodo descritto da **Couvert et al. (1999)**. In breve, le spore di funghi sono state ottenute grattando la superficie dell'agar e sospese in soluzione tampone salina di fosfato (PBS), pH 7.2. Adeguate diluizioni sono state effettuate per ottenere la giusta concentrazione per la conta in un emocitometro conta- cellule. Il numero di spore isolate per millimetro è stato determinato diluendo in serie la preparazione e cospargendo con una patina di sospensione di spore su tre dischi MEA. I dischi MEA sono stati incubati come sopra descritto, ed il numero medio di spore isolate rilasciato in ogni campione è stato poi stimato. Il numero di spore usato per inoculare ogni disco è stato sufficientemente elevato da fornire un'adeguata sfida ma ad un livello che fosse realistico quantificare. Le spore purificate dei ceppi sono state diluite in modo da ottenere un densità di 100 – 150 CFU per ml. Una volta ottenuta l'adeguata diluizione, 1 mL di spore di *Aspergillus* sono state spruzzate su un disco Petri pieno di Malt Extract Agar (MEA). I dischi sono stati pre-etichettati con il nome dell'organismo, tempo di esposizione e l'esatta posizione sulla piattaforma contenente i campioni nella camera di esposizione.

### **Exposure chamber and UVC emitter characteristics.**

A commercially available UVC emitter was installed inside an exposure chamber assembled with wood panels black dull painted (Fig.1). The low-pressure mercury UVC emitter (model DE double-ended 42 cm length) was provided by STERILE-AIRE Inc. The axis of UV emitter is parallel to the mobile platform holding the inoculated plates. The incident irradiance was measured in different places of the holding platform: where irradiance values resulted the same, the inoculated plates were placed. During the experiment the UVC irradiance at the surface of the inoculated plates was measured using a spectroradiometer (Ocean Optics model QE 65000) mounting a back-thinned detector electrically cooled with 90% quantum efficiency in the UV-spectrum, calibrated with NIST traceable UV-VIS lamp. The spectrometer was equipped with a 200  $\mu\text{m}$  optical fiber, mounting a cosine corrector diffuser. The integration time was set to 100 ms and the resultant spectral irradiance was obtained averaging five spectra. The spectral irradiance was constantly monitored during the exposure.

The UVC emitter was placed inside the exposure chamber behind a removable UVC shutter as shown in Fig. 2.

The exposure chamber was in thermal equilibrium with room temperature (about 24°C).

Relative humidity and temperature values inside the chamber were checked during the tests by a calibrated thermo-hygrometer (Velocicalc Plus model 8360-M-GB by TSI Inc.).

### **Assessment of UVC dose**

The UVC dose is a function of the distance from the UV source and the duration of exposure.

In the present study, the irradiance was kept constant and, as consequence, the time of exposure is the dose controlling variable.

Calculations of total UVC doses were performed for all the UVC measurements by using the following formula:

$$\text{UVC dose } (\text{J}/\text{cm}^2) = \text{irradiance } (\text{W}/\text{cm}^2) \times$$

### **Caratteristiche della camera di esposizione e dell'emettitore UVC.**

Un emettitore UVC disponibile sul mercato è stato installato all'interno di una camera di esposizione assemblata con pannelli di legno dipinti in nero opaco (Fig. 1). L'emettitore UVC a mercurio in bassa pressione (modello DE a doppia estremità lungo 42 cm.) è stato fornito da Steril-air Inc. L'asse dell'emettitore UV è parallelo alla piattaforma mobile contenente i dischi inoculati. L'incidenza della radiazione è stata misurata in diversi punti della piattaforma di supporto: i dischi inoculati sono stati posti dove i valori di irradiazione sono risultati uguali. Durante l'esperimento la irradiazione UVC sulla superficie dei dischi inoculati è stata misurata usando uno spettrometro (Ocean Optics model QE 65000) che montava un detector assottigliato nel retro raffreddato elettricamente con il 90 % di efficienza quantum nello spettro UV, calibrato con lampada UV-VIS tracciabile NIST. Lo spettrometro è stato equipaggiato con fibra ottica a 200  $\mu\text{m}$ , montando un diffusore a correttore di coseno. Il tempo di integrazione è stato fissati a 100 ms e la risultante irradiazione spettrale è stata ottenuta mediando cinque spettri. L'irradiazione spettrale è stata costantemente monitorata durante l'esposizione.

L'emettitore UVC è stato posizionato all'interno della camera di esposizione dietro uno schermo per UVC rimovibile come mostrato nella Fig. 2.

La camera di esposizione era in equilibrio termico con la temperatura ambiente (circa 24 °C).

L'umidità relativa ed i valori termici interni alla camera venivano controllati durante le prove da termo igrometri calibrati (Velocicalc Plus model 8360-M-GB by TSI Inc.).

### **Determinazione della dose di UVC**

La dose di UVC è in funzione della distanza dalla sorgente di UV e la durata dell'esposizione.

Nel presente studio, l'irradiazione veniva mantenuta costante e, di conseguenza, il tempo di esposizione è la variabile sulla dose di controllo.

Calcoli delle dosi totali di UVC sono state effettuate per tutte le misurazioni utilizzando la seguente formula:

$$\text{UVC dose } (\text{J}/\text{cm}^2) = \text{irradiance } (\text{W}/\text{cm}^2) \times$$

exposure time (in seconds) (1)

This position was maintained throughout the series of experiments allowing dose to be calculated as a function of exposure time. The dose is defined as the UVGI irradiance received by a microorganism during the duration of exposure.

If  $N_t$  is the number of microorganisms at any time  $t$ ,  $N_0$  is the number of microorganisms at the start, before exposure begins,  $N_t/N_0$  is the fraction of microorganisms surviving,  $h$  ( $\text{cm}^2/\mu\text{W}\cdot\text{s}$ ) is a microorganism-dependent rate constant (Menetrez K.K. et al., 2006).

The following equation can be used to model the  $N_t$  evolution in time

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-h \cdot \text{dose}} = e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2)$$

$N_0$  is the initial number of microorganisms and  $N_t/N_0$  is the fraction of surviving microorganisms at time  $t$ . Considering that the dose is the product of the effective irradiance received by the microorganism during the exposure,  $t$  is the time at which, at fixed irradiance, the absorbed dose determines the reduction by a factor  $1/e$  of the initial value of the microbial population.

From eq. (2) it is easy to deduce the number of killed microorganisms at time  $t$ :

$$N_k = N_0 (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (3)$$

The measured irradiance at the position of the surface of the exposed agar plates (80 cm from the emitter) was about  $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  (mean temperature +  $24.0 \text{ }^\circ\text{C}$  and 37% relative humidity).

#### UVC exposure

Before beginning each experiment, the UVC light was turned on and allowed to warm up for approximately 2 hours. *Aspergillus* spores were exposed to UVC irradiation at various exposure times. The inoculated plates were placed on a sample holder and the sliding door closed for the laboratory personnel protection. The plate surface was perpendicular to the direction of the UVC flux. With the UVC shutter down, the plates were placed inside the

exposure time (in seconds) (1)

Questa posizione è stata mantenuta durante la serie di esperimenti consentendo il calcolo della dose come una funzione del tempo di esposizione. La dose è definita come l'irradiazione UVGI ricevuta da un microorganismo per la durata dell'esposizione.

Se  $N_t$  è il numero di microorganismi in qualsiasi tempo  $t$ ,  $N_0$  è il numero di microorganismi all'inizio, prima che cominci l'esposizione,  $N_t/N_0$  è la frazione di microorganismi sopravvissuti,  $h$  ( $\text{cm}^2/\mu\text{W}\cdot\text{s}$ ) è un indice costante microorganismo-dipendente (Menetrez K.K. et al., 2006).

La seguente equazione può essere usata per modellare l'evoluzione  $N_t$  nel tempo

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-h \cdot \text{dose}} = e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2)$$

$N_0$  è il numero iniziale di microorganismi e  $N_t/N_0$  è la frazione di microorganismi sopravvissuti al tempo  $t$ . Considerando che la dose è il prodotto dell'effettiva irradiazione ricevuta dal microorganismo durante l'esposizione,  $t$  è il tempo nel quale, ad irradiazione fissa, la dose assorbita determina la riduzione di un fattore  $1/e$  del valore iniziale della popolazione microbiale. Dall'equazione (2) è facile dedurre il numero di microorganismi uccisi nel tempo  $t$ :

$$N_k = N_0 (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (3)$$

L'irradiazione misurata alla posizione della superficie dei dischi di agar (80 cm dall'emettitore) è stata di circa  $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  (temperatura media +  $24.0 \text{ }^\circ\text{C}$  e 37 % umidità relativa).

#### Esposizione agli UVC

Prima di iniziare ogni esperimento, la luce UVC veniva accesa e consentito che si scaldasse per circa 2 ore. Le spore di *Aspergillus* venivano esposte alle irradiazioni di UVC a vari tempi di esposizione. I dischi inoculati venivano posti su un supporto per campioni e la porta scorrevole chiusa per protezione del personale di laboratorio. La superficie dei dischi era perpendicolare alla direzione del flusso degli UVC. Con lo schermo degli UVC abbassato, i

chamber and the lids were removed. The exposure time was initiated when the shutter was very quickly lifted (taking a small fraction of a second) up allowing the UV light to travel down the duct to the plates. A timer was set for the proper exposure time and started when the UVC shutter was fully lifted. At the end of the exposure time, the shutter was quickly lowered back.

When the exposure time had expired, the plates were removed from the chamber. In all experiments, the plates were kept at the same distance from the UV source (80 cm) to the aim of maintaining constant the irradiance and varying the absorbed dose by modifying only the exposure time.

One after another, the inoculated plates were then exposed to the UVC light in the same manner (four Petri dishes were used for each exposure), for different exposure times. Upon completion of the experiment, all of the plates were placed into an incubator at the appropriate temperature (25°C) until moderate growth was visible (4-5 days), then the colonies forming units for plate (CFU/plate) were counted. Four control plates inoculated with the organism were also placed in the incubator to represent the zero exposure time.

#### ***Ozone concentration***

Ozone is produced by a variety of UV bulbs in the 185 nm emission line for mercury in lowpressure discharge emitters. The ozone concentration into the chamber was measured with ozone monitor (Thermo Environmental Instrument 49C Analyzer).

dischi venivano posizionati all'interno della camera ed i coperchi venivano rimossi (in una piccola frazione di secondo) consentendo alla luce UV di viaggiare attraverso il condotto fino ai dischi. Un timer era stato approntato per un tempo appropriato di esposizione e attivato quando lo schermo era completamente sollevato. Al termine del tempo di esposizione, lo schermo veniva rapidamente abbassato di nuovo.

Quando il tempo di esposizione era terminato, i dischi venivano rimossi dalla camera. In tutti gli esperimenti, i dischi venivano tenuti alla stessa distanza dalla sorgente di UV (80cm) allo scopo di mantenere costante l'irradiazione e variare la dose assorbita modificando solo il tempo di esposizione.

Uno dopo l'altro, i dischi inoculati venivano esposti alla luce UVC nella stessa maniera (quattro dischi Petri venivano usati per ogni esposizione), per tempi di esposizione differenti. Ad esperimento completato, tutti i dischi venivano posti in una stufa termostatica a temperatura appropriata (25 °C) finchè una moderata crescita era visibile (4 – 5 giorni), poi le unità che formavano le colonie per disco venivano contate (CFU/disco). Anche quattro dischi di controllo inoculati con gli organismi vennero posti nella stufa termostatica per rappresentare l'esposizione a tempo zero.

#### ***Concentrazione di ozono***

L'ozono viene prodotto da una varietà di lampade UV nella linea di emissione a 185 nm per il mercurio negli emettitori a bassa pressione. La concentrazione di ozono nella camera è stata misurata con un monitor di ozono (Thermo Environmental Instrument 49C Analyzer).

## RESULTS AND DISCUSSION

In this paper we report the results concerning the UVC emitter killing effectiveness on *Aspergillus fumigatus* spores. This microorganism is an opportunistic fungal pathogen responsible for severe, life-threatening infections in immunocompromised patients. *Aspergillus fumigatus* has been isolated from several indoor environments where and it is common in dust infiltrating from outdoor air, wet building and finishing material, HVAC insulations, fans, filters, humidifier water, etc. Airborne conidia are the infectious agent and can reach the lower parts of the respiratory system. It is classified as harmful biological agents in the occupational risk group 2 (**D.Lgs 626/94; European Directive 2000/54/CE**) being responsible for high mortality rates in the immunosuppressed population. *Aspergillus spp.* exposure is difficult to avoid. Colonization of HVAC systems can shed spores into a building with consequential exposure risk for the occupants. Indoor dust contains spores and thermotolerant molds may colonize damp or water-damaged building materials or components. In this preliminary study, the results concerning the germicidal efficacy of an UVC emitter tested on *Aspergillus fumigatus* are described.

During the experiments, the observation was done that the value of the irradiance at 253.7 nm line increased during the first minute and then decreased asymptotically to a fixed value. The extent of this variability was approximately 5% (Fig.3). A possible explanation of this effect is the development of ozone molecules into the chamber that cause an attenuation of the irradiance at 253.7 nm (Fig. 4). Initially, the ozone concentration decreases (and consequently the irradiance at 253.7 nm increased) following the inlet of fresh air when the sliding door was opened for the placement of the Petri dishes into the chamber. Subsequently, the ozone concentration increased and the irradiance decreased until to reaching constant irradiance values as consequence of the equilibrium between the amount of ozone produced by UVC emitter and those consumed.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo studio riportiamo i risultati riguardanti l'efficacia di uccisione degli emettitori UVC sulle spore di *Aspergillus fumigatus*. Questo microorganismo è un fungo patogeno opportunistico, responsabile di infezioni violente, pericolose per la vita di pazienti immunocompromessi. *Aspergillus fumigatus* è stato isolato in parecchi ambienti chiusi dove ed è comune in polvere che si infiltra dall'aria esterna, edifici umidi e materiali di finitura, isolamento climatizzatori, ventilatori, filtri, umidificatori acquei, etc. Conidia a diffusione aerea sono agenti infettivi e possono raggiungere le parti inferiori del sistema respiratorio. E' classificato come agente biologico nocivo nel rischio occupazionale gruppo 2 (**D.Lgs 626/94; European Directive 2000/54/CE**) essendo responsabile di alti indici di mortalità in popolazioni immunosopresse. L'esposizione alle spore di *Aspergillus* è difficile da evitare. La colonizzazione di sistemi di condizionamento, riscaldamento e ventilazione possono spargere le spore in un edificio con conseguente esposizione al rischio per gli occupanti. La polvere in ambienti chiusi contiene spore e muffe termo-tolleranti possono colonizzare materiali o componenti costruttivi umidi o danneggiati dall'acqua. In questo studio preliminare sono descritti i risultati concernenti l'efficacia germicida di un emettitore UVC testato su *Aspergillus fumigatus*.

Durante gli esperimenti, l'osservazione veniva effettuata che il valore dell'irradiazione alla linea di 253.7 nm aumentava durante il primo minuto e poi diminuiva asintomaticamente ad un valore fisso. L'ampiezza di questa variabilità era approssimativamente del 5 % (Fig. 3). Una possibile spiegazione di questo effetto è lo sviluppo di molecole di ozono nella camera che causano un'attenuazione dell'irradiazione a 253.7 nm (Fig.4). Inizialmente, la concentrazione di ozono diminuisce (e conseguentemente l'irradiazione a 253.7 nm aumentava) seguendo l'ingresso di aria fresca quando veniva aperta la porta scorrevole per posizionare i dischi Petri nella camera. Conseguentemente, la concentrazione di ozono aumentava e l'irradiazione diminuiva fino a raggiungere valori

The ozone concentration in the chamber reached a maximum value of 20 ppb (close to the emitter). The observed trend versus time is in good agreement with our hypothesis.

The CFUs grown on the exposed and unexposed plates (Fig. 5) were used to calculate the percentage of survival spores by use of eq.(2). In Figure 6 the spore survival percentage is reported as function of the UVC dose. The curve was best fitted to an exponential function as that given in equation (2). The parameter  $N_0$  was fixed to the mean value counted in the unexposed plates (controls) whilst the parameter  $h$  of eq.(2) was best fitted.

The best fitting results are:

$$h^{-1} = D_{\text{exp}} = 20.5 \frac{\text{mJ}}{\text{cm}^2}$$

$$D_{10} = 47 \frac{\text{mJ}}{\text{cm}^2}$$

Where  $D_{\text{exp}}$  is the dose value for which the number of spore is reduced by a factor  $1/e$  and  $D_{10}$  is the dose value for which only the 10% of the total of the microorganisms spores are not killed.

Data indicate a wide range of susceptibility to UV during the exposure periods; the percentage of survival *Aspergillus fumigatus* spores decreased to 10% in correspondence of a exposure dose of 47 mJ/cm<sup>2</sup> (corresponding at exposure time of 8 minutes in experimental setting).

A particular event concerning an anomalous growth of fungal colonies along the contour of the plates even in correspondence of long exposure times (15 and 25 min) was observed. This phenomenon was not observed in the unexposed plates (Figure 7). A light scattering mechanism that determines an attenuation of the irradiance in correspondence of the contour of the plate (about 0,5 cm) was hypothesized as possible explanation of this fact. In this preliminary study the "edge" effect was kept into account and the asymptotically surviving fraction of microorganisms was not included into the best fitting procedure.

costanti di irradiazione come conseguenza dell'equilibrio tra la quantità di ozono prodotta dall'emettitore UVC e quella consumata.

La concentrazione di ozono nella camera ha raggiunto un valore massimo di 20 ppb (vicino all'emettitore). La tendenza osservata contro il tempo è in buon accordo con la nostra ipotesi.

Le colonie per disco cresciute nei dischi esposti e non esposti (Fig. 5) venivano usati per calcolare la percentuale di spore superstiti attraverso l'uso dell'equazione (2). Nella figura 6 la percentuale di spore superstiti è riportata come funzione della dose di UVC. La curva si adattava al meglio ad una funzione esponenziale come quella data nell'equazione (2). Il parametro  $N_0$  veniva fissato al valore medio contato nei dischi non esposti (di controllo) mentre il parametro  $h$  dell'equazione (2) si adattava al meglio.

I migliori risultati sono:

$$h^{-1} = D_{\text{exp}} = 20.5 \frac{\text{mJ}}{\text{cm}^2}$$

$$D_{10} = 47 \frac{\text{mJ}}{\text{cm}^2}$$

Dove  $D_{\text{exp}}$  è il valore di dosaggio per il quale il numero di spore viene ridotto per un fattore  $1/e$  e  $D_{10}$  è il valore di dosaggio per il quale solo il 10 % del totale delle spore dei microorganismi non vengono eliminate.

I dati indicano una vasta gamma di suscettibilità agli UV durante i periodi di esposizione; la percentuale di spore superstiti di *Aspergillus fumigatus* diminuivano del 10 % in corrispondenza di un dosaggio di esposizione di 47 mJ/cm<sup>2</sup> (corrispondente al tempo di esposizione di 8 minuti nella messa a punto sperimentale).

E' stato osservati un evento particolare concernente una crescita anomala di colonie di funghi lungo il contorno dei dischi anche in corrispondenza di lunghe esposizioni (15 e 25 min). questo fenomeno non era stato osservato in dischi non esposti (Figura 7). Un leggero meccanismo dispersivo che determina un'attenuazione della irradiazione in corrispondenza dei contorni del disco (circa 0.5



## CONCLUSIONS

The results demonstrate the efficacy of the UVC emitter in inactivating the spores of *Aspergillus fumigatus* to a reproducible degree in the experimental setting. The ability to eliminate microbial contaminants within HVAC and heating and air-conditioning (HAC) systems would contribute toward reducing occupant exposure and the opportunity for the spread of bacteria based infectious diseases. The application of effective engineering controls within the building is essential to prevent biological pollution in the indoor environment (**Menetrez M.Y. et al., 2004**). Installation of UVC emitters in air conditioning (HVAC) systems provides another means of controlling of microorganisms that enter and circulate through the indoor environment as well documented in several studies demonstrating that the inactivation of microorganisms can be significantly enhanced (**Levetin et al. 2001**).

## FUTURE RESEARCH

The information generated in this research will be used to form other tests on microorganisms which have an important role in the biological contamination of indoor environments.

## REFERENCES

1. Andersen B. M., MD, PhD; H. Banrud, DrScient; E. Bøe, BcEcon, MEng; O. Bjordal, MEng; F. Drangsholt, PhD. Comparison of UV C Light and Chemicals for Disinfection of Surfaces in Hospital Isolation Units. *Infect Control Hospital Epidemiol.* 27: 729-734 (2005).
2. Couvert O., Leguerinel I., Mafart P. Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Int J Food Microbiol.* Aug 1; 49 (1-2):57-62 (1999).
3. Directive 2000/54/CE of the European Parliament and of the Council of 18 September

cm) veniva ipotizzato come possibile spiegazione di questo fatto. In questo studio preliminare l'effetto "bordo" è stato tenuto in conto e la sopravvivenza asintomatica di frazioni di microorganismi non è stata inclusa nella procedura di miglior rendimento.

## CONCLUSIONI

I risultati dimostrano l'efficacia degli emettitori UVC nell'inattivazione di spore di *Aspergillus fumigatus* ad un livello di riproduttività in una messa a punto sperimentale. La capacità di eliminare contaminanti microbici all'interno di sistemi di riscaldamento, ventilazione e condizionamento contribuirebbe alla riduzione dell'esposizione degli occupanti e l'opportunità della diffusione di malattie infettive batteriche. L'applicazione di effettivi controlli tecnici all'interno degli edifici è essenziale per prevenire inquinamento biologico in ambienti chiusi (**Menetrez K.K. et al., 2004**). L'installazione di emettitori UVC nei sistemi di condizionamento (HVAC) fornisce un altro mezzo per il controllo di microorganismi che entrano e circolano in ambienti chiusi come ben documentato in diversi studi che dimostrano che la inattivazione di microorganismi può essere significativamente aumentata (**Levetin et al. 2001**).

## BIBLIOGRAFIA

1. Andersen B. M., MD, PhD; H. Banrud, DrScient; E. Bøe, BcEcon, MEng; O. Bjordal, MEng; F. Drangsholt, PhD. Comparison of UV C Light and Chemicals for Disinfection of Surfaces in Hospital Isolation Units. *Infect Control Hospital Epidemiol.* 27: 729-734 (2005).
2. Couvert O., Leguerinel I., Mafart P. Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Int J Food Microbiol.* Aug 1; 49 (1-2):57-62 (1999).
3. Directive 2000/54/CE of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.

2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. Official Journal of the European Communities, 17.10.2000, L 262/21.

4. DLgs 626/94 : Attuazione delle direttive 89/391/CEE, 89/654/CEE, 89/655/CEE, 89/656/CEE, 90/629/CEE, 90/270/CEE, 90/394/CEE, 90/679/CEE, riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro. Gazzetta Ufficiale n. 265 del 12 Novembre 1994-Serie Generale.

5. Ko G., First MW, Burge HA. The characterization of upper-room ultraviolet germicidal irradiation in inactivating airborne microorganisms. *Environ Health Perspect.* Jan; 110 (1): 95- 101 (2002).

6. Kujundzic E, Hernandez M. and Miller S.L. Ultraviolet germicidal irradiation inactivation of airborne fungal spores and bacteria in upper-room air and HVAC in-duct configuration. *J. Environ. Eng. Sci.* 6: 1-9 (2007).

7. Levetin E., Shaughnessy R., Rogers CA., Scheir R. Effectiveness of Germicidal UV Radiation for Reducing Fungal Contamination within Air-Handling Units. *Appl Env Microbiol.* 67: 3712-3715 (2001).

8. Menetrez M.Y., K.K. Foarde. Research and Development of Prevention and Control Measures for Mold contamination. *Indoor and Built Environment.* 13:109-114 (2004).

9. Menetrez M.Y., K.K. Foarde, T.D. Webber, T.R. Dean, and D.A. Betancourt. Efficacy of UV irradiation on eight species of *Bacillus*. *J. Environ. Eng. Sci.* 5: 329–334 (2006).

10. Nagy R. Application and Measurement Of Ultraviolet Radiation. *Am Ind Hyg Assoc J.* 25; 274-281 (1964).

11. Niemer R.T., Sivasubramani S.K., Reponen T., Grinshpun S.A. Assessment of Fungal Contamination in Moldy Homes: Comparison of Different Methods. *J Occup Environ Hyg* 3: 262-273 (2006).

12. Wilson SC, Palmatier RN, Andriychuk LA, Martin JM, Jumper CA, Holder HW, Straus DC. Mold contamination and air handling units. *J Occup Environ Hyg.* Jul; 4(7):483-91 (2007).

Official Journal of the European Communities, 17.10.2000, L 262/21.

4. DLgs 626/94 : Attuazione delle direttive 89/391/CEE, 89/654/CEE, 89/655/CEE, 89/656/CEE, 90/629/CEE, 90/270/CEE, 90/394/CEE, 90/679/CEE, riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro. Gazzetta Ufficiale n. 265 del 12 Novembre 1994-Serie Generale.

5. Ko G., First MW, Burge HA. The characterization of upper-room ultraviolet germicidal irradiation in inactivating airborne microorganisms. *Environ Health Perspect.* Jan; 110 (1): 95- 101 (2002).

6. Kujundzic E, Hernandez M. and Miller S.L. Ultraviolet germicidal irradiation inactivation of airborne fungal spores and bacteria in upper-room air and HVAC in-duct configuration. *J. Environ. Eng. Sci.* 6: 1-9 (2007).

7. Levetin E., Shaughnessy R., Rogers CA., Scheir R. Effectiveness of Germicidal UV Radiation for Reducing Fungal Contamination within Air-Handling Units. *Appl Env Microbiol.* 67: 3712-3715 (2001).

8. Menetrez M.Y., K.K. Foarde. Research and Development of Prevention and Control Measures for Mold contamination. *Indoor and Built Environment.* 13:109-114 (2004).

9. Menetrez M.Y., K.K. Foarde, T.D. Webber, T.R. Dean, and D.A. Betancourt. Efficacy of UV irradiation on eight species of *Bacillus*. *J. Environ. Eng. Sci.* 5: 329–334 (2006).

10. Nagy R. Application and Measurement Of Ultraviolet Radiation. *Am Ind Hyg Assoc J.* 25; 274-281 (1964).

11. Niemer R.T., Sivasubramani S.K., Reponen T., Grinshpun S.A. Assessment of Fungal Contamination in Moldy Homes: Comparison of Different Methods. *J Occup Environ Hyg* 3: 262-273 (2006).

12. Wilson SC, Palmatier RN, Andriychuk LA, Martin JM, Jumper CA, Holder HW, Straus DC. Mold contamination and air handling units. *J Occup Environ Hyg.* Jul; 4(7):483-91 (2007).



Figure 1. UVC emitter placed inside the exposure chamber.

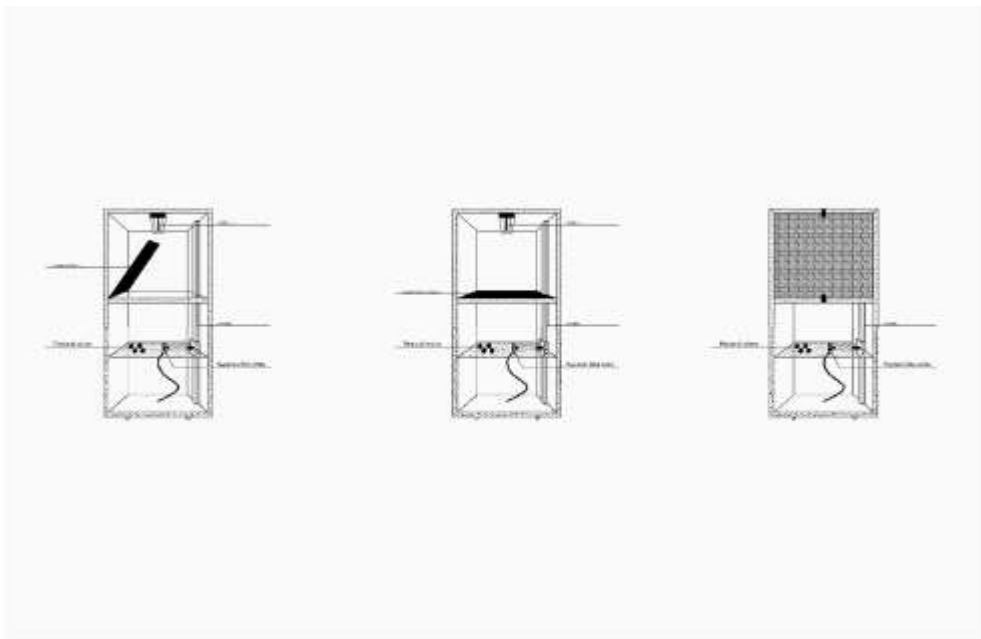


Figure 2. Exposure chamber scheme.

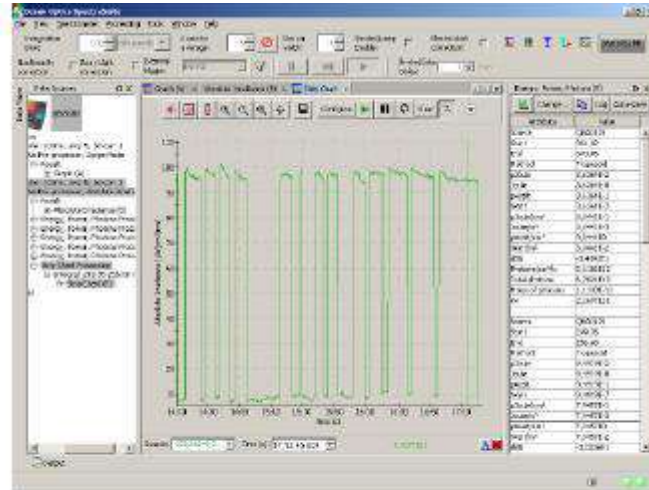


Figure 3. UVC spectral irradiance trend relative to the spectral band centred at 253,7 nm during the experimental exposure steps.

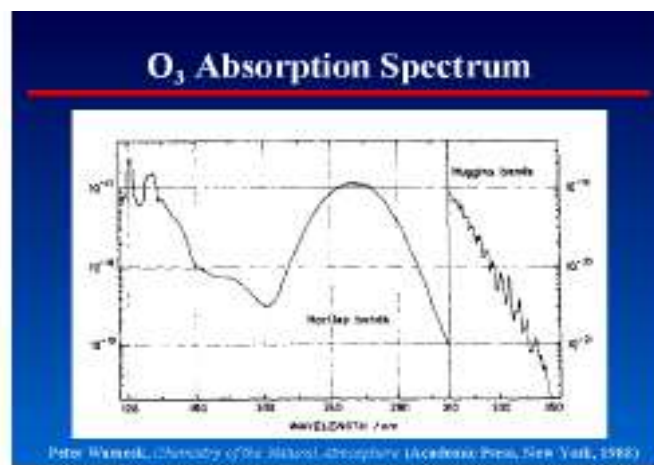


Figure 4. Ozone absorption spectrum.

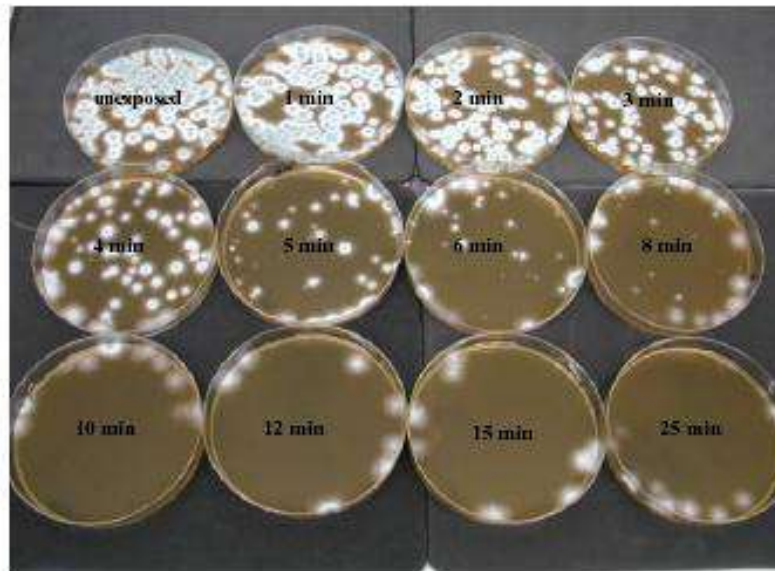


Figure 5. Colony Forming Units for plate (CFUs/plate) in unexposed plates (controls) and in plates at different exposure times.

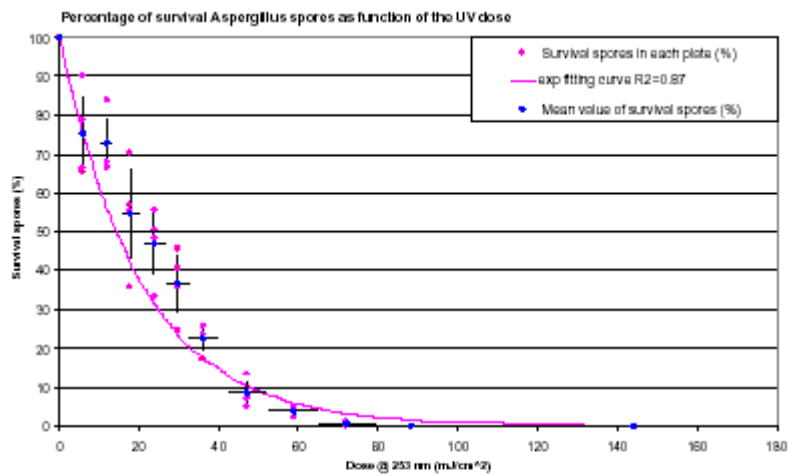


Figure 6: Percentage of survival spores as function of the UV dose. (Error bar corresponding to 10% for the dose and  $\pm \sigma$  for the mean values of survival spores.)



Figure 7. Anomalous growth of fungal colonies along the contour of the plates currently verifiable even in correspondence of long exposure times: a) unexposed plate; b) 4 min; c) 15 min; d) 25 min.