

741 - TRATAMENTO DE ÁGUA POR PLASMA NÃO-TÉRMICO PARA INATIVAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI*

Glívia Braga Faria⁽¹⁾

Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

Mestranda pelo Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental (PROAMB/UFOP).

Marina de Medeiros Machado

Professora adjunta do Departamento de Engenharia Ambiental

Endereço^o: Universidade Federal de Ouro Preto: Campus Morro do Cruzeiro, s/n - Bauxita - Ouro Preto - MG - CEP: 35400-000 Email: glivia.faria@aluno.ufop.edu.br

RESUMO

Para assegurar que a água esteja livre de microrganismos patogênicos, esta deve passar por um processo de desinfecção, e a cloração é o método convencional mais comumente utilizado na maioria dos países pois controla de forma eficaz os agentes microbianos. Contudo, os subprodutos derivados da desinfecção com cloro têm sido um problema e, novos métodos e mais avançados de desinfecção da água e remoção de bactérias têm sido sugeridos como substituição do tratamento convencional, dentre eles o plasma não-térmico. Assim, neste estudo, serão avaliados três parâmetros operacionais do reator: fluxo de gás, tensão aplicada e tempo. Espera-se estabelecer correlações entre cada um desses parâmetros e a inativação de *E. coli*, bem como com as propriedades físicas e químicas da água tratada. Além disso, a sobrevivência das colônias de *E. coli* e avaliação da resistência da parede celular da bactéria após o tratamento por plasma e identificação os parâmetros responsáveis pelo efetivo tratamento contribuirão para o avanço da pesquisa em desinfecção de água e para o desenvolvimento da tecnologia de plasma frio como um protocolo de tratamento final.

PALAVRAS-CHAVE: Plasma não-térmico, Desinfecção de água, *Escherichia coli*.

INTRODUÇÃO

A emergência da questão ambiental e preservação da água tem sido pauta em muitos debates sobre o meio ambiente, devido à sua escassez e ao fato de sua qualidade estar diminuindo constantemente com o desenvolvimento global. Esse impacto ambiental é resultante especialmente dos processos humanos e naturais que afetam diretamente as características biológicas, químicas e físicas da água.

Dados publicados pela World Wildlife Fund (WWF) mostram que, dos 70% de água disponível no planeta, menos de 1% é própria para consumo humano (WWF, 2022) e grande parte está sendo poluída, contaminada e degradada por práticas humanas inadequadas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2019) a evidência é que mais de 2 bilhões de pessoas no mundo consumam água de fontes contaminadas por fezes e 2,4 bilhões de pessoas estejam sem saneamento básico. No Brasil a realidade é um total de 2.734 óbitos por doenças de veiculação hídrica, sendo 124 dessas mortes de crianças de 0 a 4 anos de idade, constituindo as bactérias presentes na água e em alimentos uma das principais causas de mortalidade e morbidade, além de serem as principais responsáveis pelas doenças endêmicas como diarreias infantis e enterites que podem ser letais [2].

Para assegurar o direito da população de consumir água potável, a Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021 estabelece os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seus padrões de potabilidade. Para alcançar esses padrões de potabilidade existem tratamentos que podem ser realizados, sendo um deles o tratamento convencional, e aplicados em estações de tratamento de água (ETAs), organizadas pelas operações unitárias de coagulação, floculação, decantação, filtração e desinfecção. Nesta última, ocorre a eliminação de microrganismos patogênicos presentes na água em tratamento, através da adição de um agente desinfetante, normalmente cloro e derivados.

A desinfecção da água é um processo seletivo, e não elimina todas as formas de microrganismos patogênicos presentes, assim, é necessária a inserção de um sistema de controle que possa referenciar a eficiência do processo. Tal controle nas rotinas de estações de tratamento de água é feito por meio de testes de ausência/presença de bactérias do grupo coliforme, ou especificamente da espécie *Escherichia coli* (*E. coli*),

indicadora de contaminação fecal, e, mais frequentemente, através do monitoramento do cloro residual [4]. Entretanto, os subprodutos derivados da desinfecção com cloro têm sido um problema e novos métodos e mais avançados de desinfecção da água têm sido sugeridos como substituição/complementação do tratamento convencional, dentre eles o plasma não-térmico (PNT).

O PNT apresenta um processo de descontaminação da água envolvendo a produção de diferentes tipos de espécies reativas com alto potencial de oxidação e esterilização. Possui a vantagem de operar a uma temperatura mais baixa e requer menos tempo de tratamento, se comparado com os processos de esterilização térmica [5], além de induzir a formação de uma ampla gama de agentes ativos (partículas carregadas, radicais livres, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, luz ultravioleta, etc.) que efetivamente inativam diferentes microrganismos [6;7].

A maioria dos estudos que tratam do uso do PNT no tratamento de água sugerem que as tecnologias de plasma se tornarão uma nova alternativa para controle de microrganismos de veiculação hídrica [7;8]. Esses estudos fornecem informações extensas sobre os mecanismos e efetividade, no entanto, ainda não fica claro qual o mecanismo de atuação do plasma no processo de inativação do microrganismo. As inúmeras tentativas de tratamento por PNT confirmam a inativação de células bacterianas pelo plasma, mas as formas como elas se processam ainda não foram tão bem exploradas. Sendo assim, o objetivo deste estudo é inativar a *E. coli* através do tratamento de água por PNT, identificando os parâmetros operacionais responsáveis pelo efetivo tratamento da água, bem como avaliar a resistência da parede celular após o tratamento com a intenção de esclarecer o processo de inativação.

OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa é avaliar os mecanismos de inativação de *E. coli* através do tratamento por plasma não-térmico através dos objetivos específicos de: investigação da sobrevivência das colônias de *E. coli* submetidas ao tratamento de plasma frio; avaliação dos parâmetros operacionais envolvidos na sobrevivência das colônias; avaliação da resistência da parede celular após o tratamento por plasma e; identificação dos parâmetros responsáveis pelo efetivo tratamento biológico de água por plasma.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo de Microrganismos. O estudo foi realizado com *E. coli* cepa ATCC 25922, cultivada em placas com ágar EMB (Eosina Azul de Metileno) a 37°C por 24h. A cultura é lavada com solução salina e, a suspensão resultante, é usada para inocular o caldo BHI com tempo de incubação de 24h a 37°C. Antes do tratamento com PNT, a suspensão de células é diluída com solução salina para um título final de 107–108 CFU/ mL.

Características do Sistema de PNT. O reator PNT constitui-se de uma fonte corrente alternada de alta tensão (± 17 kV) e corrente de entrada de 30mA, uma fonte de alta tensão ligada a um transformador Variac, dois eletrodos com espaçamento entre eles de aproximadamente 0,8 cm e gás argônio e oxigênio utilizado como gás de arraste para as descargas de plasma.

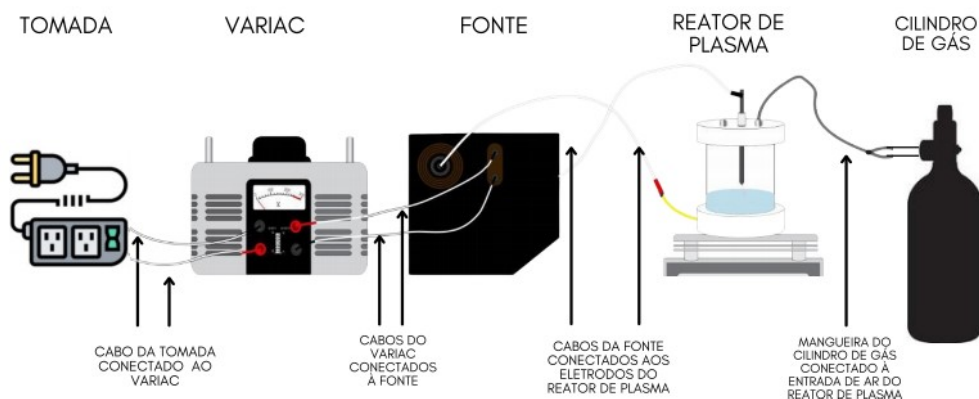


Figura 1: Descrição do Sistema de Plasma não-térmico. Elaborada pela autora (2021).

Tratamento por PNT. O volume de 60ml de água destilada esterilizada com suspensão de células de *E. coli* é adicionada ao reator de PNT para a realização do tratamento. Durante o processo, os parâmetros do reator-distância intereletródica, vazão de gás, voltagem, e tempo de descarga são otimizados e, um delineamento experimental é especificado, onde os fatores que exercem influência no tratamento de água usando a tecnologia de PNT são: a vazão do gás (argônio/oxigênio), a tensão e o tempo de permanência da amostra. Os resultados são analisados através do programa Statistics 7.0, a fim de determinar a significância dos efeitos dos fatores, sendo possível investigar a eficiência de inativação mediada pelas variáveis do sistema e do processo. Ao final do processamento, as alíquotas são coletadas da câmara de trabalho na intenção de investigar o efeito do tratamento de plasma na inativação de *E. coli*. A contagem de células viáveis de CFU/mL é efetuada e uma análise físico-química é feita através dos parâmetros de pH, temperatura, turbidez, cor verdadeira, condutividade, OD, DBO e DQO.

Contagem de *E. coli*. Para a quantificação dos efeitos do tratamento com plasma, 0,1ml da amostra foram semeadas na superfície do ágar EMB. As placas foram incubadas a 37° C por 24 h, e as unidades formadoras de colônias foram contadas. Quaisquer placas sem crescimentos foram incubadas por até 72 horas e verificadas quanto à presença de colônias a cada 24 horas. Os resultados são relatados em unidades log CFU ml⁻¹.

Avaliação da resistência da parede celular. A avaliação da resistência da parede celular após o tratamento de PNT é feita através da coleta de alíquotas da câmara de trabalho e suspendidas em meio com pressão osmótica isotônica, hipotônica 1/10 e hipotônica 1/100. Após, as amostras são ensaiadas quanto à quantidade de nucleotídeos livres nos sobrenadantes (A260/A280) e a condutividade, como base no estudo de KOBZEV, *et al.*, (2013), para registrar o vazamento de componentes intracelulares após a avaliação da resistência da parede celular. A quantificação dos efeitos do dano do tratamento com PNT na parede celular da *E. coli* é confirmada através da contagem de células viáveis (CFU.ml⁻¹) das alíquotas da câmara de trabalho submetidas em meio com diferentes pressões osmóticas. Os resultados são relatados em unidades log CFU.ml⁻¹.

Os dados experimentais, incluindo taxas de sobrevivência - sob gás (argônio/oxigênio), níveis de potência de geração de plasma, tempos de exposição- e a resistência da parede celular são analisados estatisticamente usando análise de variância (ANOVA), um teste t independente e análise de regressão linear. Onde, valores de p abaixo de 0,05 indicam diferença estatisticamente significativa.

RESULTADOS

Em experimentos preliminares, realizados entre abril e junho de 2022, com metodologia diferente da aqui apresentada (fluxo de argônio fixado em 1 l/min e sem a aferição de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica), foram obtidos resultados que corroboram com as expectativas do presente estudo; a inativação de *E. coli* se mostrou diretamente proporcional à tensão aplicada e ao tempo de exposição ao plasma: 25% de inativação com 20% do total da fonte (17 kV), aproximadamente 3,4 kV, em 5 min e 100% de inativação com 17 kV em 15 min; da mesma forma, o pH também variou proporcionalmente à tensão aplicada e ao tempo de exposição: variação de -2,6 com 3,4 kV em 5 min e variação de -5,6 com 17 kV em 15 min. A metodologia dos testes preliminares foi descontinuada por conta de problemas procedimentais relacionados ao manejo e ao cultivo de *E. coli*. A compreensão dos parâmetros operacionais do sistema de PNT e o esclarecimento do processo de inativação de *E. coli* através da avaliação da resistência da parede celular após o tratamento, possibilitará o aumento da eficácia desta tecnologia para o controle bacteriano e a adoção desse novo método no tratamento de água como tratamento final.

Durante a descarga do PNT, os fatores reativos gerados podem incluir espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS), radiação ultravioleta (UV), íons energéticos e partículas carregadas. O efeito microbicida dessas espécies reativas foi estudado por Laroussi & Leipold (2004), e provou-se que as ROS desempenham o papel mais crucial na inativação de microrganismos [10]. As ROS, incluindo ozônio, oxigênio singlete, átomo de oxigênio e radicais hidroxila, têm fortes efeitos oxidativos nos componentes celulares e podem resultar em peroxidação lipídica, danos ao DNA e às proteínas, que levam à morte celular [10].

A eficácia de inativação do PNT é governada por variáveis de sistema e processo, incluindo duração e modo de exposição devido a dano celular associado e recuperação [11]. O tempo prolongado de tratamento foi

associado a uma maior eficácia de inativação, induzindo maior estresse oxidativo, sobrecarregando os sistemas de reparo [10;12].

Os mecanismos de inativação contra bactérias Gram-negativas (GNB) incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus*, e bactérias Gram-positivas (GPB) envolvendo *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* de OLATUNDE *et al.* (2019) mostraram que as contagens de sobrevivência foram reduzidas com o aumento do tempo de tratamento. Houve uma poração irreversível na parede celular de GNB. Enquanto isso, as GPB foram parcialmente encolhidas após tempo de tratamento de 5 min. Os pesquisadores sugerem um dano irreversível da parede celular, oxidação e liberação de compostos intracelulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA, como o modo de ação proposto do PNT contra as GNB, enquanto a oxidação e a liberação de componentes intracelulares desempenharam um papel importante em GPB.

Semelhante a outras tecnologias de esterilização, o efeito bactericida do PNT desempenha um papel significativo nas propriedades microbianas, no entanto, não há consenso geral sobre a propriedade de resistência ao plasma de bactérias GPB e bactérias GNB. Na maioria dos relatos, as bactérias GNB mostraram mais sensibilidade ao plasma do que as bactérias GPB [13;14;15;16;17]

Han *et al.*, (2016) e Lu *et al.*, (2013) mostraram que o modo de inativação bacteriana pelo plasma gerado com o ar atmosférico variava com o tipo de bactéria. Larousse, Mendis & Rosenberg (2003) supõem que essa diferença de sensibilidade ao PNT se deve ao fato de que GNB possuem membranas externas de lipopolissacarídeo e fina camada de peptidoglicano (em torno de 2 nm), enquanto as células GPB possuem camadas de peptidoglicano estáveis e mais espessas (em torno de 40nm).

Desta forma, a eficácia do efeito antibacteriano do PNT pode ser devido à reação dos radicais livres com a membrana externa das bactérias ou mesmo à penetração nas células bacterianas [19]. O PNT tem o potencial de remover *E. coli* na água, no entanto, mais trabalhos devem ser conduzidos para esclarecer o processo de inativação.

Para tanto, até a data da publicação deste trabalho não foi possível trazer os resultados tabelados pois estamos na reta final de análise estatístico e fechamento da dissertação do mestrado. Até o dia do evento, os resultados completos serão apresentados e discutidos com maior riqueza de detalhes. Contudo, espera-se investigar a eficácia do tratamento do PNT na sobrevivência e/ou inativação da *E. coli*, dispondo dos parâmetros pré definidos dos níveis de tensão e tempo de trabalho, em conjunto com a composição e vazão do gás de trabalho (argônio e oxigênio). A resistência da parede celular após o tratamento por PNT, avaliada através da quantificação dos efeitos em meio às pressões osmóticas diferentes, tem a intenção de reforçar a hipótese de que o tratamento de células de *E. coli* com PNT reduz a resistência da parede celular, e que os processos de regeneração da membrana celular são comprometidos.

Através dos dados experimentais anteriores, incluindo taxas de sobrevivência e a resistência da parede celular, pretende-se identificar os parâmetros responsáveis e envolvidos no mecanismo de ação da inativação de *E. coli* e tratamento biológico de água por plasma para que se possa estabelecer um protocolo de tratamento final.

CONCLUSÕES

Assim, neste estudo, será possível reforçar que o tratamento de células de *E. coli* com PNT é governada por variáveis de sistema e processos, incluindo a entrada de energia, modo de exposição, duração da exposição, composição do gás, bem como características do alvo como tipo de célula. Através de uma avaliação PNT na inativação da *E. coli* e, para além, das pesquisas sobre o uso de meios com diferentes níveis de força iônica, será possível investigar se o tratamento de microrganismos com PNT também reduzirá significativamente a resistência de suas paredes celulares. Uma compreensão clara desse fenômeno possibilitará aumentar a eficiência da esterilização do PNT e, assim, acelerar a adoção generalizada desse novo método.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2017. Special focus on inequalities*. New York: United Nations Children's Fund (UNICEF) and World Health Organization, 2019.
2. BRASIL, M. D. S. *Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS*. [S.l.]. 2019.
3. Brasil. (2021). Portaria nº. 888, de 4 de maio de 2021. *Dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade*. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>.
4. MACIEL, M. A. M.; REIS, M.; RAMALHO, M. M. *Águas potáveis [livro eletrônico]: padrões de qualidade, metodologias experimentais e técnicas de purificação princípios básicos de parasitologia, microbiologia, patologia e imunologia*. Campina Grande: Editora Amplla, 2022. 280 p. Disponível em: <http://ampllaeditora.com.br/books/2022/10/AguaPotaveis.pdf#page=96>.
5. MURUGESAN, P. et al. *Water decontamination using non-thermal plasma: Concepts, applications, and prospects*. v. 8, p. 104377, 2020.
6. LAROUSSE, M.; LEIPOLD, F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 233, p. 81-86, April 2004.
7. BOURKE, P. et al. *Microbiological interactions with cold plasma*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 123, p. 308-324, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.13429>.
8. ZEGHIOUD, et al. *Review on discharge plasma for water treatment: mechanism, reactor geometries, active species and combined processes*. *Journal of Water Process Engineering*, p. 2214-714, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101664>.
9. KOBZEV, E. N. et al. *Effect of Cold Plasma on the E. coli Cell Wall and Plasma Membrane*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 144-149., 2013.
10. JOSHI, S. G., COOPER, M., YOST, A., PAFF, M., ERCAN, U. K., FRIDMAN, G., BROOKS, A. D. (2011). *Nonthermal Dielectric-Barrier Discharge Plasma-Induced Inactivation Involves Oxidative DNA Damage and Membrane Lipid Peroxidation in Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 1053-1062.
11. HAN, L., Patil, S., BOEHM, D., MILOSAVLJEVIĆ, V., CULLEN, P.J. and BOURKE, P. (2016) *Mechanism of inactivation by high voltage atmospheric cold plasma differs between Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 82, 450-458.
12. BOXHAMMER, V., LI, Y. F., KÖRITZER, J., SHIMIZU, T., MAISCH, T., THOMAS, H. M., ZIMMERMANN, J. L. (2013). *Investigation of the mutagenic potential of cold atmospheric plasma at bactericidal dosages*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, V.753, pp. 23-28.
13. OLATUNDE, O. O. et al. *High voltage cold atmospheric plasma: Antibacterial properties and its effect on quality of Asian sea bass slices*. [S.l.]: *Innovative Food Science and Emerging Technol.*, 52, 305-312, 2019.
14. LAROUSSE, M.; MENDIS, D. A.; ROSENBERG, M. *Plasma interaction with microbes*. *New Journal of Physics*, v. 5, p. 41, 2003.
15. ERMOLAEVA, S. A. et al. *Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds*. *J Med Microbiol.*, p. 75-83, 2011.
16. LIANG, Y. et al. *Rapid Inactivation of Biological Species in the Air using Atmospheric Pressure Nonthermal Plasma*. *Environ. Sci. Technol.*, v. 46, p. 3360-3368, 2012.
17. LUNOV, O. et al. *The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma*. *Biomaterials*, v. 82, p. 71-83, 2016.
18. LU, H. et al. *Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric coldplasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA*. *Journal of Applied Microbiology* I, v. 116, p. 784--794, 2013.
19. EL-KALLINY, A. S. et al. *Efficacy of Cold Atmospheric Plasma Treatment on Chemical and Microbial Pollutants in Water*. *Chemistry Select*, v. vol.6, p. 3409-3416, 2021.