

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA ENERGETICA

TESI DI LAUREA

in

Laboratorio di Tecnologie dei materiali ed Applicazioni Industriali dei Plasmi T

*Trattamento plasma assistito di acqua con una sorgente Dielectric Barrier Discharge
(DBD): analisi delle specie reattive prodotte e potere battericida*

CANDIDATO

RELATORE:

Rampa Federico

Chiar.mo Prof. Vittorio Colombo

CORRELATORI

Dott. Romolo Laurita
Ing. Emanuele Simoncelli
Dott. Anna Miserocchi
Dott. Matteo Gherardi

Anno Accademico 2015/2016

Sessione II

Indice

<u>1. Introduzione</u>	<u>1</u>
<u>2. Trattamenti plasma assistiti di liquido</u>	<u>4</u>
<u>2.1 Sorgente DBD diretta</u>	<u>5</u>
<u>2.2 Sorgente DBD indiretta</u>	<u>9</u>
<u>2.3 Specie reattive indotte da trattamento plasma di liquidi</u>	<u>12</u>
<u>3. Caratterizzazione elettrica della sorgente DBD indiretta</u>	<u>16</u>
<u>4. Caratterizzazione chimica</u>	<u>20</u>
<u>4.1 Misura dei TRO (Total Residual Oxidant)</u>	<u>20</u>
<u>4.2 Misura di NO₂⁻, NO₃⁻, H₂O₂</u>	<u>25</u>
<u>4.3 Risultati di caratterizzazione chimica</u>	<u>25</u>
<u>5. Test di inattivazione batterica</u>	<u>27</u>
<u>5.1 Protocollo di verifica del potere battericida del trattamento plasma</u>	<u>27</u>
<u>5.2 Risultati di inattivazione batterica</u>	<u>30</u>
<u>Conclusioni</u>	<u>32</u>
<u>Bibliografia</u>	<u>33</u>

1. Introduzione

La proliferazione di batteri in liquido è una problematica che riguarda anche le acque di fiumi e mari, in particolare le correnti contaminate possono venire a contatto con persone provocando malattie che nei casi più gravi possono portare alla morte del soggetto contaminato.

Un esempio è quello della *Legionella pneumophila*, il principale patogeno che provoca legionellosi, che trova condizioni ideali per proliferare in acque con temperature tra i 40 e i 50 °C [1]. Tali condizioni si possono trovare facilmente in acque utilizzate in processi industriali con il rischio di contaminare l'ambiente circostante nel momento in cui si introduce l'acqua nei fiumi.

L'utilizzo di trattamenti plasma assistiti di acqua per la sua decontaminazione può essere una soluzione a questa problematica, in quanto oltre a decontaminare permettono di inattivare le colonie batteriche ottenendo così un effetto battericida. Al contrario, molti disinfettanti chimici già utilizzati in passato hanno un effetto batteriostatico, ovvero ottengono solamente un'inattivazione temporanea del batterio che successivamente in condizioni più favorevoli può riacquistare vitalità e proliferare nuovamente.

Il plasma è un gas parzialmente ionizzato in condizioni di neutralità, formato da elettroni e particelle cariche (ioni) o eccitate.

La temperatura macroscopica di un plasma si risulta come la media delle temperature delle diverse particelle che lo compongono pesata sulle loro masse, perciò il contributo degli ioni e delle particelle neutre risulterà maggiore rispetto a quello degli elettroni che hanno massa molto minore. Quando un gas viene sottoposto a un campo elettrico, gli elettroni accelerano velocemente raggiungendo alti livelli energetici mentre le altre particelle, più pesanti, accelerano più lentamente. Negli istanti successivi gli elettroni cedono parte della propria energia cinetica alle particelle più pesanti urtandole ripetutamente fino ad arrivare a uno stato di equilibrio termico. Si ha dunque un plasma termico ad alta temperatura o di equilibrio.

I plasmi in genere si suddividono in due categorie proprio in funzione della loro temperatura:

- Plasmi di equilibrio, in cui tutte le particelle che lo compongono si trovano alla stessa temperatura ($T_e \approx T_i \approx T_{exc} \approx T_n$) che va dai 10.000 ai 30.000 K. (T_e = Temperatura degli elettroni, T_i = Temperatura degli ioni, T_{exc} = Temperatura delle particelle eccitate, T_n = Temperatura delle particelle neutre);
- Plasmi di non equilibrio, in cui la temperatura degli elettroni è molto maggiore di quella delle altre particelle ($T_e \gg T_n$). Questo squilibrio fa sì che la temperatura globale sia al di sotto di 40°C, ed è quindi biocompatibile [2].

Le sorgenti plasma di non equilibrio a pressione atmosferica sono in grado di estinguere il plasma prima che questo raggiunga l'equilibrio termico, mantenendo quindi la temperatura macroscopica del plasma a valori di circa 40 °C.

Negli ultimi venti anni tecnologie basate sull'utilizzo di plasmi di non equilibrio a pressione atmosferica sono state studiate a fondo ottenendo risultati promettenti in svariati campi, in particolare l'attività di tesi è stata focalizzata sullo studio di un trattamento plasma assistito per la decontaminazione batterica di acqua sintetica riprodotta in laboratorio.

A livello chimico, il plasma generato in aria produce specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto dette *RONs* (*Reactive Oxygen and Nitrogen Species*), che possono interagire con un substrato solido o liquido. L'effetto battericida deriva dalle reazioni che avvengono all'interno del liquido. I metodi classici di decontaminazione prevedono nella maggior parte dei casi l'utilizzo di composti chimici mentre i trattamenti con plasmi di non equilibrio a pressione atmosferica studiati utilizzano solo aria, ed è per questo motivo che possono considerarsi una valida alternativa nel campo della decontaminazione batterica.

In un trattamento plasma assistito, il target da trattare non viene a contatto solamente con i *RONs* ma anche con radiazioni UV emesse durante la fase di eccitazione delle molecole che compongono l'aria o più in generale il gas utilizzato. Tutti questi fattori contribuiscono alla decontaminazione batterica del campione.

L'utilizzo di processi plasma assistiti inoltre permette la produzione di acqua attivata dal trattamento plasma (*PAW, Plasma Activated Water*) che può essere utilizzata per decontaminare e inattivare batteri Gram positivi, Gram negativi e funghi [3], viste le proprietà antibatteriche conferite al mezzo trattato. La differenza tra Gram positivi e negativi sta nella composizione e nello spessore della parte cellulare, difatti nel caso di batteri Gram positivi si ha una parete spessa circa 10 volte quella di un batterio Gram negativo (per batteri Gram positivi si hanno spessori 200-800 Å, per batteri Gram negativi 20-30 Å, con Å = 0,1 nm). La parete cellulare dei Gram positivi è composta da una membrana cellulare interna costituita da un doppio strato fosfolipidico e da uno strato di peptidoglicano esterno, un polimero presente anche nella parete cellulare dei Gram negativi con la differenza che in questo caso si trova in una zona intermedia tra una membrana cellulare interna e una esterna. Si può distinguere tra sorgenti plasma dirette e indirette: nel primo caso il substrato da trattare viene colpito direttamente dal plasma e quindi dagli ioni, da radiazioni UV, dalle specie reattive a breve e lunga vita. Nelle sorgenti plasma indirette invece il campione non è colpito direttamente dal plasma ma da un flusso di specie reattive *a lunga vita* e da radiazioni UV. In questo secondo caso dunque non è il plasma che va a interagire con il target ma è il cosiddetto *afterglow* del plasma (composto dalle specie reattive a lunga vita) e le radiazioni UV.

In questo progetto di tesi sperimentale si indagherà un trattamento plasma assistito diretto di acqua sintetica riprodotta in laboratorio con l'obiettivo di ottenere un effetto battericida sul liquido contaminato con un breve tempo di trattamento e soprattutto con l'obiettivo di trovare delle condizioni operative tali per cui la qualità dell'acqua non venga chimicamente alterata dal processo di inattivazione. L'acqua trattata dunque verrà analizzata chimicamente per verificare che certi parametri stiano entro certi limiti, in particolare si andranno a misurare i TRO (*Total Residual Oxidant*, composti dell'ossigeno derivanti dalla parziale ozonizzazione dell'acqua) che dovranno essere presenti in quantità minori di 0,1 mg/l.

La sorgente utilizzata per le prove preliminari, di caratterizzazione elettrica e di decontaminazione è una sorgente DBD (*Dielectric Barrier Discharge*) indiretta di cui si descriverà il funzionamento nei prossimi capitoli.

2. Trattamenti plasma assistiti di liquido

Negli anni si sono sviluppate tipologie di sorgenti per trattamenti plasma assistiti di liquidi anche molto differenti l'una dall'altra. Un fattore che ha contribuito a questo sviluppo è stato la versatilità delle geometrie delle sorgenti. Grazie allo sviluppo di appositi generatori elettrici è stato possibile realizzare una miriade di configurazioni operative, ognuna specificamente sviluppata e studiata in luogo della sua applicazione finale.

Un fattore importante che permette di differenziare le sorgenti l'una dall'altra è il meccanismo con cui viene acceso il plasma (in particolare si descriverà la tipologia DBD, *Dielectric Barrier Discharge*) ma esistono molti altri modi per generare un plasma. Inoltre una stessa sorgente può funzionare anche con diversi gas: l'utilizzo dell'aria da un punto di vista economico è la soluzione migliore, ma per alcune applicazioni in cui occorre che il plasma abbia caratteristiche particolari si usano gas come argon, elio, C₄F₈.

2.1 Sorgente DBD diretto

In una sorgente di tipo diretto, come già spiegato, la scarica di plasma colpisce direttamente il campione che si vuole trattare che sarà dunque investito dalle specie reattive a lunga e a breve vita oltre che dalle radiazioni UV. Lo schema di una sorgente DBD semplice è rappresentato in figura 2.1.

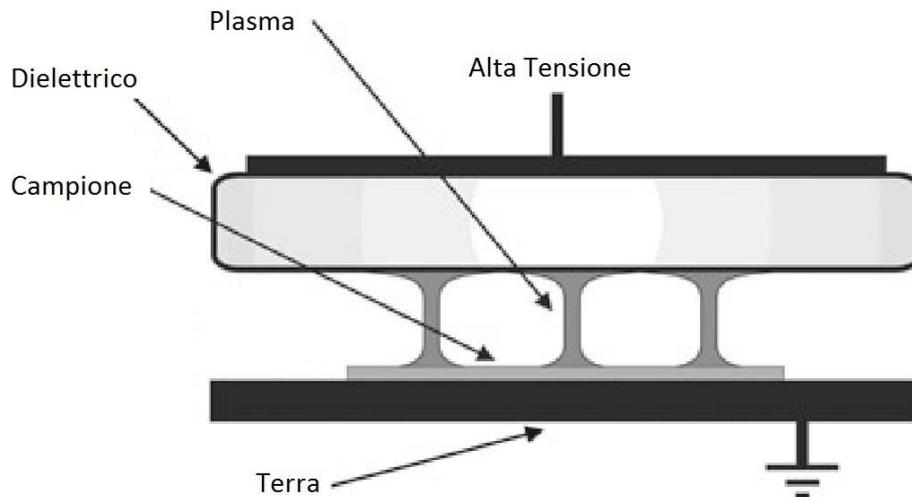


Figura 2.1: Schema di una sorgente DBD (Dielectric Barrier Discharge) classica, con l'elettrodo superiore collegato all'alta tensione e quello inferiore collegato alla terra.

La struttura è composta da due elettrodi, uno collegato in alta tensione, l'altro messo a terra, tra i quali è interposto almeno uno strato di materiale dielettrico, infatti sono state realizzate anche sorgenti DBD con più di uno strato di materiale dielettrico [4], come si tratterà più avanti nel capitolo.

In questo tipo di sorgenti il materiale dielettrico svolge un ruolo fondamentale in quanto non permette al plasma di raggiungere lo stato di equilibrio termico mantenendolo a temperatura dell'ordine di 40 °C. In particolare il dielettrico si comporta come una sorta di condensatore e, posto fra i due elettrodi di alta tensione e di terra, impone una caduta di potenziale. Nel breve intervallo di tempo in cui la tensione passa da valori prossimi allo

zero al valore massimo impostato al generatore (picco d'onda) cariche elettriche di segno opposto si accumulano sui due lati dello strato di dielettrico e nel momento in cui la tensione raggiunge un certo valore critico l'aria a contatto con l'elettrodo di terra si ionizza e la corrente inizia a fluire attraverso il plasma.

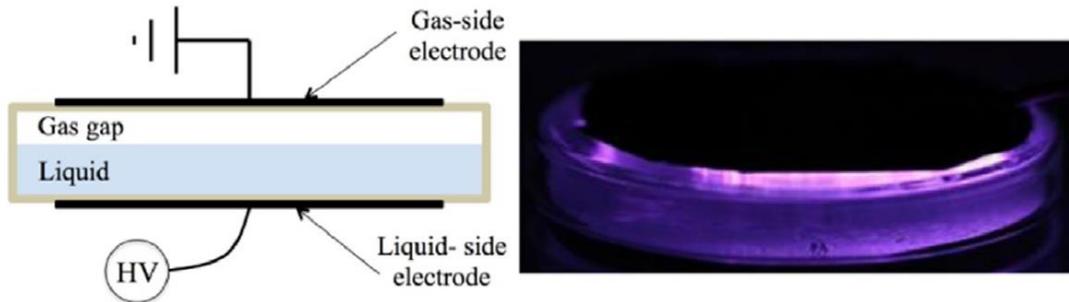


Figura 2.2: A destra lo schema di una sorgente DBD con l'elettrodo superiore collegato a terra e quello inferiore collegato all'alta tensione. A sinistra una foto della sorgente DBD in azione durante un trattamento: si possono notare gli streamer (scarica di plasma dall'aspetto filamentoso) di plasma dal colore viola [3].

Questa condizione persiste fino a che la tensione continua ad aumentare, infatti quando il suo valore inizia a diminuire dopo aver raggiunto il picco, si ha una situazione identica alla precedente ma con polarità inversa, ovvero la carica accumulata sul dielettrico scorrerà nel verso opposto scaricando il dielettrico. Quando poi la tensione raggiunge il punto critico negativo viene innescato nuovamente il plasma e la corrente ricomincia a fluire attraverso di esso caricando il dielettrico. Dunque il processo consiste nella continua carica e scarica del dielettrico e questo è reso possibile invertendo il campo elettrico: si presuppone dunque l'utilizzo di un generatore alternato [2].

La differenza di potenziale critica tra i due elettrodi è definita come il minimo valore della tensione che è necessario per la ionizzazione del gas, è detto *voltage breakdown*.

Come già detto, ci possono essere più strati di dielettrico tra i due elettrodi di una sorgente DBD, in particolare Heise et al. hanno sviluppato una sorgente chiamata CDBD (*Cascaded Dielectric Barrier Discharge*) mostrata in figura 2.3 [5].

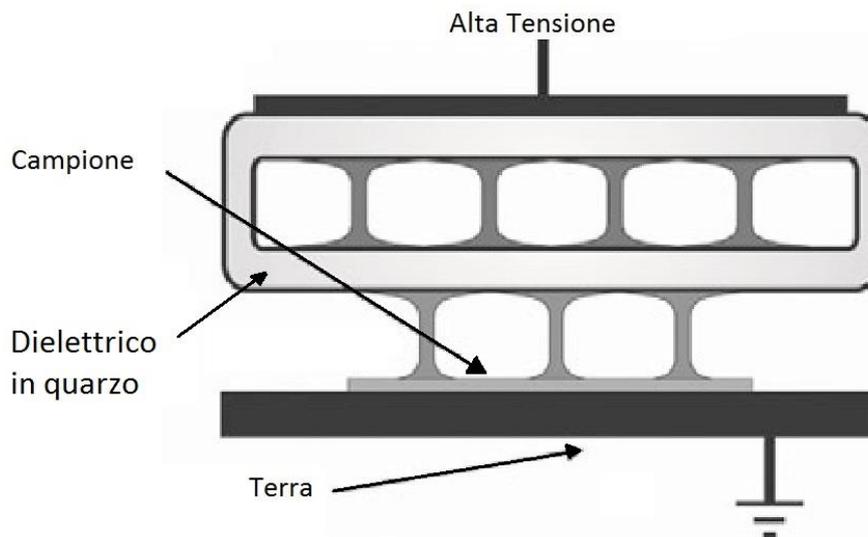


Figura 2.3: Schema di una sorgente CDBD (*Cascaded Dielectric Barrier Discharge*), con uno strato ulteriore di dielettrico in quarzo interposto fra i due elettrodi.

La peculiarità di questa sorgente è di avere un ulteriore dielettrico in quarzo tra gli elettrodi che permette di combinare l'efficacia della diretta esposizione al plasma con quella dei raggi UV, poiché lo strato in quarzo scherma il plasma che non raggiunge il substrato da trattare mentre lascia passare indisturbati i raggi UV. Il plasma a cui viene esposto direttamente il campione è quello che si forma tra il disco in quarzo e l'elettrodo inferiore collegato a terra.

Come descritto in precedenza anche in una normale sorgente DBD diretta il campione è soggetto all'azione del plasma e delle radiazioni UV, ma nel caso della sorgente CDBD è possibile utilizzare due gas diversi per il gap superiore e inferiore. Gas differenti emettono radiazioni UV a lunghezze d'onda differenti, perciò conoscendo questo dato si

può scegliere quale gas utilizzare per il gap superiore a seconda dell'applicazione che se ne vuole fare.

I dati sperimentali confermano che il potere battericida della sorgente CDBD è maggiore rispetto a quella di una normale DBD.

2.2 Sorgente DBD indiretto

Il dispositivo utilizzato per i test biologici e per la caratterizzazione elettrica è una sorgente di tipologia DBD indiretto. Il campione utilizzata per tutti i trattamenti è acqua sintetica riprodotta in laboratorio e contaminata con *E. coli*, batterio gram-negativo molto spesso utilizzato come modello in biologia per test antimicrobici.

La sorgente DBD utilizzata non è di tipo diretto come quelle già descritte ma di tipo indiretto, perciò ciò che interagisce con il substrato è l'*afterglow* del plasma come già descritto precedentemente. Lo schema rappresentato in figura 4 mostra come, in questo caso, gli elettrodi siano separati dal solo strato di materiale dielettrico. Al di sotto di questa zona è presente un gap tra pelo libero dell'acqua da trattare e la parte metallica dell'elettrodo.

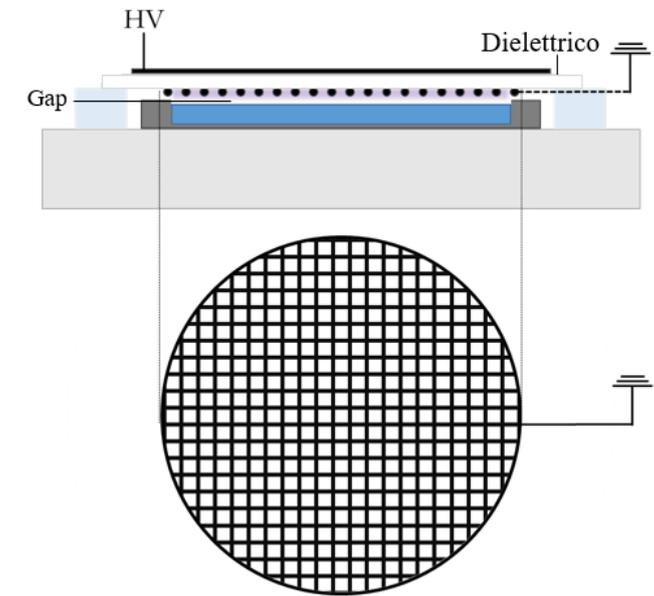


Figura 2.4: Schema della sorgente DBD utilizzata per le prove sperimentali di decontaminazione e di caratterizzazione elettrica.

Il supporto a cui sono collegati la l'elettrodo inferiore e il dielettrico è in materiale isolante e forato al centro in modo da poter contenere la base con l'acqua da trattare al di sotto di essa. È previsto un alloggiamento per il liquido da trattare

Il plasma si forma tra le maglie della componente metallica dell'elettrodo, ciò che invece raggiungerà la soluzione contaminata è l'*afterglow* del plasma, ovvero tutte le specie reattive a lunga vita prodotte dalla ionizzazione dell'aria e dalle radiazioni UV. Questi composti reattivi dell'ossigeno e dell'azoto diffonderanno in acqua andando a inattivare i batteri presenti al suo interno. Come si vedrà nei prossimi capitoli, la specie maggiormente responsabile della decontaminazione è l'ozono (O_3).

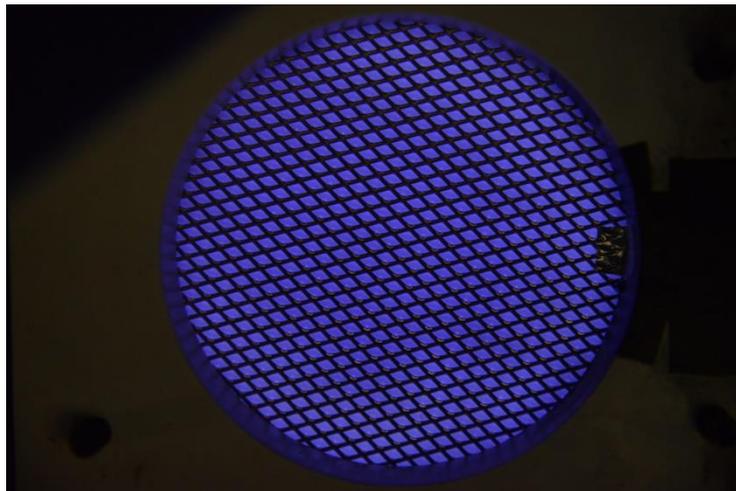


Figura 2.5: Foto della sorgente DBD utilizzata sperimentalmente accesa. Si può notare come il plasma si formi omogeneamente per tutta la superficie ricoperta dalla componente metallica dell'elettrodo, area che corrisponde all'area in cui è presente il liquido da trattare. L'omogeneità del plasma generato assicura che il trattamento avvenga in egual misura in tutte le zone in cui è presente il liquido.

Il generatore elettrico utilizzato per le prove sperimentali è AlmaPULSE, un generatore di corrente alternato e micropulsato sviluppato da AlmaPlasma s.r.l.

Il generatore consente di variare diversi parametri entro un ampio range di valori:

- Voltaggio: da 1 kV a 20 kV con un errore di 0,5 kV.
- Frequenza: da 1 kHz a 20 kHz con un errore di 1 kHz.
- Tempo di trattamento: da 1 s a 999 s con un errore di 1 s.
- Duty Cycle: Il *Duty Cycle* (o *ciclo di lavoro utile*) permette di impostare un ciclo composto da due intervalli di tempo (ON e OFF) nell'ordine dei millisecondi. Durante la fase di ON il generatore è in funzione, mentre durante la fase di OFF non esercita la tensione ai due elettrodi.

2.3 Specie reattive indotte da trattamento plasma di liquidi

La chimica indotta dal plasma in aria, in liquido e all'interfaccia tra liquido e aria è molto complessa e analizzandola si possono comprendere i meccanismi e le reazioni chimiche che portano all'inattivazione batterica del campione trattato. Occorre specificare che i processi che saranno descritti di seguito riguardano plasmi di non equilibrio generati in aria e a pressione atmosferica, difatti si presentano meccanismi differenti al variare dell'ambiente e dei sistemi utilizzati per indurre il plasma.

Un plasma nelle condizioni sopracitate induce la formazione di specie reattive, radiazioni UV, particelle cariche, campi elettromagnetici e calore.

Le specie reattive che si producono si possono differenziare in due gruppi:

- *ROS (Reactive Oxygen Species)*, ovvero le specie reattive dell'ossigeno come perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale OH^\cdot , l'ossigeno monoatomico O^\cdot e l'ozono (O_3).
- *RNS (Reactive Nitrogen Species)*, ovvero le specie reattive che contengono azoto tra cui l'ossido nitrico (NO) prodotto in aria dalla scarica di plasma. Dalla sua diffusione in acqua derivano altre specie reattive come nitriti (NO_2^-), nitrati (NO_3^-) e perossinitriti ($ONOO^-$).

I radicali in generale sono atomi o molecole con un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno, condizione che rende queste specie estremamente reattive, difatti rimangono tali per brevi intervalli temporali, fino a che non reagiscono con altri composti con cui vengono a contatto. La loro alta reattività permette a queste specie di danneggiare la parete cellulare dei batteri con cui vengono a contatto e, dopo essere penetrati al loro interno, di danneggiare il DNA delle cellule ottenendo l'effetto di inattivazione voluto [6].

Anche il pH della soluzione gioca un ruolo importante nella decontaminazione, difatti a pH acidi si hanno risultati di inattivazione maggiori. Alcune specie reattive dell'azoto come nitriti e nitrati hanno un'azione acidificante sul liquido, dunque fanno diminuire il pH della soluzione. Nel grafico 2.1 sono riportati i dati di uno studio di Lukes et al. che

evidenzia il contributo del pH nell'inattivazione di *E. coli*. Si può notare inoltre che anche la variazione del gas utilizzato ha un peso nell'efficienza del trattamento [7].

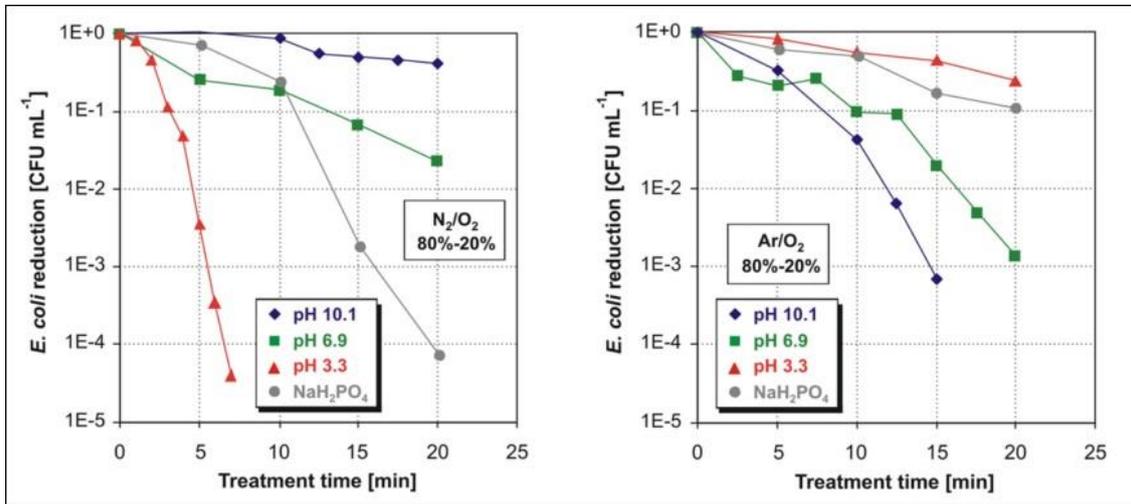
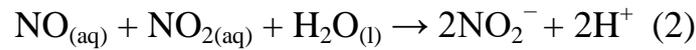
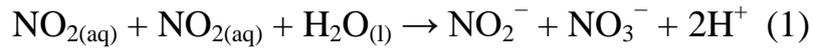


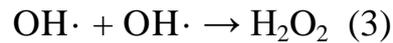
Grafico 2.1: Grafici riassuntivi di trattamenti plasma assistiti su *E. coli* che evidenziano il ruolo del pH nel processo di decontaminazione batterica [7].

La radiazione ultravioletta e le particelle cariche prodotte aumentano il processo di inattivazione. In particolare la radiazione UV inibisce la capacità di riproduzione cellulare dei patogeni andando a danneggiare il DNA della cellula [6], mentre le particelle cariche accumulandosi sulla membrana dei batteri potrebbero causarne la rottura [8].

Ci si concentri ora sui meccanismi di formazione delle specie reattive che contribuiscono alla decontaminazione batterica. I nitriti (NO₂⁻) e i nitrati (NO₃⁻) derivano dalla dissoluzione nel liquido trattato degli ossidi di azoto (NO_x) che si formano in aria dalla dissociazione per mezzo della scarica di plasma di azoto e ossigeno molecolare (N₂ e O₂) presenti in aria. Gli ossidi di azoto dissolvendosi in acqua producono non solo nitriti e nitrati ma anche ioni idrogeno, come mostrato nelle reazioni (1) e (2):



Il perossido di idrogeno (H_2O_2) invece si forma dalla ricombinazione dei radicali $\text{OH}\cdot$ prodotti dal plasma all'interfaccia tra liquido e aria secondo la reazione (3):



Nitriti e perossidi di idrogeno reagiscono tra loro dando come prodotti dei nitrati. La costante di dissociazione acida della reazione (pK_a) è 6,8. Se la reazione continua si può arrivare alla formazione perossinitrito ($\text{O}=\text{NOOH}$), come mostrato nella reazione (4):

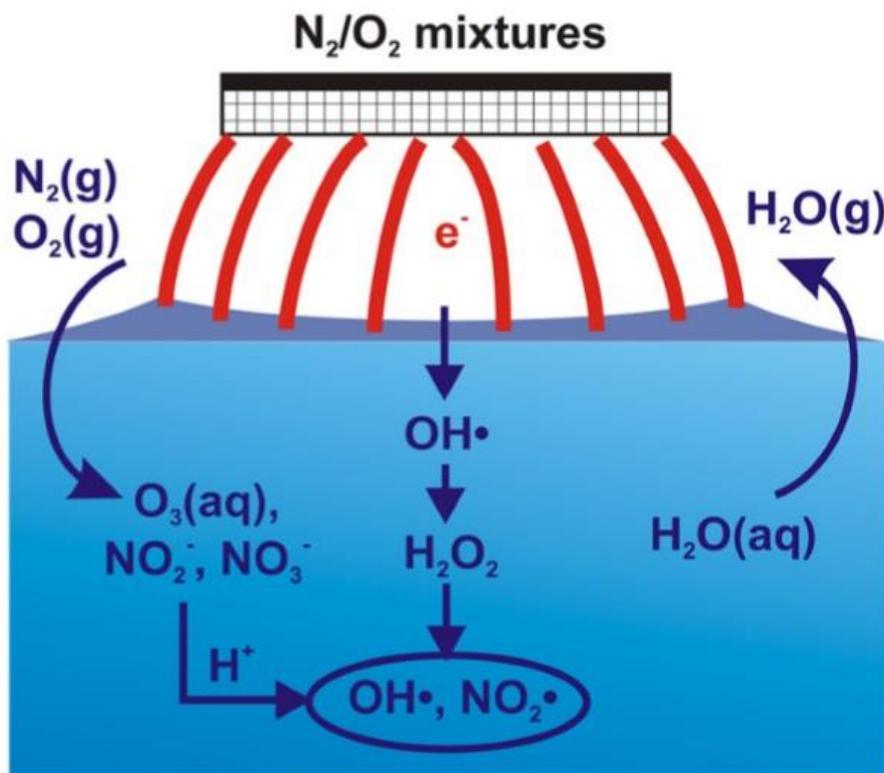
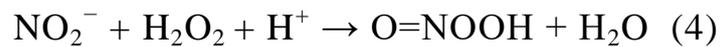


Figura 2.6: Schematizzazione delle reazioni chimiche indotte dal plasma nel liquido trattato [7].

La produzione del perossinitrito è catalizzata da un pH acido e il suo rateo di formazione è dipendente dalla concentrazione nella soluzione di nitriti e perossidi di idrogeno [3]. La vita media dell'anione perossinitrito è di pochi secondi (3 - 6 s) ma comparata ai periodi di vita dei radicali, che sono dell'ordine dei μs , è maggiore di tre ordini di grandezza [9].

Anche l'ozono (O_3) dà un contributo al processo di inattivazione, in particolare Khadre et al. hanno confrontato il potere battericida del perossido di idrogeno con quello dell'ozono disciolto in acqua (si è fatto gorgogliare dell'ozono in forma gassosa in acqua sterile). Nella maggior parte dei casi studiati l'acqua ozonizzata ha ottenuto risultati di decontaminazione migliori rispetto al perossido [10]. Gli studi sugli effetti battericidi dell'ozono hanno portato a confermare la tesi secondo cui maggiore è la sua concentrazione nella soluzione, maggiore è il potere battericida del trattamento.

L'ozono è una specie reattiva molto stabile perciò dà un forte contributo nella fase di *post discharge* ma parte di esso può essere decomposto dalle specie radicaliche dell'azoto come NO^\cdot o NO_2^\cdot [7], entrando così in una fase di *quenching*.

La decomposizione dell'ozono è accelerata anche dalla reazione con perossido di idrogeno in presenza di ioni OH^- secondo la reazione (5):



A pH molto acidi ($\text{pH} = 2 - 3$) la reazione (5) è molto lenta, ma per valori del pH attorno a 5 il processo viene accelerato significativamente [7].

3. Caratterizzazione elettrica della sorgente DBD indiretta

L'obiettivo da raggiungere è trovare delle condizioni operative per cui il trattamento produca la decontaminazione dell'*E. coli* contenuto nell'acqua ma al tempo stesso i valori dei TRO (*Total Residual Oxidant*) nell'acqua trattata devono essere inferiori a 0,1 mg/l, come già detto precedentemente. Una volta trovata una combinazione tra voltaggio, frequenza e tempo di trattamento che rispetti i parametri prefissati, si procede con la caratterizzazione elettrica della sorgente plasma DBD indiretta a quelle determinate condizioni operative.

Le condizioni scelte sono:

- Voltaggio = 15 kV
- Frequenza = 4 kHz
- Tempo di trattamento = 10 s

La caratterizzazione elettrica consiste nella lettura e rielaborazione di due misure: tensione e corrente. Lo strumento utilizzato è l'oscilloscopio *Tectronix DPO 40034* a cui sono collegate due sonde, una di tensione e una di corrente, rispettivamente i modelli *Tectronix P6015A* e *Pearson 6585*.

La sonda di tensione è collegata in parallelo rispetto al generatore e ha al suo interno una resistenza molto elevata e nota, in modo che la corrente che scorre al suo interno sia minima e non interferisca con il segnale.

La sonda di corrente ha una struttura ad anello al cui interno è presente una bobina. Il cavo di alta tensione viene fatto passare all'interno della sonda che misura la f.e.m. (forza elettromotrice) indotta dal campo elettromagnetico che è prodotto dalla corrente che scorre nel cavo. La f.e.m. misurata è proporzionale alla corrente concatenata con la bobina.

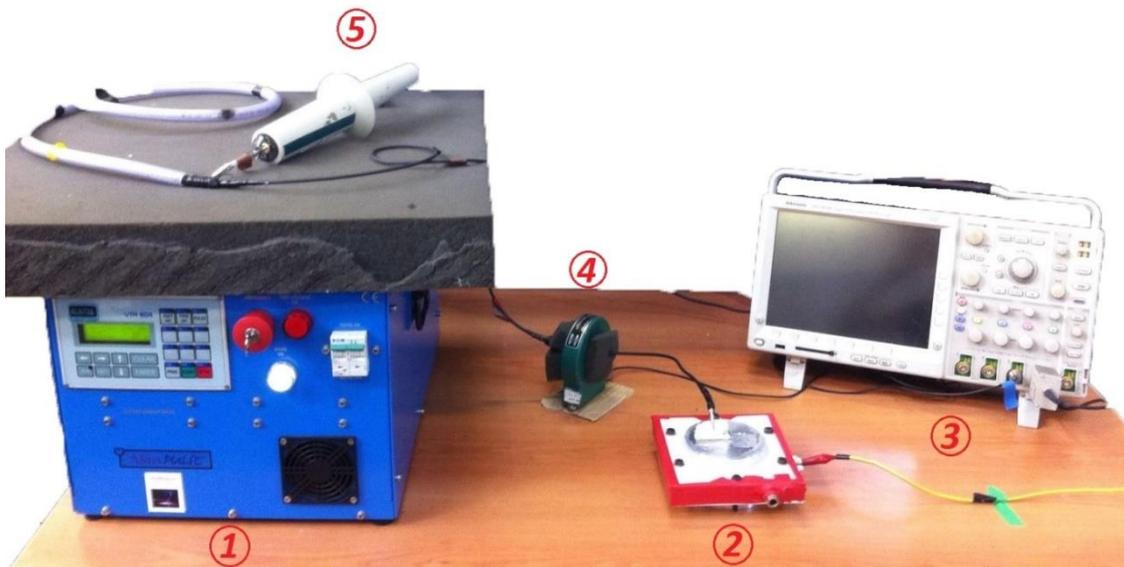


Figura 3.1: Foto del set up utilizzato: 1, generatore micropulsato AlmaPULSE ; 2, sorgente DBD indiretta ; 3, oscilloscopio Tectronix DPO 40034 ; 4, sonda di corrente Pearson 6585 ; 5, sonda di tensione Tectronix P6015A.

Le due sonde vengono collegate all'oscilloscopio che è in grado di leggere e registrare i segnali inviati e di graficare l'andamento della tensione e della corrente in tempo reale. Il segnale di tensione inviato all'oscilloscopio viene attenuato di un fattore 1000 che prende il nome di fattore di attenuazione, perciò occorrerà impostare l'oscilloscopio in modo che moltiplichi il segnale ricevuto per il fattore di attenuazione, che in questo caso è 1000. Il segnale di corrente invece non subisce diminuzioni, perciò il fattore d'attenuazione è 1.

Attraverso i comandi di modulazione dell'oscilloscopio si ottimizza l'acquisizione del segnale in modo che l'immagine sia chiara: ad esempio si varia la scala con cui viene visualizzata l'onda.

Analizzando il grafico ottenuto ci si accorge che i valori effettivi di tensione e corrente sono inferiori rispetto alle condizioni impostate al generatore. Questa attenuazione è causata da tutte le impedenze presenti nel circuito. In particolare si nota come la frequenza subisca una variazione quasi nulla, mentre il voltaggio è sensibilmente minore rispetto a quello impostato.

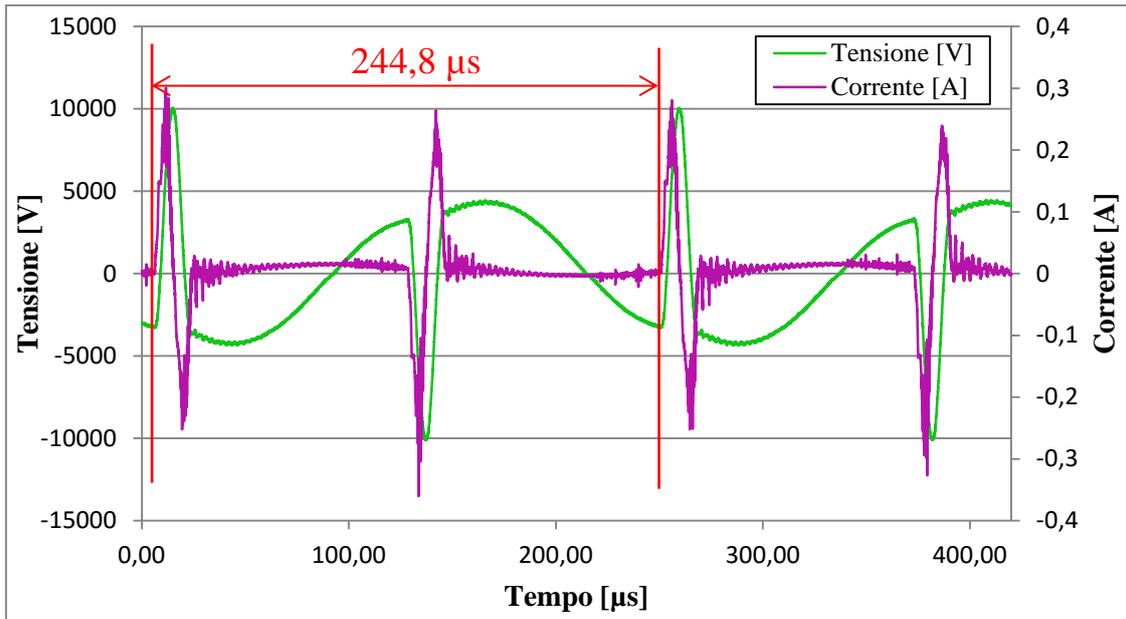


Grafico 3.1: Forma d'onda della tensione (in verde) e della corrente (in viola). L'immagine è stata rielaborata a partire dai dati forniti dall'oscilloscopio in formato csv. Si evidenzia come l'intervallo di tempo tra un impulso e l'altro sia coerente con la frequenza impostata al generatore (4 kHz).

I valori misurati sono:

- Voltaggio massimo = 10,04 kV
- Voltaggio minimo = -10,18 kV
- Frequenza reale = $\frac{1}{244,8 \mu s} = 4,085 \text{ kHz} \cong 4 \text{ kHz}$

Per il voltaggio dunque si ha una variazione in valore assoluto di circa 5 kV.

Attraverso le forme d'onda di tensione e corrente acquisite si possono ottenere informazione sulla potenza media erogata dal generatore.

L'oscilloscopio è impostato per acquisire i valori di tensione e corrente ogni 0,02 μs, per un totale di 10⁵ misure in 2 ms (che è il tempo di osservazione considerato per i calcoli).

La potenza media erogata dal generatore è data dall'integrale della potenza rispetto al periodo di osservazione considerato ($T = 2 \text{ ms}$), diviso per il periodo stesso (definizione di media aritmetica applicata alla potenza), ovvero

$$\bar{P} = \frac{1}{T} \int P \, d\tau$$

Si discretizza l'integrale ottenendo $\bar{P} = \frac{1}{T} \sum_i P_i \, d\tau$

con $T = 2 \text{ ms}$, $i = 1, 2, \dots, 10^5$ e $d\tau = 0,02 \, \mu\text{s} = 2 \cdot 10^{-8} \text{ s}$.

Si calcoli per prima cosa la potenza per ogni i-esima misura, definita come

$$P_i = V_i \cdot I_i$$

dove V_i e I_i sono rispettivamente la tensione e la corrente i-esima.

Sperimentalmente si è calcolato che la sommatoria delle potenze è:

$$\bar{P} = \frac{1}{2 \cdot 10^{-3}} \cdot 0,205902 = 102,951 \text{ W} \cong \mathbf{103 \text{ W}}$$

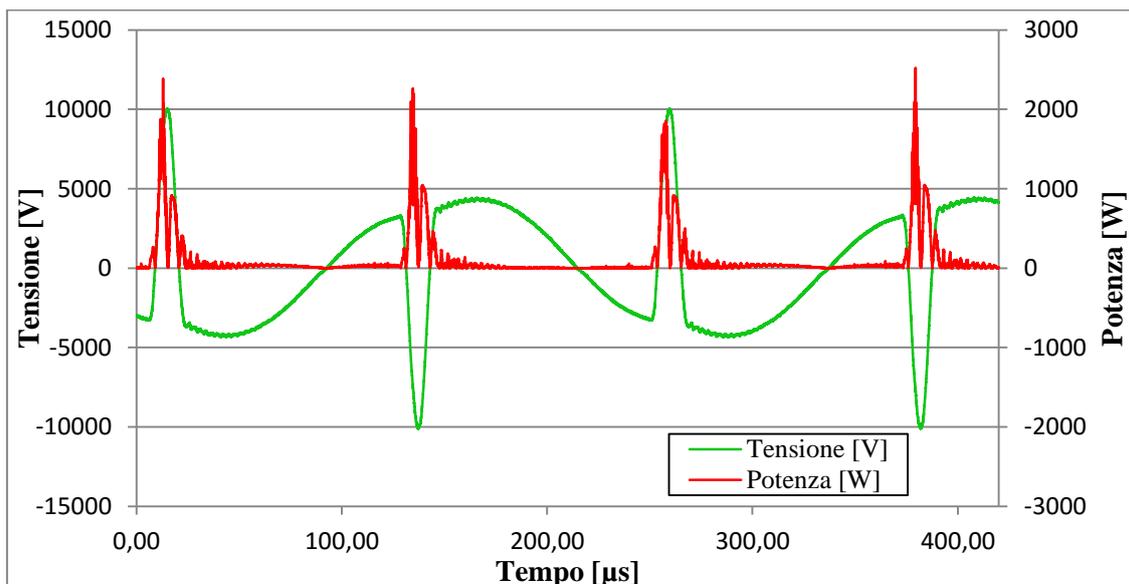


Grafico 3.2: Forma d'onda della tensione (in verde) e della della potenza istantanea (in rosso).

4. Caratterizzazione chimica

In questo capitolo si andranno a descrivere i metodi utilizzati per l'analisi chimica dell'acqua prima e dopo il trattamento plasma assistito con la sorgente DBD indiretta descritta nel capitolo precedente.

4.1 Misura dei TRO (*Total Residual Oxidant*)

I TRO (*Total Residual Oxidant*) derivano dalla parziale ozonizzazione dell'acqua trattata, infatti la sorgente DBD indiretta produce ozono (O_3) che diffonde nella soluzione. Questa specie chimica è la principale responsabile degli effetti di decontaminazione riscontrati sui batteri, dato che non sono presenti né nitriti (NO_2^-) né perossidi (H_2O_2), mentre i nitrati (NO_3^-) solo in basse quantità. Nonostante la presenza dei TRO nell'acqua trattata sia responsabile del potere battericida acquisito dalla soluzione, i loro valori non possono essere superiori a 0,1 mg/l poiché una concentrazione di TRO superiore provocherebbe uno squilibrio dell'ecosistema in cui si reintroduce l'acqua dopo il trattamento di decontaminazione. I trattamenti con condizioni operative che producono acqua con valori di ossidanti al di sopra tale limite non saranno considerati accettabili.

I TRO contenuti nella soluzione sono presenti in due forme, liberi o combinati (si trovano all'interno di molecole più complesse).

I composti che rientrano nella categoria definita come TRO sono i seguenti:

- ClO_2 , biossido di cloro noto come disinfettante, è un composto altamente volatile ovvero che tende ad evaporare facilmente;
- ClO_2^- e ClO_3^- , rispettivamente ione clorito e ione clorato, composti che tendono a persistere nella soluzione quindi sono idonei anche per analisi *out of site*;
- O_3 , ozono, una forma allotropica dell'ossigeno instabile (tempo di dimezzamento in liquido = 20 min).

Per la misura dei TRO nell'acqua trattata in laboratorio si è utilizzato il kit *Chematest 20* prodotto dall'azienda *Swan Analytical*. Lo strumento fornito nel kit è un luminometro in cui viene inserita una cuvetta contenente la soluzione da analizzare. Il luminometro è uno strumento in grado di misurare l'assorbanza di un composto, grandezza definita come

$$A = \ln I_0 - \ln I_1$$

dove I_0 e I_1 sono rispettivamente l'intensità della luce incidente sul campione e l'intensità della luce residua trasmessa dal campione. Questa definizione deriva dalla *legge di Lambert-Beer*, una relazione empirica che correla la quantità di luce assorbita da un mezzo alla concentrazione di un particolare composto chimico presente nel mezzo attraversato dai fotoni che compongono il fascio luminoso:

$$\frac{I_1}{I_0} = e^{-A}$$

Quando un fascio di luce a una certa lunghezza d'onda λ (monocromatico) di intensità I_0 attraversa un mezzo, una parte di esso viene assorbita dal mezzo stesso e una parte viene trasmessa con una intensità residua I_1 .

Il luminometro è in grado di emettere un fascio monocromatico a una lunghezza d'onda definita e calcolare l'assorbanza del mezzo attraversato.

Si utilizza la reazione tra i TRO presenti nell'acqua trattata e un'ammina incolore (DPD) che dà come prodotti un'immina incolore e un composto definito *colorante Würster* (Procedimento descritto più avanti nel capitolo). In questo modo la concentrazione delle molecole di colorante prodotte dalla reazione sono proporzionali alla concentrazione dei TRO iniziale.

Il luminometro dunque emette un fascio monocromatico alla lunghezza d'onda a cui assorbe il colorante Würster, misura l'assorbanza del mezzo attraversato e infine calcola la concentrazione dei TRO nel campione in mg/l.

Il kit fornito utilizza un metodo colorimetrico basato su DPD (*N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD) colourmetric method), un'ammina incolore, ovvero un composto contenente azoto. Questo non è l'unico metodo esistente per effettuare la misura, ma è stato scelto perché il reagente DPD reagisce con qualsiasi TRO, non è selettivo a differenza dei reagenti utilizzati per altri metodi. Un altro aspetto positivo del procedimento utilizzato è la velocità con cui si ottiene il risultato, infatti occorre attendere solamente 90 secondi dopo la miscelazione del campione con i reagenti perché la reazione sia completa [11].

Introdotta da Palin nel 1957, questo metodo è diventato il più utilizzato per la misura dei TRO in una soluzione. La chimica che è alla base della reazione è mostrata in figura 4.1 [12].

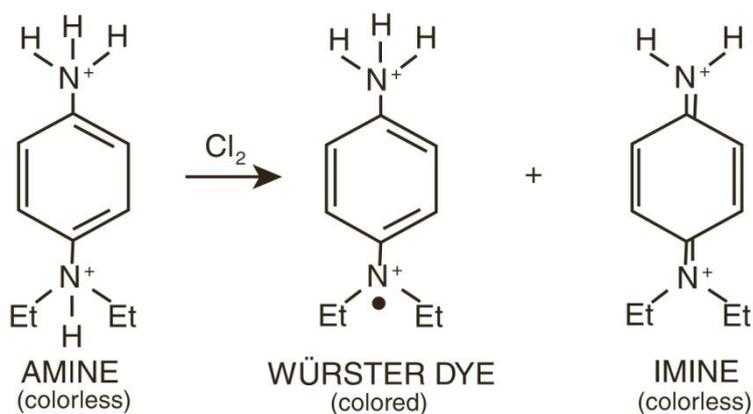


Figura 4.1: l'ammina DPD a contatto con il cloro produce due diversi composti: il colorante Würster e un'immina incolore [12].

L'ammina DPD viene ossidata dal cloro a due prodotti di ossidazione:

- un composto chiamato *colorante Würster* piuttosto stabile che si presenta di colore magenta;
- un'immina incolore più instabile.

Quando il DPD reagisce con piccole quantità di ossidanti, il colorante è il prodotto principale, mentre quando è in presenza di grandi quantità di TRO è favorita la formazione dell'immina, perciò occorre che il rapporto tra le concentrazioni di DPD e ossidanti rimanga alto, in quanto una grande produzione dell'immina incolore potrebbe nascondere parzialmente il colorante Würster falsando così la misura [12]. Solitamente il luminometro è impostato a una lunghezza d'onda di 530 nm, valore che è stato scelto poiché si trova tra i due picchi presenti nello spettro d'assorbimento del colorante Würster come si può notare in figura 4.2.

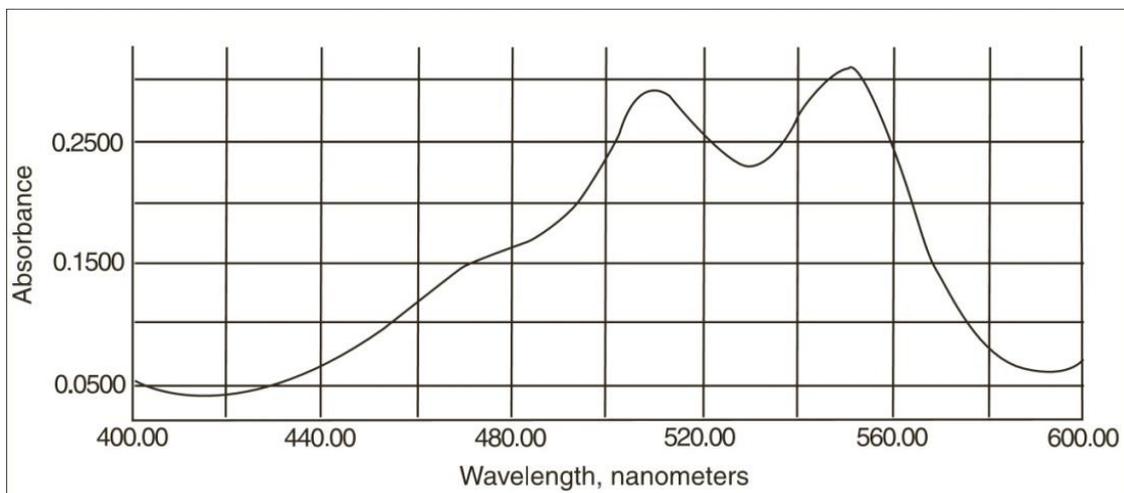


Figura 4.2: Spettro d'assorbimento del colorante Würster. Si notino i picchi di assorbimento a 512 nm e a 553 nm.

Tutti i luminometri hanno un minimo d'errore con cui possono misurare l'assorbanza, perciò si è scelto tale intervallo per estendere il range in cui possono lavorare [12]. Il valore di 530 nm è convenzionale e di riferimento.

Prima di procedere con le misurazioni assicurarsi che la cuvetta sia pulita onde evitare errori in fase di misura.

Il procedimento operativo utilizzato è il seguente:

- Versare 10ml di acqua trattata nella cuvetta;
- Impostare il programma c2 corrispondente all'analisi della concentrazione dei TRO e calibrare lo strumento, assicurandosi che non entri luce all'interno dello strumento utilizzando il tappo fornito nel kit;
- Aggiungere 5 gocce di reagente 2 (Oxycon 2) e successivamente 5 gocce di DPD;
- Mescolare in modo che i reagenti siano dispersi omogeneamente nella soluzione;
- Attendere 90 secondi per leggere il risultato.
- Le misure alle varie condizioni operative sono state prodotte almeno in triplicato per verificare la ripetibilità del processo e per avere valori più rappresentativi del possibile utilizzo ripetuto del processo.



Figura 4.3: Foto del Chematest 20 utilizzato per la misura dei TRO.

4.2 Misura di NO_2^- , NO_3^- ed H_2O_2

Per le misure semi-quantitative delle principali specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (NO_2^- , NO_3^- , H_2O_2) sono state utilizzate delle strisce *QUANTOFIX* (*semi-quantitative test strips*). Il funzionamento è estremamente semplice, difatti occorre solamente bagnare la parte superiore delle strisce nell'acqua trattata. Una volta bagnata si colorerà, in modo da poterla confrontare con una scala di colori a cui sono associati dei valori. A questo punto basterà individuare l'intervallo in cui è compresa la tonalità di colore della striscia per associare il colore ottenuto a un intervallo di valori.

Questo metodo è estremamente semplice ma non molto preciso in quanto fornisce una misura semiquantitativa. La scelta di utilizzare questo metodo approssimativo piuttosto che procedimenti più precisi è giustificata dal fatto che sia i nitriti (NO_2^-) che i perossidi di idrogeno (H_2O_2) non sono presenti nell'acqua trattata, e che i nitrati (NO_3^-) sono presenti in basse quantità. Perciò la misura semi-quantitativa descritta è utile solamente come verifica dell'assenza di nitriti e perossidi.

4.3 Risultati di caratterizzazione chimica

Le condizioni operative testate (tensione di picco, frequenza e tempo di trattamento) sono state le seguenti:

1. 6,5 kV ; 1 kHz ; 10 s di trattamento.
2. 6,5 kV ; 1 kHz ; 10 s di trattamento + 5 s OFF (la sorgente viene aperta dopo 5 secondi).
3. 15 kV ; 1 kHz ; 3 s di trattamento.
4. 15 kV ; 1 kHz ; 8 s di trattamento.
5. 15 kV ; 1 kHz ; 10 s di trattamento.
6. 15 kV ; 4 kHz ; 10 s di trattamento.

Prima di poter fare test biologici di decontaminazione occorre verificare che i TRO (*Total Residual Oxidant*) nell'acqua non siano troppo elevati. Il limite posto in questo

progetto di tesi è di 0,1 mg/l in quanto concentrazioni maggiori di TRO nel liquido trattato plasma potrebbero danneggiare l'ecosistema in cui l'acqua viene reimpressa, ad esempio dopo l'utilizzo in un impianto di raffreddamento industriale.

Di seguito è mostrato un grafico riassuntivo dei valori di TRO misurati all'interno dell'acqua trattata. Per ogni condizione operativa sono state effettuate almeno quattro prove in replicato.

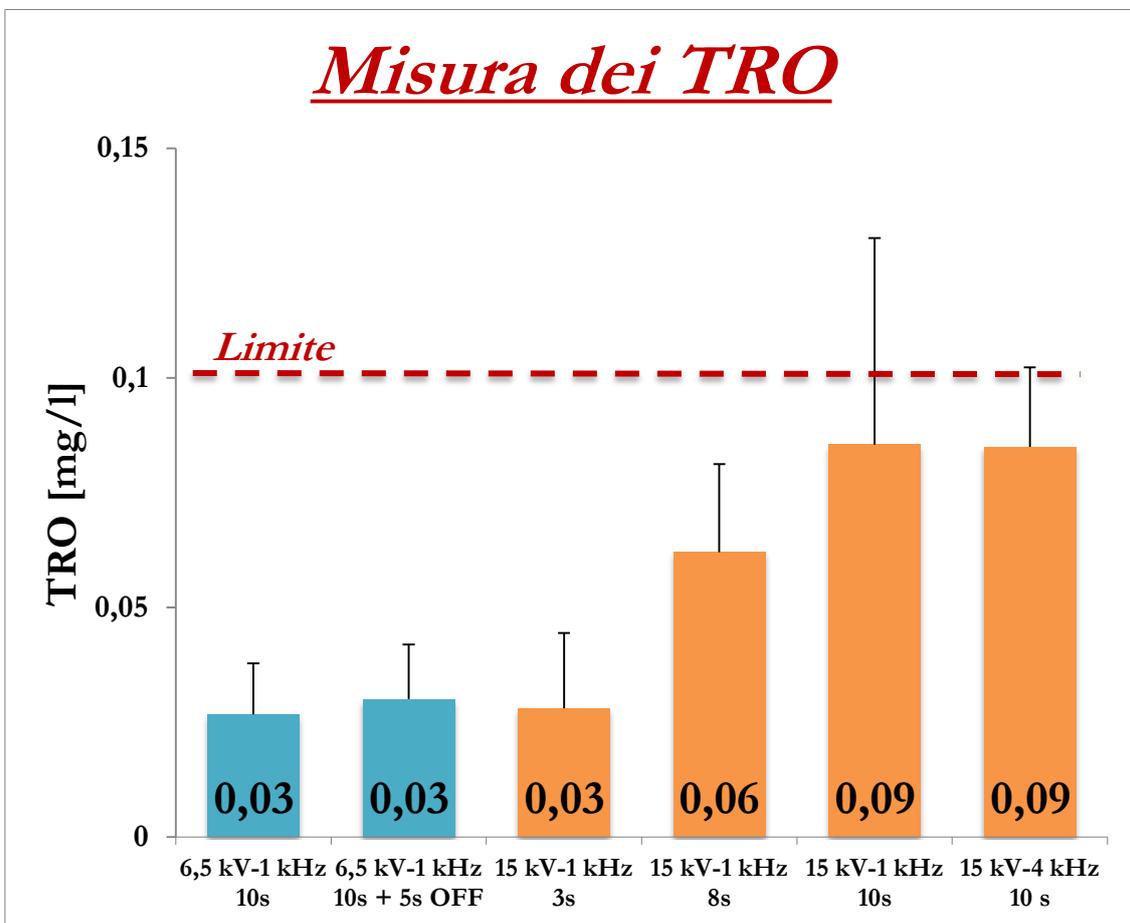


Grafico 4.1: Grafico riassuntivo dei livelli di TRO misurati nell'acqua trattata plasma nelle varie condizioni operative testate.

5. Test di inattivazione batterica

5.1 Protocollo di verifica del potere battericida del trattamento plasma

Per tutte le prove di inattivazione batterica è stato seguito il seguente protocollo, a partire dalla coltura dei batteri fino ad arrivare alla determinazione del potere battericida del trattamento misurando le colonie di batteri sopravvissute dopo il trattamento plasma assistito.

L'acqua è stata contaminata con *Escherichia coli*, batterio gram-negativo molto spesso utilizzato come modello in biologia per test antimicrobici.

La soluzione batterica è stata preparata secondo il seguente procedimento:

- Fare crescere il batterio *Escherichia coli* la notte prima del trattamento su piastra di Nutrient agar a temperatura costante (38 °C) in incubatore.
- Preparare una soluzione salina NaCl 0,9 % con una concentrazione batterica di $1,2 \times 10^8$ CFU/ml (CFU = Colony Forming Unit).
- Preparare 6 provette eppendorf contenenti 0,9 ml di acqua da trattare per fare delle diluizioni scalari 1:10. Si parte inserendo 100 µl di soluzione madre nella prima eppendorf e poi mettendo 100 µl di questa nella seconda e così consecutivamente fino alla sesta.
- Seminare le diluizioni 5 (10^3 CFU/ml) e 6 (10^2 CFU/ml) su piastra agar per verificare la carica batterica di partenza della soluzione madre.
- Prendere 100 µl della seconda diluizione (10^6 CFU/ml) che corrispondono a 10^5 CFU totali e aggiungerli a 99,9 ml di acqua da trattare. Si ottiene così una soluzione di 100 ml totali con 10^5 CFU di *E. coli*, dunque la concentrazione del battere sarà 10^3 CFU/ml. Questa è definita come soluzione contaminata di partenza (SP).

- Seminare 1 ml della soluzione di partenza (SP) su piastra agar come controllo negativo: rappresenta la carica batterica di partenza per l'esperimento di inattivazione.
- Seminare due diluizioni seriali (1:10 e 1:100) in NaCl 0.9% (100 µl di soluzione batterica in 900 µl di NaCl 0.9%) per agevolare la conta delle colonie batteriche.

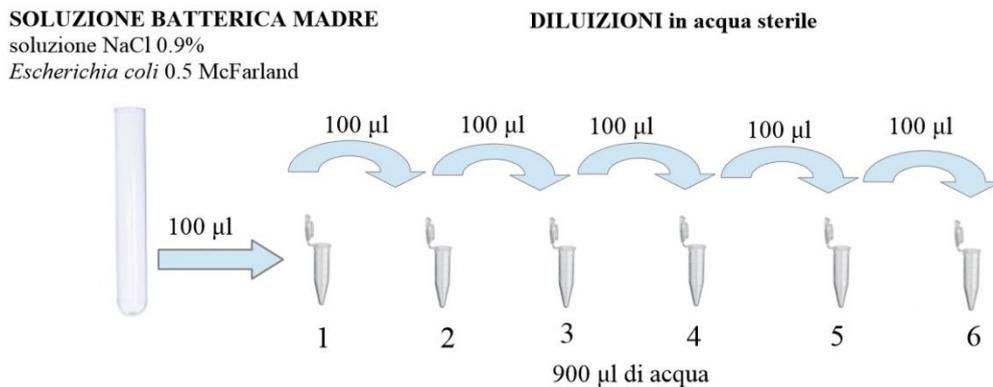


Figura 5.1: Schema delle diluizioni 1 : 10 a partire dalla soluzione madre con concentrazione 10^8 CFU/ml.

Durante il trattamento plasma dell'acqua contaminata si deve lavorare sempre con un becco di Bunsen acceso per garantire un ambiente sterile dato che i trattamenti non vengono effettuati in ambiente controllato. Si utilizza il seguente procedimento:

- Trattare 10 ml della soluzione di partenza: si versano nella capsula petri.
- Seminare su piastra agar 1 ml della soluzione trattata e due diluizioni 1:10 e 1:100 della medesima in NaCl 0,9 % per valutare l'effetto battericida del trattamento sul battere.

Ogni diluizione e ogni soluzione è stata agitata al vortex prima di essere utilizzata o prima di effettuare la semina su piastra agar. Le piastre Nutrient Agar utilizzate sono sterili, sono lasciate riscaldare a temperatura ambiente prima di essere utilizzate e sono opportunamente contrassegnate.

La semina viene effettuata sotto una cappa a flusso laminare e le piastre sono lasciate asciugare aperte prima di riporle nell'incubatore a 37 °C per tutta la notte (*over night*). Le piastre nell'incubatore vanno capovolte (parte con agar in alto e coperchio sotto) per evitare che le goccioline di condensa cadendo sulla parte agarata vadano a disturbare la coltura.

Dopo aver incubato si conta ogni colonia che si formata nella piastra (ogni CFU, ogni punto bianco corrisponde a una colonia). Durante la conta la piastra non deve essere aperta.

Nel controllo con 1 ml di soluzione di partenza (SP) non diluito le colonie saranno troppe per essere contate (10^3), dunque si conta una delle due diluizioni preparate in precedenza (10^2 e 10^1). Per non approssimare troppo la conta, è preferibile contare le colonie nella diluizione minore, ovvero utilizzando la soluzione 1 per i controlli e i campioni trattati e la diluizione 5 per la soluzione madre.

Le colonie contate sulle piastre in cui è stato seminato 1 ml non diluito corrisponderanno giù alla effettive colonie presenti (in CFU/ml). Per le diluizioni invece è necessario moltiplicare il numero delle colonie contate per il rispettivo fattore di diluizione:

- la diluizione 1 è 1 : 10, ma considerando che sono stati seminati 100 µl, ovvero 0.1 ml (corrisponde ad un ulteriore diluizione 1 : 10), occorrerà moltiplicare per 100 il numero di colonie contate;
- la diluizione 2 è 1 : 100, ma dato che come nel caso precedente sono stati seminati 100 µl, ovvero 1 ml (corrisponde ad un ulteriore diluizione 1 : 10), occorrerà moltiplicare per 1000 il numero di colonie contate.

Una volta terminata la conta delle colonie sia nelle soluzioni di controllo che nelle soluzioni campione trattate, si può calcolare la **riduzione logaritmica della carica batterica (Log R)** definita come:

$$\text{Log R} = \text{Log (Controllo)} - \text{Log (Campione)}$$

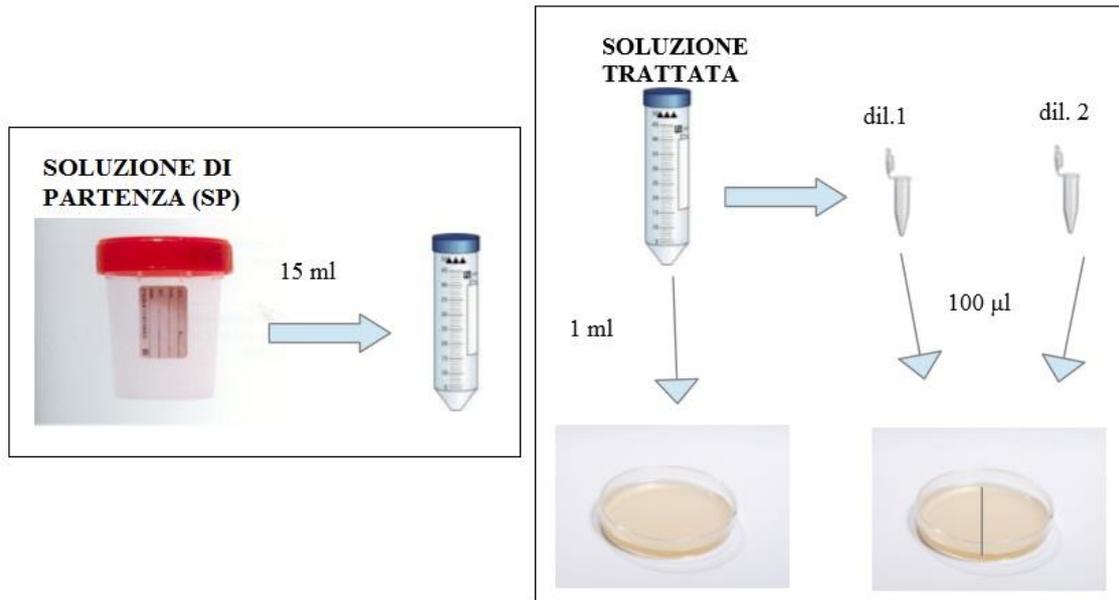


Figura 2.5: Si riempiono con 15 ml di SP tante falcon quanti sono i trattamenti da eseguire, poi si semina 1 ml di soluzione trattata e 0,1 ml delle diluizioni 1 : 10 e 1 : 100 della soluzione trattata.

5.2 Risultati di inattivazione batterica

Per le prove biologiche si sono scelte le due condizioni operative più forti, ovvero con tensione e frequenza più alti, dato che rispettano i limiti imposti sui TRO nell'acqua trattata, ovvero

- 15 kV ; 1 kHz ; 10 s di trattamento.
- 15 kV ; 4 kHz ; 10 s di trattamento.

Per la condizione operativa 5 (15 kV ; 1 kHz ; 10 s di trattamento) è stato riscontrato che il trattamento non ha inattivato i batteri, difatti la riduzione logaritmica calcolata è molto bassa.

CAMPIONI	CFU/ml	LOG R
15kV - 1kHz - 10s (I)	215	0,67
15kV - 1kHz - 10s (II)	195	0,71
15kV - 1kHz - 10s (III)	210	0,68

Tabella 3.1: *Tabella riassuntiva dei valori di colonie batteriche sopravvissute al trattamento (15kV ; 1kHz ; 10s) e calcolo della riduzione logaritmica di carica batterica.*

La condizione operativa 6 (15 kV; 4 kHz ; 10 s di trattamento) ha permesso di ottenere una decontaminazione maggiore della soluzione.

CAMPIONI	CFU/ml	LOG R
15kV - 4kHz - 10s (I)	11	0,96
15kV - 4kHz - 10s (II)	5	1,3

Tabella 3.2: *Tabella riassuntiva dei valori di colonie batteriche sopravvissute al trattamento(15kV ; 4kHz ; 10s) e calcolo della riduzione logaritmica di carica batterica.*



Figura 3.1: *Fotografia di una piastra agarata in cui è stato lasciato proliferare il battere E.coli per una notte in incubazione.*

Conclusioni

In questo progetto di tesi sperimentale è stato testato un trattamento plasma assistito su liquido con una sorgente DBD indiretta. Il liquido in esame è acqua riprodotta sinteticamente in laboratorio e contaminata con *E.coli* per verificare l'efficacia del potere battericida del trattamento.

La sorgente è stata dapprima caratterizzata elettricamente studiando le forme d'onda di tensione e corrente a determinate condizioni operative. Analizzando chimicamente l'acqua trattata si sono misurate le concentrazioni dei TRO (*Total Residual Oxidant*), dei perossidi di idrogeno, dei nitriti e dei nitrati presenti all'interno della soluzione dopo il trattamento plasma assistito. In particolare è emerso che in tutti i casi testati i livelli degli ossidanti sono entro il limite prestabilito di 0,1 mg/l, dimostrando che il trattamento non altera significativamente il liquido.

Lo studio è stato incentrato sulla determinazione del potere battericida di tale trattamento al fine di valutare una possibile applicazione industriale in larga scala per la decontaminazione di acqua utilizzata all'interno di sistemi di raffreddamento, luogo in cui sono presenti condizioni ottimali per la proliferazione di batteri.

Dai risultati ottenuti è emerso che il trattamento è responsabile soltanto di una decontaminazione parziale del batterio *E. coli*, ma da ulteriori studi si potranno trovare delle condizioni tali da inattivare totalmente la carica batterica presente date le grandi potenzialità di questo trattamento.

Bibliografia

- [1] D. W. Keller, R. Hajjeh, A. Demaria, B. S. Fields, J. M. Pruckler, R. S. Benson, P. E. Kludt, S. M. Lett, L. A. Mermel, C. Giorgio, and R. F. Breiman, “Community Outbreak of Legionnaires’ Disease : An Investigation Confirming the Potential for Cooling Towers to Transmit Legionella Species,” *J. Infect. Dis.*, pp. 257–261, 1996.
- [2] V. Nehra, A. Kumar, and H. K. Dwivedi, “Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources,” *Int. J. Eng.*, vol. 2, no. 1, pp. 53–68, 2008.
- [3] R. Laurita, D. Barbieri, M. Gherardi, V. Colombo, and P. Lukes, “Chemical analysis of reactive species and antimicrobial activity of water treated by nanosecond pulsed DBD air plasma,” *Clin. Plasma Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 53–61, 2015.
- [4] P. Muranyi, J. Wunderlich, and M. Heise, “Sterilization efficiency of a cascaded dielectric barrier discharge,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 103, no. 5, pp. 1535–1544, 2007.
- [5] M. Heise, W. Neff, O. Franken, P. Muranyi, and J. Wunderlich, “Sterilization of polymer foils with dielectric barrier discharges at atmospheric pressure,” *Plasmas Polym.*, vol. 9, no. 1, pp. 23–33, 2004.
- [6] M. Laroussi, “Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: Review, analysis, and prospects,” *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 30, no. 4 I, pp. 1409–1415, 2002.
- [7] P. Lukes, E. Dolezalova, I. Sisrova, and M. Clupek, “Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂,” *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 23, no. 1, p. 15019, 2014.
- [8] D. A. Mendis, M. Rosenberg, and F. Azam, “D 1 D 1,” vol. 28, no. 4, pp. 1304–1306, 2000.
- [9] H. Shintani, “Inactivation of Bacterial Spore, Endotoxin, Lipid A, Normal Prion and Abnormal Prion by Nitrogen Gas Plasma Exposure,” *Int J Bioanal Methods*

- Bioequival Stud*, vol. 2, no. 1, pp. 23–33, 2015.
- [10] M. A. Khadre and A. E. Yousef, “Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 71, no. 2–3, pp. 131–138, 2001.
- [11] K. A. H. Buchan, D. J. Martin-Robichaud, and T. J. Benfey, “Measurement of dissolved ozone in sea water: A comparison of methods,” *Aquac. Eng.*, vol. 33, no. 3, pp. 225–231, 2005.
- [12] D. L. Harp, “Current Technology of Chlorine Analysis for Water and Wastewater,” *Tech. Inf. Ser.*, no. 17, p. 34, 2002.