

Inativação dos microrganismos indicadores *Escherichia coli*, colifagos e *Clostridium perfringens* empregando ozônio

Inactivation of the microorganisms indicators *Escherichia coli*, coliphages and *Clostridium perfringens* with ozone

Jeanette Beber de Souza¹

Luiz Antonio Daniel²

Resumo

Neste trabalho foram realizados ensaios de desinfecção com ozônio, utilizando água sintética preparada em laboratório inoculada com os microrganismos indicadores *Escherichia coli* cepa ATCC 11229, colifagos e *Clostridium perfringens* cepa ATCC 13124. As dosagens aplicadas de ozônio foram: 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/L e os tempos de contato empregados foram: 5, 10, 15 e 20 minutos. O ozônio foi considerado efetivo para a inativação dos três microrganismos indicadores empregados, com destaque para a inativação dos colifagos.

Palavras-chave: desinfecção; água; ozônio; *Escherichia coli*; colifagos; *Clostridium perfringens*.

Abstract

The present work deals with disinfection trials of a laboratory prepared synthetic water with the use of ozone. The synthetic water was inoculated with *Escherichia coli* strain ATCC 11229, *Clostridium perfringens* strain ATCC 13124 and coliphages microorganism indicators. The applied concentrations of ozone were of 2,0; 3,0; 4,0 and 5,0 mg/L. The ozone was considered effective for the inactivation of all the three indicator microorganisms, presenting better results for the inactivation of coliphages.

Key words: disinfection; water; ozone; *Escherichia coli*; coliphages; *Clostridium perfringens*.

1 Dr.^a; Engenheira Civil; Professora do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Estadual do Centro-Oeste-UNICENTRO; E-mail: jeanettebeber@yahoo.com.br

2 Dr.; Engenheiro Civil; Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos

Introdução

O ozônio é um potente oxidante e desinfetante, pouco utilizado no Brasil, porém, muito empregado na Europa e em pequenas instalações de tratamento de água dos EUA (DANIEL et al., 2001).

Dentre os desinfetantes alternativos ao cloro, o ozônio tornou-se notório nas últimas décadas em função da implementação de padrões cada vez mais restritivos em relação aos subprodutos da cloração, como os trihalometanos (THM), ácidos haloacéticos (AHAs), dentre outros, bem como, devido à elevada efetividade do mesmo na inativação de microrganismos patogênicos de difícil inativação como oocistos de *Cryptosporidium*.

Segundo Usepa (1999), o ozônio não forma subprodutos halogenados (THMs e AHAs), entretanto, pode formar vários outros subprodutos orgânicos e inorgânicos. Na presença do íon brometo, subprodutos halogenados resultantes da ozonização, análogos aos da cloração, podem ser formados. Sendo esses considerados de maior risco para a saúde humana comparativamente aos subprodutos não-brominados.

Em relação aos microrganismos indicadores, estes são usados para sugerir a ocorrência de contaminação fecal, verificar a eficiência de processos de tratamento de água, esgoto e possível deterioração ou pós-contaminação da água no sistema de distribuição. Tradicionalmente os indicadores são usados por limitações de ordem prática, técnica e econômica, uma vez que torna-se impossível examinar todos

os potenciais organismos patogênicos presentes na água.

Coliformes fecais são os indicadores usuais de avaliação da qualidade microbiológica de águas. Entretanto, estudos realizados por vários pesquisadores e reportados em documento da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) têm apresentado falhas quanto ao uso desse grupo, podendo-se citar: (i) baixa sobrevivência fora do trato intestinal, particularmente em ambientes marinhos; (ii) definição incerta como um grupo e (iii) baixa relação com a presença de bactérias patogênicas e vírus. Assim, é importante considerar outros indicadores na avaliação microbiológica das águas, os quais podem exibir relação mais estreita com a presença de patogênicos na água, particularmente aqueles que podem persistir por mais tempo no ambiente.

As técnicas de detecção de coliformes e *Escherichia coli* são práticas e relativamente rápidas e vários são os métodos disponíveis, dentre eles, tubos múltiplos, contagem em membranas filtrantes e substratos cromogênicos.

O uso dos colifagos como indicador tem como vantagens sua facilidade de enumeração, incluindo reduzido tempo para o resultado final (4 a 6 horas), além do que, as taxas de inativação de colifagos são similares às aquelas reportadas para muitos patogênicos. Entretanto, para muitos pesquisadores, a maior dificuldade do uso desse indicador refere-se ao fato de que sua enumeração requer manutenção de cepa de bactéria hospedeira de boa qualidade, cuja condição pode ser limitante para muitos laboratórios (PAYMENT; FRANCO, 1993).

Clostrídios Sulfito Redutores são organismos anaeróbios formadores de esporos e o mais característico é o *Clostridium perfringens*. Normalmente estão presentes nas fezes (13 a 35%) embora em menor número do que a *E. coli*. Não são exclusivamente de origem fecal, podendo ser encontrados em outras fontes ambientais. Esporos de clostrídios podem sobreviver na água por muito mais tempo do que organismos do grupo coliforme e são bastante resistentes à desinfecção. Dessa forma, a presença dos mesmos em água desinfetada pode indicar deficiências no tratamento, ou, ainda, que patogênicos resistentes à desinfecção podem ter sobrevivido e passado pelo tratamento. De acordo com Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002), devido à persistência de *C. perfringens* na água - significativamente maior do que patogênicos entéricos – os mesmos são importantes indicadores de contaminação remota, porém, não são recomendados como indicadores fecais, nem para monitoramento de rotina em sistemas de tratamento e distribuição de água.

O ozônio apresenta elevado poder germicida na inativação de grande variedade de organismos patogênicos, incluindo bactérias, vírus e protozoários. Em vista disso, o ozônio pode ser usado para proporcionar alto grau de inativação, embora, não seja interessante usá-lo como desinfetante secundário, porque sua concentração residual decai muito rapidamente (USEPA, 1999).

Segundo Langlais et al. (1991), dentre as bactérias vegetativas a *E. coli* é uma das mais sensíveis à inativação pelo ozônio, enquanto que, cocos gram-positivos (*Staphylococcus* e *Streptococcus*), bacilos

gram-positivos (*Bacillus*), e *Mycobacteria* estão entre as espécies mais resistentes. Ainda, as formas esporuladas são sempre mais resistentes ao ozônio que as formas vegetativas.

Em relação aos vírus, segundo o mesmo autor, esses são em geral muito mais resistentes ao ozônio do que bactérias vegetativas, porém não mais resistentes que as bactérias esporuladas como, por exemplo, a *Mycobacteria*. Entretanto, os fagos são considerados bastante sensíveis ao ozônio. Por sua vez, os cistos de protozoários são reconhecidos pela literatura como muito mais resistentes do que as bactérias vegetativas e vírus.

A principal dificuldade de implementação da ozonização para tratamento de água é a impossibilidade de o ozônio produzir residual desinfetante que previna eventual contaminação do sistema de distribuição de água. Para Zarpelon e Rodrigues (2002), tal fator assume fundamental importância no Brasil, uma vez que nossos sistemas distribuidores possuem regiões operando com baixa pressão e estão sujeitos às consequências da pressão negativa.

Esse trabalho teve por objetivo avaliar a inativação de *E. coli*, indicadora de bactérias, colifagos indicadores de vírus entéricos e *C. perfringens* indicadores de protozoários em água de abastecimento, empregando ozônio como desinfetante.

Material e Métodos

As amostras de água do presente estudo foram oriundas de poço profundo que abastece o *campus* 1 da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP), às quais foram adicionados os

microrganismos indicadores usados na pesquisa, cultivados com antecedência em laboratório e adicionados à água de estudo no momento do experimento.

Os microrganismos indicadores empregados na pesquisa foram *E. coli* (indicadora de bactérias), colifagos (indicadores de vírus) e *C. perfringens* (indicadora de protozoários). As cepas de bactérias usadas foram *E. coli* ATCC 11229, *C. perfringens* ATCC 13124 e *E. coli* CIP 55.30 como hospedeira dos fagos, todas adquiridas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” situada em Campinas, SP. As cepas eram recebidas reativadas em ágar nutriente inclinado em duplicata. Os colifagos foram isolados de esgoto sanitário proveniente do reator anaeróbio de leite expandido (RALEX) situado no campus da EESC-USP, São Carlos, SP.

Para quantificação de *E. coli*, utilizou-se técnica de filtração em membranas, usando o meio Chromocult Coliform Agar (Merck Cat.No.1.10426). Para quantificação de colifagos, empregou-se ensaio de placa segundo norma CETESB L5.225 (1990). Com relação à bactéria *C. perfringens*, adotou-se a metodologia de tubos múltiplos, conforme procedimentos constantes na Norma da CETESB L5.213 (1993).

Os ensaios de desinfecção com ozônio foram realizados em unidade piloto (Figura 1). As dosagens aplicadas de ozônio foram: 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/L e os tempos de contato empregados foram: 5; 10; 15 e 20 minutos. As dosagens de ozônio aplicadas bem como os tempos de contato empregados foram escolhidos mediante ensaios-teste (resultados não apresentados) que não acarretaram na

inativação total dos microrganismos indicadores usados na pesquisa.

Para realização das análises físico-químicas e dos exames microbiológicos foram coletadas alíquotas da água bruta, bem como da água ozonizada após os tempos de contato especificados.

A fração de ozônio excedente capturada no frasco lavador (*off-gas*) foi determinada pelo método iodométrico e a fração de ozônio residual pelo método índigo colorimétrico, empregando espectrofotômetro.

Vale ressaltar que todas as análises físico-químicas, incluindo as de medição de ozônio (métodos iodométrico e índigo), foram feitas seguindo os procedimentos propostos no Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater (APHA,1995).

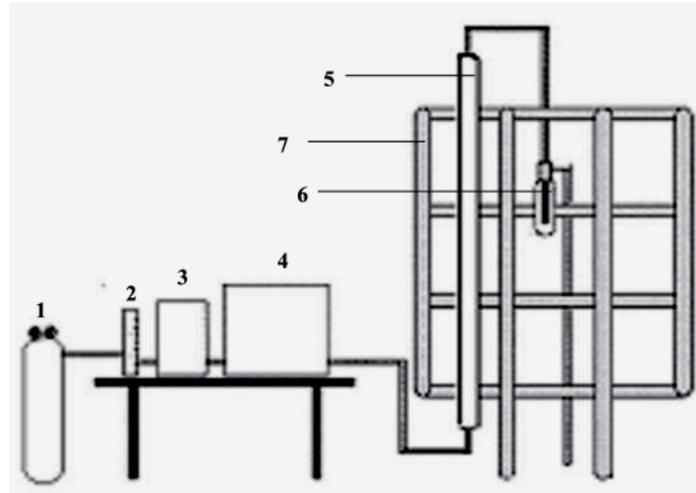
As colunas possuíam nas partes superior e inferior registros de esfera para preenchimento da coluna com a água e coleta da água ozonizada respectivamente, bem como, pedra porosa para difusão do ozônio.

Resultados e Discussão

Os resultados de inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* com ozônio são apresentados na tabela 1.

A partir das frações sobreviventes de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens*, obtidas experimentalmente, foram construídos os gráficos de inativação dos microrganismos indicadores $\log N/N_0$ em função do produto C.t - concentração efetiva de ozônio (C) pelo tempo de contato (t), usando como origem o tempo $t = 0$ correspondente ao tempo de aplicação do ozônio na água (figuras 2 a 5).

Figura 1. Esquema da unidade piloto de ozonização



Fonte: DIAS (2001).

Legenda:

1. cilindro de oxigênio puro (98%);
2. rotômetro, para controle da vazão de oxigênio, com coluna de vidro graduada e um marcador esférico que flutuava na escala em função da vazão ajustada. A vazão variava de 0 a 400 L/h;
3. câmara de refrigeração, modelo Belliere, com serpentina interna imersa em água a 4oC;
4. gerador de ozônio modelo laboratorial, nas dimensões 50 cm x 50 cm x 30 cm, com capacidade máxima de produção de 8 g O₃/h;
5. duas colunas de contato em paralelo, uma para a água de estudo e outra para o KI em acrílico, com 2 m de altura e 52 mm de diâmetro interno;
6. frasco lavador de gás em vidro com capacidade para 1 L. Preenchido com 600 mL de solução de iodeto de potássio (KI) a 2% para avaliar a concentração de off-gas liberado após cada ensaio de ozonização
7. grade metálica para fixação das colunas e do frasco lavador.

Figura 2. Inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* para 2,0mg/L de ozônio aplicado

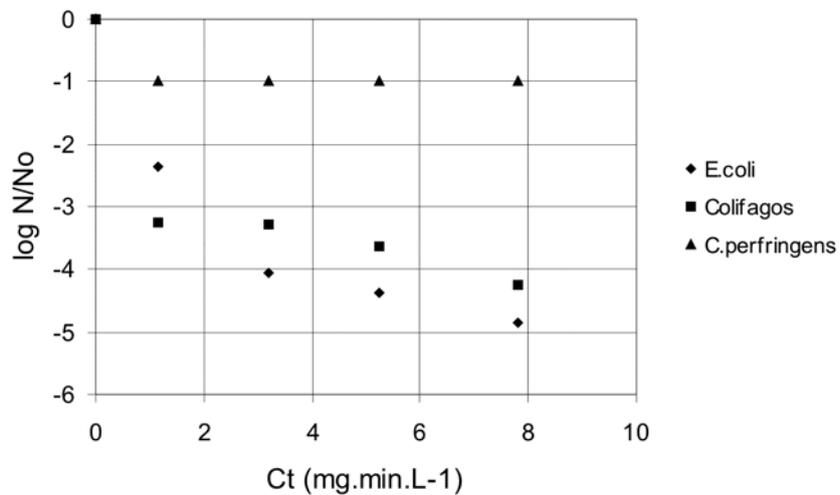


Figura 3. Inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* para 3,0mg/L de ozônio aplicado

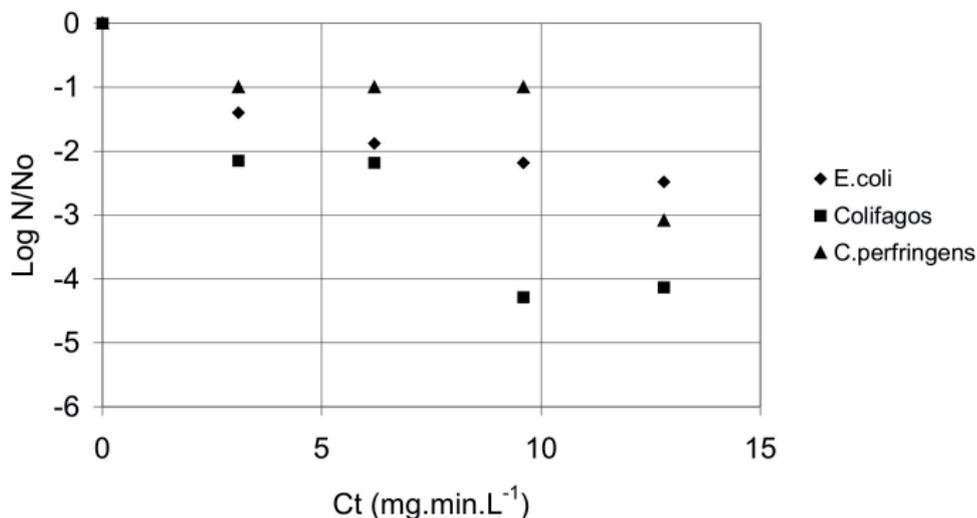
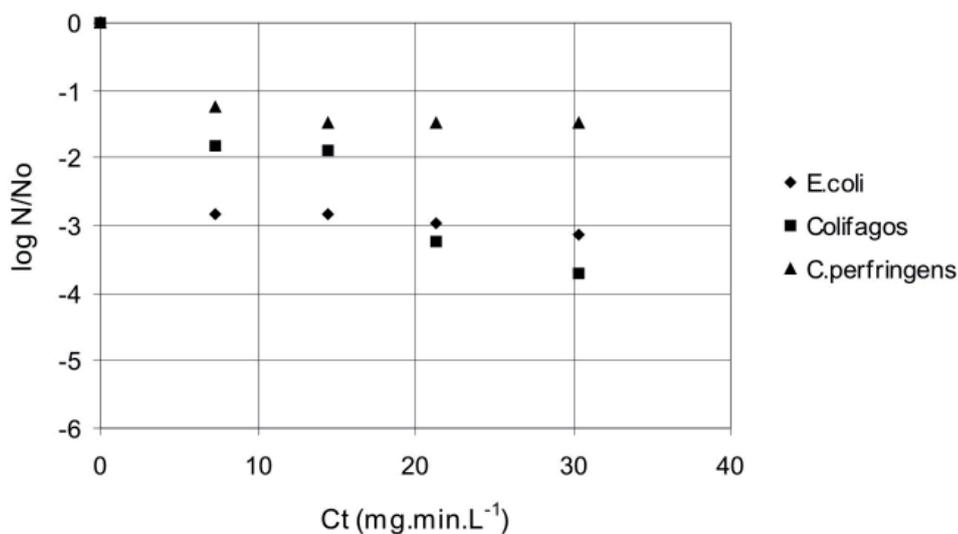


Figura 4. Inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* para 4,0mg/L de ozônio aplicado

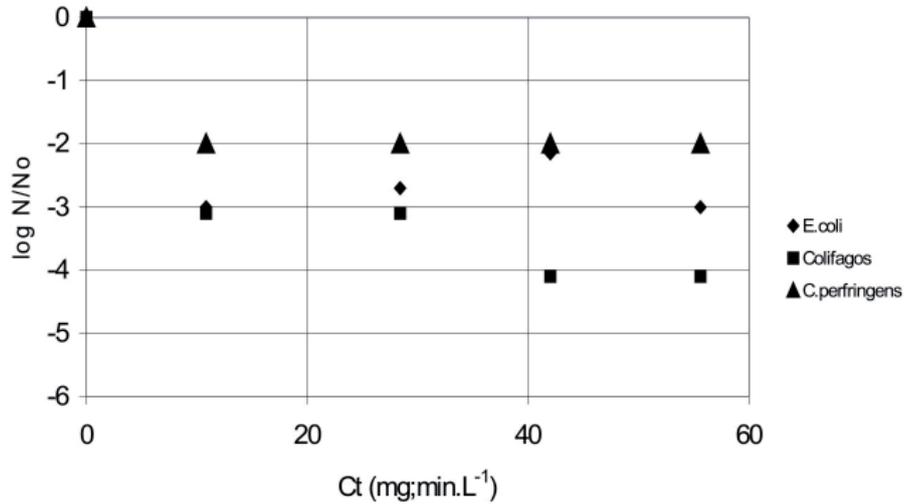


Na presente pesquisa a ordem de inativação dos indicadores com ozônio seguiu: colifagos < *E. coli* < *C. perfringens*, o que confirma alguns estudos reportados na literatura (TYRRELL et al. (1995), Veschetti et al. (2003), Sartori

(2004)) que observaram maior eficiência virucida do ozônio.

Inativações de colifagos maiores do que 4 log foram obtidas para algumas dosagens e tempos de contato empregados. A maior inativação foi de 4,29 log, obtida

Figura 5. Inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* para 5,0mg/L de ozônio aplicado



para a dose de O₃ aplicado de 3 mg/L e 15 minutos de contato (Ct = 9,6 mg.min/L). A menor inativação observada foi para a dosagem aplicada de 4 mg/L e 5 minutos de contato (Ct = 7,3 mg.min/L).

Também para a bactéria *E. coli* obteve-se até 4 log de inativação para algumas dosagens aplicadas e tempos de contato empregados. Geralmente, as porcentagens de inativação para essa bactéria foram menores do que para os colifagos. A maior inativação de *E. coli* foi de 4,85 log, obtida para a dosagem aplicada de 2 mg/L e 20 minutos de contato (Ct = 7,8 mg.min/L). A menor inativação observada foi de 1,40 log para a dose de 3 mg/L e tempo de contato de 5 minutos (Ct = 3,1 mg.min/L).

Tyrrell et al. (1995) compararam cloro e ozônio na inativação de bactérias e vírus provenientes de efluentes secundários de esgoto sanitário. Com a cloração, observaram redução maior do que 100 vezes nas densidades de coliformes fecais e

enterococos. Entretanto, redução menor do que 10 vezes foi observada nas densidades dos dois grupos de bacteriófagos testados (específicos e somáticos). Em contraste, o tratamento com ozônio resultou em redução maior do que 100 vezes nas densidades dos bacteriófagos específicos e somáticos, enquanto que a redução de bactérias vegetativas foi menor do que 30 vezes para ambos indicadores. Os autores concluíram que o ozônio é muito efetivo como virucida, porém, é menos efetivo que o cloro na eliminação de bactérias vegetativas.

Sartori (2004) verificou que o ozônio foi eficiente como desinfetante viral, especialmente quando comparado ao ácido peracético e permanganato de potássio. Valores de até 100% de inativação de colifagos foram obtidos quando se empregou ozônio como desinfetante com Ct = 270 mg.min/L.

Para a bactéria *C. perfringens* obteve-se geralmente de 1 a 2 log de inativação para todas as dosagens de

ozônio aplicadas e tempos de contato empregados. Referente à dose aplicada de O₃ de 5 mg/L observou-se 2 log de inativação para todos os tempos de contato empregados, assim valores mais elevados de Ct não contribuíram para aumentar a porcentagem de inativação dessa bactéria, cuja população remanescente foi da ordem de 105 NMP/100 mL.

Conclusões

Para a água de estudo empregada a resistência de inativação dos microrganismos indicadores ao ozônio seguiu a ordem: colifagos, *E. coli* e *C. perfringens*, o que confirma alguns resultados de estudos reportados na literatura que apresentam o ozônio como melhor agente virucida que bactericida.

Em geral, para todas as dosagens de ozônio aplicadas e tempos de contato empregados, inativações de *C. perfringens* da ordem de 1 a 2 log foram obtidas. Os valores de Ct mais elevados que foram empregados não contribuíram para aumentar a porcentagem de inativação

dessa bactéria. Sua população remanescente foi da ordem de 10⁵ UFC/100 mL.

Recomendações

Devido ao ozônio ser excelente virucida, mas não tão efetivo quanto o cloro na eliminação de bactérias vegetativas (TYRREL et al., 1995), pesquisas têm sido desenvolvidas para examinar a efetividade da combinação de agentes desinfetantes tais como a combinação ozônio / cloro e ozônio / radiação UV. Quando os desinfetantes são usados em combinações apropriadas, esses estudos reportam rápida inativação de vírus e bactérias com limitada formação de subprodutos.

A proposta da desinfecção combinada ozônio / cloro é altamente promissora, uma vez que o ozônio é muito eficiente como oxidante e excelente virucida. Por sua vez, o cloro como desinfetante secundário, supre a necessidade de manutenção do residual desinfetante, fundamental para a água de abastecimento, que a ozonização não oferece.

Referências

- APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th edition. American Public Health Association. Washington, DC. 1995.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). *Determinação de colifagos em amostras de água*. Método de ensaio L5/225. 24 p. São Paulo, 1990.
- DANIEL, L.A. *Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável*. PROSAB. Coord. Luiz Antonio Daniel. ABES, Rio de Janeiro, 2001. 139 p.
- LANGLAIS, B.; RECKHOW, D.A.; BRINK, D.R. *Ozone in Water Treatment. Application and Engineering*. Lewis Publishers Inc, Chelsea, 1991.

SARTORI, L. *Adequação da qualidade microbiológica de efluentes secundários de esgoto sanitário pela aplicação dos desinfetantes ozônio, permanganato de potássio e ácido peracético*. São Carlos. 2004. 202 f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2004. 202 p.

TYRREL, S.A.; RIPPEY, S.R.; WATKINS, W.D. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. *Wat. Res.* V. 29, n.11, 1995, 2483-2490 p.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) Guidance Manual – Alternative Disinfectants and Oxidants. (1999). Washington, D.C. Report n.815-R-99-014.

VESCHETTI, E; CUTILLI, D.; BONADONNA, L; BRIANCESCO, R; MARTINI, C; CECCHINI, G; ANASTASI, P; OTTAVIANI, M. Pilot-plant comparative of peracetic acid and sodium hypochlorite wastewater disinfection. *Wat. Res.*, v. 37, 2003, p. 78-94.

WHO (World Health Organization). *Water Quality – Guidelines, Standards and Health: Assesment of Risk and Management for Water-Related Infectious Disease*. Water Quality – Guidelines, Standards and Health Assesment. 2002.

ZARPELON, A.; RODRIGUES, E.M. Os trihalometanos na água de consumo humano. *Sanare. Revista Técnica da Sanepar*, v.17, n.17, 2002. p. 20-30.