

## AVALIAÇÃO DO EFEITO DO OZÔNIO NA ELIMINAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ESGOTO

T. M. Passos\*, \*\*, \*\*\*, L. H. M. da Silva \*, \*\*, \*\*\*, L. P. Alves \*, \*\*, \*\*\*, R. A. Zângaro\*, \*\*, \*\*\*,  
C. J. de Lima\*, \*\*, \*\*\*, A. B. Fernandes\*, \*\*, \*\*\*

\* Instituto de Engenharia Biomédica – UNICASTELO, São José dos Campos, Brasil.

\*\* Associação Cidade da Ciência Tecnologia e Educação – CITÉ, São José dos Campos, Brasil.

\*\*\* Centro de Inovação Tecnológica em Saúde – CITS – PqTec, São José dos Campos, Brasil.

e-mail: fernandesabm@gmail.com

**Resumo:** A qualidade da água tornou-se uma questão de saúde pública, havendo a necessidade de um monitoramento rigoroso sobre essa água. As doenças de veiculação hídrica são caracterizadas principalmente pela ingestão de água contaminada por microrganismos patogênicos. A análise bacteriológica identifica possíveis contaminações por microrganismos através da análise de indicadores como a *Escherichia coli*, os Coliformes Totais e Bactérias Heterotróficas. O presente estudo avaliou a eficiência da desinfecção por ozônio de água proveniente de esgoto, verificando a remoção de *Escherichia coli*, Coliformes Totais e Bactérias Heterotróficas. Os resultados obtidos mostraram uma diminuição muito significativa de aproximadamente 90% das Bactérias Heterotróficas e aproximadamente 100% de *Escherichia coli*. Desta maneira, os dados apresentados neste estudo mostraram que o ozônio foi capaz de reduzir significativamente o número de bactérias presentes nas amostras de esgoto.

**Palavras-chave:** Ozônio, *Escherichia coli*, Coliformes Totais, Bactérias Heterotróficas, Esgoto.

**Abstract:** Water quality has become a public health issue, with the need for strict monitoring of the water. The waterborne diseases are characterized mainly by ingestion of water contaminated with pathogenic microorganisms. Bacteriological analysis identifies possible contamination by microorganisms through analysis of indicators such as *Escherichia coli*, the Total Coliform and Heterotrophic Bacteria. The present study evaluated the efficacy of ozone disinfection of water from wastewater, verifying the removal of *Escherichia coli*, Total Coliform and Heterotrophic Bacteria. The results showed a significant decrease of approximately 90% and approximately Heterotrophic Bacteria *Escherichia coli* 100%. Thus, data presented in this study showed that ozone was able to significantly reduce the number of bacteria present in sewage samples.

**Keywords:** Ozone, *Escherichia coli*, total coliform heterotrophic bacteria, wastewater.

### Introdução

A água cobre cerca de 70% da superfície da Terra e é essencial para todas as formas de vida orgânica. É o

recurso mais importante no mundo desde que nenhuma vida pode existir sem ela. Com isto, há necessidade de se avaliar a presença de organismos patogênicos relacionados diretamente às doenças de veiculação hídrica, que são transmitidos basicamente pela via fecal-oral, ou seja, são excretados nas fezes de indivíduos infectados e ingeridos na forma de água ou alimento contaminado por água contaminada. Os padrões de qualidade da água referem-se a um certo número de parâmetros capazes de refletir, direta ou indiretamente, a presença efetiva de algumas substâncias ou microrganismos que possam comprometer a qualidade da água do ponto de vista de sua estética ou salubridade, exigindo-se que a água não contenha patogênicos ou substâncias químicas em concentrações tóxicas ou que possam tornar-se nocivas à saúde pelo uso continuado da água [1].

A pureza bacteriológica é o mais importante parâmetro, pois é ele que determinará a real qualidade da água. *E. coli* é indicador de contaminação fecal do trato intestinal de animais de sangue quente, onde contém um grande número de bactérias que são eliminadas com as fezes. A presença das bactérias do grupo dos coliformes na água significa que há matérias fecais. Usualmente são empregadas bactérias *E. coli* e coliformes totais como indicadores de bactérias, enquanto os colifagos são indicadores da presença de vírus [2].

Os coliformes fecais, mais especificamente *E. coli*, fazem parte da microbiota intestinal do homem e outros animais de sangue quente. Estes microrganismos quando detectados em uma amostra de água fornecem evidência direta de contaminação fecal recente, e por sua vez podem indicar a presença de patógenos entéricos. A análise da água é uma importante ferramenta utilizada por especialistas em saúde pública para a prevenção de inúmeras doenças transmitidas pela água [3].

A espécie *Escherichia coli* é encontrada naturalmente nos tratos intestinais e urinários dos seres humanos, possuem forma de bastonetes e parede celular Gram-Negativa e são anaeróbias facultativas que fermentam lactose, produzindo ácido e gás [4]. Elas são indicadoras de contaminação recente de origem exclusivamente fecal e funcionam como bom indicador de bactérias entéricas de origem humana, vírus e

microrganismos menos resistentes. No meio ambiente, elas podem sobreviver de 2 a 5 meses em reservatórios de água e, em uma bancada de aço inoxidável seca, sobrevive facilmente até 2 meses [5].

Coliformes totais (bactérias do grupo coliforme) são bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a  $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  em 24-48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima  $\beta$  - galactosidase. A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, embora vários outros gêneros e espécies pertençam ao grupo [6].

As bactérias heterotróficas são aquelas que utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono, estando incluídas neste grupo tanto bactérias patogênicas como aquelas pertencentes ao grupo dos coliformes. Entretanto, de acordo com estudos epidemiológicos, foi concluído que na ausência de contaminação fecal não há uma associação direta entre as concentrações de bactérias heterotróficas na água de consumo humano e efeitos à saúde na população geral [7].

As bactérias heterotróficas estão presentes em todos os tipos de água, nos alimentos, no solo, na vegetação e no ar. Sua contagem pode fornecer uma indicação geral sobre a qualidade microbiológica da água tratada, e quando realizada regularmente pode demonstrar alterações devido ao armazenamento (recrescimento, formação de biofilme), eficiência dos métodos de tratamento, integridade e limpeza do sistema de distribuição [8].

Atualmente, está em vigor a portaria nº 518/2004, a qual estabelece a contagem de bactérias heterotróficas para verificar a qualidade da água para consumo humano, sendo que a contagem padrão de bactérias heterotróficas não deve exceder a 500 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) [9].

Em particular os países “em desenvolvimento”, possuem uma política de saneamento precária, com isto o risco de epidemias adquiridas pelo contato com águas contaminadas é frequente, o que é alarmante. Portanto, é de extrema importância produzir processos de tratamento, para esgoto doméstico e assim ter uma água livre de microrganismo e patógenos. Para os padrões de qualidade de água, o monitoramento da quantidade de microrganismos é primordial. Entre os microrganismos indicadores de contaminação estão as bactérias *Escherichia coli*, os coliformes totais e as bactérias heterotróficas. A *E.coli* é utilizada como um potencial indicador de contaminação de água, ela pode causar diarreia, infecções urinárias em indivíduos que ingerir esta água contaminada.

O ozônio por se caracterizar como forte agente oxidante é aplicado no controle de odor e oxidação química. A ação antimicrobiana do ozônio é decorrente do ataque através da oxidação dos glicolipídios, glicoproteínas e aminoácidos da parede e membrana celulares microbiana, alterando a permeabilidade celular

e causando sua rápida lise e inibição da atividade respiratória e reprodutiva dos microrganismos [10,11].

O diferencial do presente estudo se deve ao fato de avaliarmos amostras de água de reuso (água de esgoto sem o material sólido particulado), provenientes de uma Estação de Tratamento de Esgoto da cidade de São Paulo. Neste sentido, devido à escassez dos recursos hídricos, é imperativo o desenvolvimento de alternativas com intuito de reutilizar a água e minimizar esta problemática. Cabe ressaltar que não há uma legislação no Brasil que especifique os padrões de qualidade da água de reuso que é revendida pelas empresas de saneamento. Desta maneira, o presente estudo teve como finalidade básica avaliar a eficácia do ozônio na eliminação de *Escherichia coli*, Coliformes totais e Bactérias Heterotróficas em amostras de água de reuso.

## Materiais e métodos

**Coletas das amostras** – As águas foram coletas em uma Estação de Tratamento de Esgoto de São Paulo. A água foi adquirida no setor de Sistema de Lodos Ativados denominado Decantador Secundário, trata-se de um esgoto, já que somente o material particulado sólido foi retirado e água não foi submetida a nenhum tipo de tratamento com compostos químicos ou físicos (filtros).

A água coletada foi armazenada em frascos estéreis e encaminhada imediatamente para Universidade Camilo Castelo Branco em São José dos Campos, onde foram realizados os tratamentos de desinfecções.

**Desinfecção com ozônio** – No presente estudo foi utilizado o gerador de ozônio marca Ozone & Life (modelo O&L 1.5M) de potência de 80 W, que foi conectado a um cilindro de oxigênio através de uma válvula de controle de fluxo (Flow control Valve). As dosagens de aplicação da borbulha do gás  $\text{O}_3 + \text{O}_2$  na água contaminada acondicionada em vasilhame de vidro estéril no volume de um litro, foi feita em função do ajuste de concentração de ozônio a partir do gerador em mg por litro (mg/L), e o tempo de atuação em minutos (min.) (Tabela 1).

Tabela 1: Dosagens de ozônio utilizadas nos experimentos de desinfecção.

Concentração de $\text{O}_3$	Dosagem = Concentração de $\text{O}_3 \times$ Tempo de exposição (mg.min.L <sup>-1</sup> )		
	Ozônio 21 mg/L	63	84

**Metodologia utilizada para identificação de *E. coli*, Coliformes totais e Bactérias Heterotróficas** – As técnicas utilizadas para realizar os exames bacteriológicos basearam-se nos métodos *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, mais especificamente os métodos SWEWW, 9215B e o SWEWW, 9223B.

**Determinação de Coliformes Totais e *E. coli* via teste com substrato cromogênico e fluorogênico** –

Para coliformes totais, foi utilizado o ONPG (Orto Nitrofenil  $\beta$ -D Galactopiranosídeo), que atua como um sistema nutriente indicador, sendo usado para detectar a enzima  $\beta$ -D galactosidase, que é produzida por todos os coliformes. Essa enzima hidrolisa a molécula de ONPG liberando sua substância cromogênica amarela, sendo essa coloração a indicação de um resultado positivo para coliformes totais no intervalo de 24 a 28 horas. Este procedimento também pode ser utilizado para detecção simultânea de *E. coli*; para tanto, incorporou-se na composição do meio o substrato MUG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D glucuronide), o qual é hidrolisado pela *E. coli*, através de sua enzima glucoronidase, sendo liberado o 4-methylumbelliferone que, quando exposto à luz ultravioleta (366nm), apresenta fluorescência difusível de cor azul brilhante.

**Determinação de Bactérias Heterotróficas via técnica pour plate** – Para contagem de bactérias heterotróficas foi realizado o plaqueamento em profundidade de 1 mL da amostra e 1 mL das diluições 10-1 e 10-2 utilizando-se Ágar Padrão para Contagem (PCA) (Merck®) em placas de Petri devidamente esterilizadas e identificadas, em duplicata. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 2$  horas. A leitura foi realizada com o auxílio de um contador de colônias modelo CP 600 Plus, marca Phoenix®, e calculou-se o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de acordo com a diluição [11, 12].

## Resultados

A Tabela 2 apresenta os dados referentes ao efeito do ozônio na eliminação de Bactérias Heterotróficas, Coliformes Totais e *Escherichia coli*, presentes nas amostras de água. De acordo com estas informações é possível notar o ozônio reduziu significativamente o número de UFC das bactérias Heterotróficas e de *E. coli* presentes nas amostras de água. Em contra partida, as dosagens de ozônio que foram utilizadas nestes ensaios, não foram capaz de eliminar os Coliformes Totais (bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*).

Tabela 2: Resultados com tratamento de ozônio para Bactérias Heterotróficas, Coliformes Totais e *E. coli*.

Parâmetros Biológicos	Água sem Tratamento	63 mg.min. L-1*	84 mg.min. L-1*	105 mg.min. L-1*
Bactérias Heterotróficas	Incontáveis	54 UFC	11 UFC	17 UFC
Coliformes Totais	>1600 UFC**	>1600 UFC	>1600 UFC	>1600 UFC
<i>Escherichia coli</i>	>1600 UFC	20 UFC	10 UFC	5,6 UFC

\*Dosagem de ozônio (mg.min.L<sup>-1</sup>).

## Discussão

O uso do ozônio com o intuito de eliminar Bactérias Heterotróficas e *Escherichia coli* presente na água, mostrou-se muito eficiente tendo uma redução extremamente significativa após o tratamento. A partir da dosagem de ozônio a 84 mg.min.L<sup>-1</sup>, obteve-se uma redução de bactérias heterotróficas de aproximadamente 90%, enquanto que com a dosagem de 105 mg.min.L<sup>-1</sup>, houve uma redução de aproximadamente 100% de *Escherichia coli* presente nas amostras de água. Estes dados demonstram a eficiência do tratamento com ozônio e seu potencial microbicida.

Em relação aos Coliformes Totais, a partir do protocolo utilizado neste estudo, não foi possível detectar a eliminação destas bactérias presentes nas amostras de água. Um fator determinante neste caso se deve ao fato de que a água que foi utilizada é altamente contaminada e apresentavam uma grande quantidade de coliformes totais (>1600 UFC). Com base nos resultados obtidos em relação às bactérias heterotróficas e *E. coli*, acredita-se que houve uma redução dos coliformes totais, porém não conseguimos detectar devido a contaminação intensa da água. Neste caso, para resolver este problema poderia ser utilizada uma dosagem de ozônio maior para melhorar a eficiência do processo.

Pereira *et al.* compararam o efeito de diferentes gases, gás carbônico e hélio à concentração de 99,99% e ozônio à concentração de 0,4%, sobre o crescimento de diversas cepas bacterianas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) num estudo *in vitro* e concluíram que o ozônio promoveu a esterilização de 100% das espécimes [13].

Há várias teorias que tentam desvendar como o ozônio atua nas bactérias, sendo que as que possuem maior embasamento são aquelas que correlacionam a alta oxidação do gás sobre as cadeias ácido-lipídicas da parede celular, matando rapidamente os microrganismos [14]. Presume-se que o ataque primário do ozônio acontece na parede celular e, após a sua difusão, no interior da célula, onde ao recombinar-se com elementos citoplasmáticos, oxida aminoácidos e ácidos nucléicos [15]. As bactérias, fungos e vírus não possuem sistemas complexos de reparo a estruturas nobres, tais como o

DNA e RNA, portanto o ozônio reage com tais cadeias, clivando-as, impedindo a replicação celular e produção de aminoácidos, levando o organismo à desnaturação e morte [16].

Soares (2007), afirma que a ozonização é muito eficiente para desinfetar efluentes de águas residuárias domiciliares quanto à inativação de coliformes totais e fecais [17].

Santos (2011) verificou que em uma concentração de ozônio de 10 mg/L, teve uma inativação de Coliformes Totais de 3,0 Log e uma inativação de >4,6 log para *Escherichia coli* [18].

Sartori (2007) obteve em seus estudos uma inativação de 3 Log para *Escherichia coli*, em uma concentração de 180 mg.min/L [19].

Atualmente no Brasil, não há uma legislação que especifique os padrões de qualidade da água de reuso que é revendida pelas empresas de saneamento, e com a escassez dos recursos hídricos, se torna imperativo o desenvolvimento de alternativas com intuito de reutilizar a água e minimizar esta problemática. Neste sentido, este estudo ressaltou a importância de se aplicar a dose ideal de Ozônio com o intuito de eliminar eficientemente as bactérias presentes nestas amostras de água. Assim, em trabalhos futuros pretendemos estabelecer protocolos eficientes para o tratamento específico de água de reuso.

## Conclusão

A eficácia do ozônio para eliminar Bactérias Heterotróficas e *Escherichia coli* foi confirmada neste estudo, já que foi capaz de eliminar aproximadamente 90% das Bactérias Heterotróficas e aproximadamente 100% de *Escherichia coli*.

## Referências

- [1] Rebouças A C. Águas doces no Brasil. Escritura editora: São Paulo; 2002.
- [2] Daniel L A. Processos de Desinfecção e Desinfetantes Alternativos na Produção de água Potável. PROSAB. São Carlos; 2001.
- [3] Pope ML, et al. Assessment of the Effects of Holding Time and Temperature on *Escherichia coli* Densities in Surface Water Samples. *Appl. Environ Microbiol.* 2003; 69(10): 6201-07.
- [4] Almeida AA, et al. Genotypes analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. *J Eukaryot Microbiology.* 2006; 53:177-78.
- [5] Soares L V. Ozonização de esgoto sanitário: estudo da hidrodinâmica, transferência de massa e inativação de microrganismos indicadores [tese]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2007.
- [6] FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Manual Prático de Análise de água. Brasília; 2006.
- [7] Baltram J, et al. Heterotrophic plate counts and drinking water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. Londres: WHO:IWA.Expert Consensus. Expert meeting group; 2003.
- [8] WHO - World Health Organization. Guidelines for drinking water quality. Nottingham, 2003. Chapter 7. Draft. Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/guidelines/3rd/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/3rd/en/)>. Acesso em: 20 set. 2012.
- [9] BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria MS nº 518/2004. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2005.
- [10] Medeiros RC. Comparação da resistência de protozoários patogênicos, *Giardia spp* e *Cryptosporidium spp.* e de microrganismos indicadores à desinfecção sequencial cloro-irradiação ultravioleta e ozônio-irradiação ultravioleta [dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2010.
- [11] Kim JG, Yousef A E, Chism G W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. *Journal of Food Safety.* New Brunswick. 1999; 19:17-34.
- [12] Silva N, et al. Manual de métodos de análise microbiológica de água. São Paulo: Livraria Varela; 2005.
- [13] Pereira MMS, et al. Efeito de diferentes gases sobre o crescimento bacteriano: Estudo in vitro. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.* 2005; 32(1):12-4.
- [14] Dähnhardt JE, Jaeggi T, Lussi A. Treating open carious lesions in anxious children with ozone: A prospective controlled clinical study. *American Journal of Dentistry.* 2006; 19(5):267-70.
- [15] Velano HE, et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. *Pesquisa Odontológica Brasileira.* 2001; 15(1):18-22.
- [16] Sunnen GV. Ozone in medicine: overview and future directions. *Journal of Advancement in Medicine.* 1988; 1(3): 159-74.
- [17] Soares L V. Ozonização de esgoto sanitário: estudo da hidrodinâmica, transferência de massa e inativação de microrganismos indicadores [tese]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2007.
- [18] Santos E. Resistência de cistos de *Giardia spp.*, Coliformes totais e *Escherichia coli* às desinfecções sequenciais cloro-irradiação ultravioleta e ozônio-irradiação ultravioleta [dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2011.
- [19] Sartori L. Avaliação da presença de microrganismos patogênicos no rio Monjolinho (SP) e a resistência aos desinfetantes combinados ozônio-irradiação ultravioleta, ácido peracético-irradiação ultravioleta e cloro-irradiação ultravioleta [dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2007.