

ENDOSPOROS BACTERIANOS COMO INDICADORES DA EFICIÊNCIA DE DESINFECÇÃO DA PRÉ-OXIDAÇÃO DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

Ana PINA¹; José MENAIA²; Laura MONTEIRO³; Nuno MARTINS⁴; Rosário COELHO⁵; Dulce LOURENÇO⁶; Regina VINHAS⁷; Helena LUCAS⁸

RESUMO

A garantia da segurança microbiológica da água distribuída ao consumidor assenta na utilização de barreiras à passagem de agentes patogénicos, da captação à torneira do consumidor. Destas, a pré-oxidação com ozono é das mais eficazes. A eficiência dos processos de desinfecção é hoje avaliada recorrendo a organismos indicadores (*e.g.*, *Escherichia coli*) cuja sensibilidade aos oxidantes é superior à de muitos agentes patogénicos. Assim, mesmo uma inactivação total destes indicadores está longe de significar uma eliminação satisfatória dos agentes patogénicos mais resistentes. Por esta razão têm sido propostos indicadores alternativos (*e.g.*, bacteriófagos, endosporos). Destes, os endosporos de bactérias aeróbias são mais vantajosos, por serem muitíssimo resistentes aos desinfectantes, não serem patogénicos, ocorrerem em grande número na natureza e serem fácil e economicamente analisados.

Neste estudo foi testada a viabilidade da utilização de endosporos de bactérias aeróbias como indicadores da eficiência de desinfecção com ozono. Foram sistematicamente quantificados endosporos em pequenos volumes de água bruta e ozonizada. Observaram-se taxas de inactivação de endosporos entre 0,39 log e 1,61 log, em função da temperatura da água.

Foi demonstrada a viabilidade e utilidade do uso de endosporos na avaliação da eficácia da pré-oxidação como barreira à passagem de agentes patogénicos resistentes.

Palavras-chave: ETA, desinfecção, pré-oxidação, endosporos, saúde pública.

1- Engenheira Biotecnóloga, Técnica de Tratamento de Água, Águas do Algarve, S.A.

2 - Doutor em Ciências e Engenharia do Ambiente, Chefe do Laboratório de Engenharia Sanitária do LNEC

3 - Engenheira Biológica, Bolseira de Investigação no Laboratório de Engenharia Sanitária do LNEC

4 – Engenheiro Alimentar, Técnico Responsável de Tratamento de Água, Águas do Algarve, S.A.

5 – Bióloga, Ph.D., Responsável de Laboratório, Águas do Algarve, S.A.

6 – Mestre em Ecologia, Gestão e Modelação dos Recursos Marinhos, Técnica Responsável de Microbiologia, Águas do Algarve, S.A.

7- Bióloga, Responsável da Unidade Laboratorial do Sotavento, Águas do Algarve, S.A.

8 - Engenheira do Ambiente, Directora de Operações, Águas do Algarve, S.A.

1. INTRODUÇÃO

A garantia da segurança microbiológica da água distribuída ao consumidor assenta na utilização de múltiplas barreiras à passagem de patogénicos, desde a captação à torneira do consumidor. Destas barreiras, a pré-oxidação (e.g., ozono, dióxido de cloro) nas Estações de Tratamento de Água (ETA) é uma das mais eficazes (LECHEVALLIER e AU (2004)).

O necessário controlo da eficácia de desinfecção da pré-oxidação é feito com base na determinação da eficiência de inactivação de microrganismos indicadores nesta etapa do tratamento. Contudo, os indicadores que hoje são para tal utilizados são bactérias (e.g., coliformes, *Escherichia coli*, heterotróficos totais) cuja sensibilidade aos desinfectantes químicos é muitíssimo menor que a de muitos agentes patogénicos. Assim, mesmo a observação duma eficiência de 100% na inactivação de microrganismos indicadores está longe de garantir que tenha também ocorrido qualquer eliminação significativa de agentes patogénicos mais resistentes aos oxidantes (e.g., *Mycobacterium* spp., enterovírus, oocistos de *Cryptosporidium*) (PAYMENT e FRANCO (1993)).

Por esta razão, bacteriófagos e endosporos bacterianos foram propostos como indicadores alternativos aos que são correntemente utilizados (PAYMENT e FRANCO (1993)), dada a sua maior resistência aos desinfectantes químicos.

Contudo, os bacteriófagos propostos são vírus que infectam especificamente *E. coli* (e.g., colifagos MS2 e F-específicos) e que, portanto, só são encontrados em águas com contaminação fecal. Por esta razão na prática normal a sua utilização requer que sejam adicionados à água em teste, em quantidades que permitam a sua detecção e quantificação na água pré-oxidada.

Para além da maior simplicidade e mais baixo custo na sua análise, os endosporos apresentam a vantagem de ser as formas biológicas mais resistentes aos oxidantes químicos (figura 1). São mais resistentes do que os colifagos (HUERTAS *et al.* (2003)) e do que os agentes patogénicos mais resistentes (e.g., oocistos de *Cryptosporidium*).

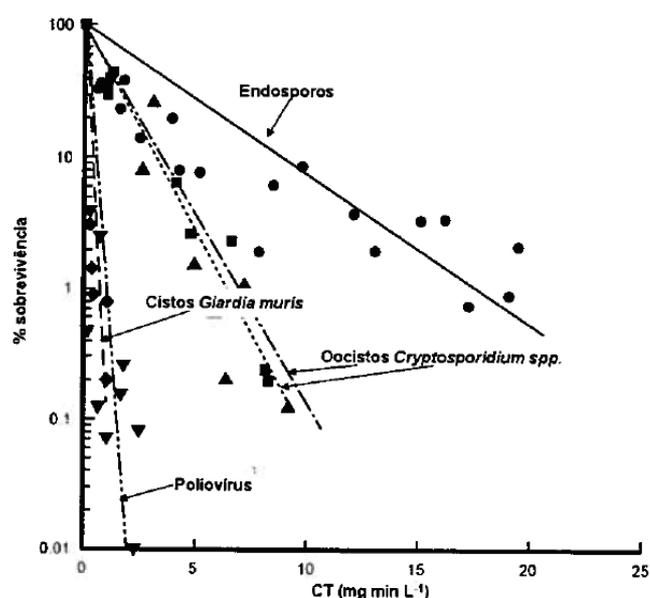


Figura 1 – Resistência dos endosporos ao ozono relativamente a agentes patogénicos que podem ocorrer na água (adaptado de RICE (2001)).

Dos endosporos, foram propostos como indicadores da eficiência de desinfecção os que são formados por *Clostridium perfringens* e por outros clostrídios sulfito redutores (PAYMENT e FRANCO (1993)) e os de bactérias aeróbias (RICE *et al.* (1996)).

Porém, a presença de endosporos de bactérias anaeróbias (*e.g.*, *C. perfringens*) pressupõe, também, a previa contaminação da água com fezes humanas ou animais. Este facto e a impossibilidade de poderem ser adicionados à água como traçadores, uma vez que da sua germinação resultam bactérias patogénicas, limita o seu uso.

Pelo contrário, os endosporos aeróbios (*e.g.*, *Bacillus spp.*) para além de serem desprovidos de patogenicidade, terem uma resistência aos desinfectantes químicos similar à dos endosporos anaeróbios e superior (FACILE *et al.* (2000)) à dos agentes patogénicos mais resistentes ao ozono (*e.g.*, oocistos de *Cryptosporidium*), ocorrem no ambiente em grande número (FACILE *et al.* (2000)).

Estas razões e o facto destas terem sido demonstradas por estudos à escala piloto e real (RICE *et al.* (1996)), levaram a que utilização de endosporos aeróbios fosse reconhecida pela Organização Mundial de Saúde, pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD-WHO (2003)) e pela Agência Americana para a Protecção do Ambiente (USEPA (2006)) como sendo os indicadores mais fiáveis para determinar a eficácia da pré-oxidação como barreira à passagem de agentes patogénicos.

A Águas do Algarve, S.A. desenvolve estudos à escala real sobre a utilização de endosporos aeróbios na avaliação da eficácia da pré-oxidação como barreira à passagem de agentes patogénicos resistentes à desinfecção (*e.g.*, enterovírus, oocistos de *Cryptosporidium spp.*). Estes estudos, que têm a coordenação do Laboratório Nacional de Engenharia Civil, visam, numa primeira fase, comprovar a viabilidade do método. Espera-se em fases subseqüentes implementar e validar o uso dos endosporos como indicadores da eficiência de desinfecção da pré-oxidação em todas as ETA do Algarve.

Nesta comunicação apresentam-se os resultados obtidos da primeira fase dos estudos para avaliação da viabilidade e praticabilidade do método.

2. METODOLOGIA

2.1 Parâmetros microbiológicos

Foram quantificados os endosporos de bactérias aeróbias e os heterotróficos totais (HT) em amostras de água da ETA de Beliche (água bruta e pré-oxidada).

As amostras foram colhidas para recipientes esterilizados e imediatamente transportadas em mala térmica refrigerada para a Unidade Laboratorial do Sotavento, na ETA de Tavira, onde foram imediatamente analisadas.

Na quantificação dos endosporos seguiu-se o método definido no Standard Methods (APHA (2005)). A análise de HT foi feita a 22°C pelo método das membranas filtrantes, de acordo com a norma ISO 6222:1999.

Todos os ensaios microbiológicos foram feitos em triplicado, sendo os resultados apresentados a média dos valores obtidos.

2.2 Parâmetros físico-químicos

Dada a sua potencial influência na eficiência de desinfecção (LECHEVALLIER e AU (2004)), procedeu-se à monitorização da turvação, pH e temperatura da água.

Em todas as amostras colhidas determinou-se no local a temperatura, com termómetros digitais calibrados entre os 5°C e os 30°C de acordo com o método definido no Standard Methods (APHA (2005)).

Todos os outros parâmetros, pH, turvação e ozono residual, foram determinados na Unidade Laboratorial do Sotavento, na ETA de Tavira.

As determinações do pH e da turvação foram efectuadas de acordo com o método definido no Standard Methods (APHA (2005)), com o equipamento Crison Compact Titrator e com o turbidímetro HACH 2100 NA, respectivamente. A temperatura, pH e turvação são parâmetros acreditados no laboratório das Águas do Algarve.

As leituras da concentração de ozono residual foram realizadas de acordo com o definido no Standard Methods (APHA (2005)), com o espectrofotómetro HACH DR 2010.

2.3 Estudo à escala real

As taxas de inactivação de endosporos e HT, bem como a influência dos parâmetros físico-químicos da água sobre as mesmas, foram estimadas com base na diferença entre as concentrações destas formas microbianas na água afluente e efluente à cisterna de contacto da ETA de Beliche.

Seguindo o procedimento prescrito pela USEPA (USEPA (2003)), a dose (CT_{10} (mg/L · min)) realmente aplicada de desinfectante foi estimada tomando-se como concentração (C) a do ozono residual na água efluente da cisterna e como tempo de contacto (T) o valor de T_{10} , que foi calculado com base na equação 1:

$$T_{10} = T_{RH} \cdot F \quad (1)$$

Em que T_{RH} é o valor nominal do tempo de residência hidráulica para o caudal medido e F é um factor de correcção relativo às condições de mistura na cisterna e que é usado para corrigir o efeito de trajectos preferenciais.

O valor de 0,5 foi adaptado para F dado ser o que, de entre os tabelados (USEPA (2003)), melhor corresponde à geometria e condições de mistura da cisterna de ozonização da ETA de Beliche.

As taxas de inactivação são expressas na forma de “log de remoção” (log rem), ou seja da diferença entre os logaritmos decimais da concentração de HT ou endosporos na água bruta e na água pré-oxidada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantificação de endosporos

A viabilidade do uso de endosporos como indicadores depende em primeiro lugar da ocorrência destes na água bruta em número que possibilite a sua contagem em amostras colhidas antes e após a pré-oxidação. Para além disso, para que o método seja praticável em rotina é necessário que para o efeito possam ser utilizadas amostras de água com um volume que dispense a necessidade de concentração da amostra.

No quadro 1 sintetizam-se os resultados obtidos da análise de HT e endosporos em amostras de água bruta com um volume igual ou inferior a 50 mL.

Quadro 1 – Concentração (/100 mL) de heterotróficos totais e endosporos na água bruta.

	ETA de Beliche	
	HT	Endosporos
Número de amostras	18	18
Concentração média	12506	154
Concentração mínima	5200	78
Concentração máxima	28200	253

Na água bruta da ETA de Beliche, foram detectados endosporos e HT em teores significativos. Na totalidade das amostras as concentrações de endosporos na água bruta eram de ordem a permitir a sua quantificação na água ozonizada até ca. 4 log rem, ao contrário de HT que não foram detectados na quase totalidade das amostras de água ozonizada.

Os resultados obtidos indicam, portanto, que os endosporos aeróbios ocorrem na água bruta da ETA estudada, e presumivelmente também nas restantes ETA da Águas do Algarve, S.A., a teores que asseguram a sua viabilidade como indicadores da eficiência de desinfecção da pré-oxidação.

3.2 Inativação de heterotróficos e endosporos pela ozonização

A inativação de endosporos e HT pela pré-oxidação com ozono foi estudada na ETA de Beliche. Os resultados obtidos apresentam-se no quadro 2 e na figura 2.

Quadro 2 – Inativação de endosporos e de HT durante a pré-oxidação com ozono.

Amostra	HT				Endosporos			
	AB	AO	log rem	%	AB	AO	log rem	%
20-10-2008	21500	400	1,73	98,14	224	13	1,25	94,43
22-10-2008	28200	700	1,61	97,52	127	4	1,50	96,84
27-10-2008	24500	0	-	100,00	171	10	1,23	94,16
29-10-2008	20300	0	-	100,00	126	8	1,22	93,93
03-11-2008	16500	0	-	100,00	131	4	1,55	97,20
05-11-2008	7200	0	-	100,00	140	4	1,58	97,38
10-11-2008	15100	0	-	100,00	149	4	1,61	97,54
12-11-2008	13100	200	1,82	98,47	131	8	1,23	94,15
17-11-2008	10200	0	-	100,00	105	14	0,86	86,35
19-11-2008	8900	0	-	100,00	78	14	0,76	82,55
24-11-2008	5900	0	-	100,00	168	23	0,87	86,53
26-11-2008	12200	0	-	100,00	80	23	0,54	71,25
02-12-2008	9600	0	-	100,00	235	34	0,84	85,53
03-12-2008	11000	0	-	100,00	250	81	0,49	67,60
09-12-2008	9600	0	-	100,00	155	50	0,49	67,53
10-12-2008	7800	0	-	100,00	87	35	0,39	59,23
15-12-2008	7700	0	-	100,00	253	50	0,70	80,20
16-12-2008	5200	0	-	100,00	170	58	0,47	66,08

AB e AO - concentrações (/100 mL) de HT ou endosporos na água bruta e ozonizada, respectivamente.

Ao contrário do que se passou com HT, que na maior parte dos dias foram completamente eliminados (quadro 2 e figura 2), da ozonização resultou uma redução quantificável de endosporos.

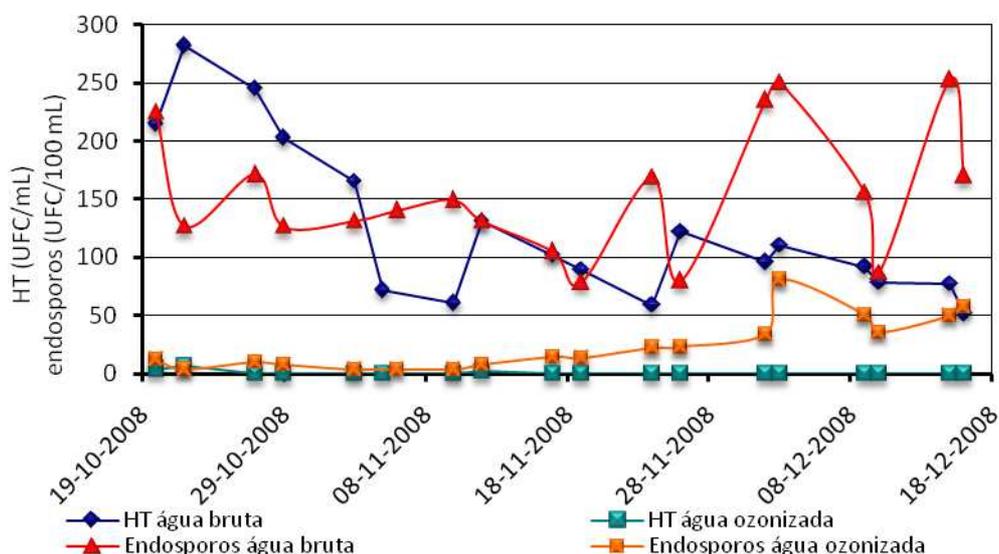


Figura 2 – Concentração de heterotróficos totais e endosporos aeróbios na água bruta e ozonizada da ETA de Beliche.

Estes resultados, para além de evidenciarem a impossibilidade da utilização de HT como indicadores da eficiência de inactivação dos agentes patogénicos resistentes à desinfectação química (e.g., oocistos de *Cryptosporidium*), confirmam a adequação e a viabilidade do uso de endosporos aeróbios com esta finalidade.

3.3 Influência de parâmetros físico-químicos

Durante o período de estudo (três meses) observaram-se variações na eficiência de inactivação de endosporos, na CT aplicada e nos valores de parâmetros físico-químicos da água bruta afluyente à ETA de Beliche (quadro 3).

Quadro 3 – Resumo dos dados obtidos no período de estudo

	Log Remoção Endosporos	CT ₁₀ (mg · min/L)	T (°C)	Turvação (NTU)	pH
Média	1,0	3,37	15,9	1,3	7,4
Minímo	0,4	2,00	12,9	0,8	7,2
Máximo	1,6	5,21	19,1	2,0	7,6
Desvio Padrão	0,4	0,80	2,1	0,4	0,1

A eficiência da desinfectação é função da CT aplicada de acordo com a lei de Chick-Watson:

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kCT \quad (2)$$

Em que N_0 e N são respectivamente o número inicial e final de microrganismos, e k é a constante cinética da reacção, que é específica de cada forma microbiana, de cada desinfectante e depende da temperatura.

O pH e a turvação da água são outros dos parâmetros que podem influenciar a taxa de inactivação de microrganismos por oxidantes químicos (LECHEVALLIER e AU (2004)).

As variações do pH da água bruta da ETA de Beliche (quadro 3) não foram de ordem a afectar a eficiência da desinfectação (LECHEVALLIER e AU (2004)).

3.3.1 Influência da Temperatura

Como a figura 3 sugere, a taxa de inactivação de endosporos decresceu com a diminuição da temperatura da água, que baixou gradualmente ao longo do período de estudo.

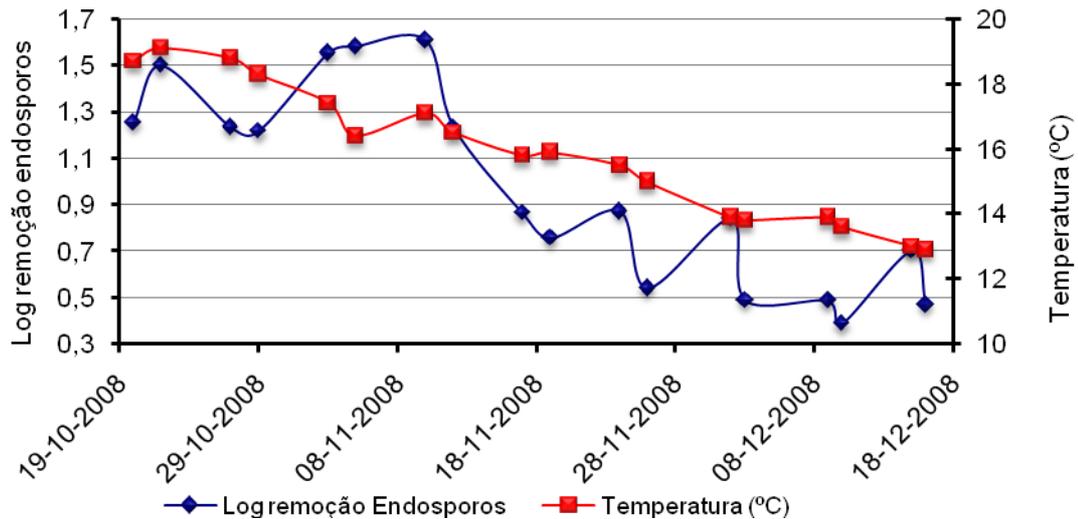


Figura 3 – Evolução da temperatura da água e da taxa de inactivação de endosporos.

Para isolar o efeito da temperatura de eventuais influências da turvação e de variações da CT_{10} aplicada, foram apenas consideradas neste estudo as amostras para as quais os valores da turvação e da CT não se afastavam em mais de um desvio padrão (0,4 NTU; 0,8 mg.min/L) do valor médio encontrado para o mesmo parâmetro (1,3 NTU; 3,37 mg.min/L).

À semelhança das outras reacções químicas e do publicado para estudos à escala laboratorial (DRIEDGER *et al.* (2001); LARSON *et al.* (2003)), a influência da temperatura sobre a taxa de inactivação de endosporos na pré-oxidação na ETA de Beliche foi satisfatoriamente descrita pela equação de Arrhenius:

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (3)$$

Em que k é a taxa a que ocorre a reacção, A é o factor de frequência, E_a é a energia de activação, R é a constante dos gases perfeitos e T é a temperatura absoluta.

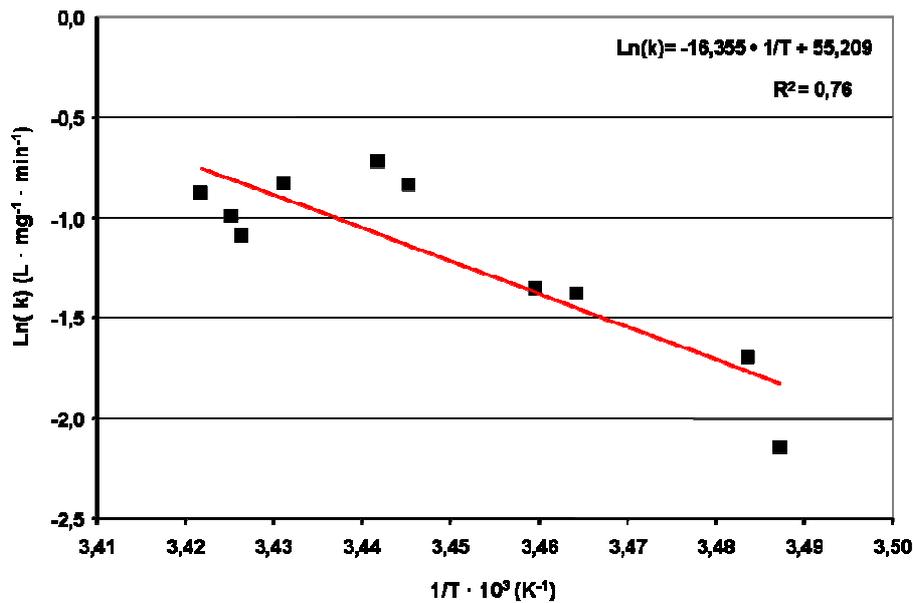


Figura 4 – Taxa de inativação de endosporos em função da temperatura da água bruta.

Assim, e dada a amplitude sazonal da temperatura da água bruta da ETA de Beliche, é de esperar que a eficiência da inativação de endosporos varie significativamente em função deste parâmetro.

Com a equação de Chick-Watson (eq. (2)) estimou-se o efeito da temperatura na eficiência de remoção de endosporos por uma CT_{10} típica da ETA de Beliche (3,37 mg · min/L). Para o efeito estimaram-se os valores da eficiência de remoção a partir da equação da recta obtida da regressão linear apresentada na figura 4.

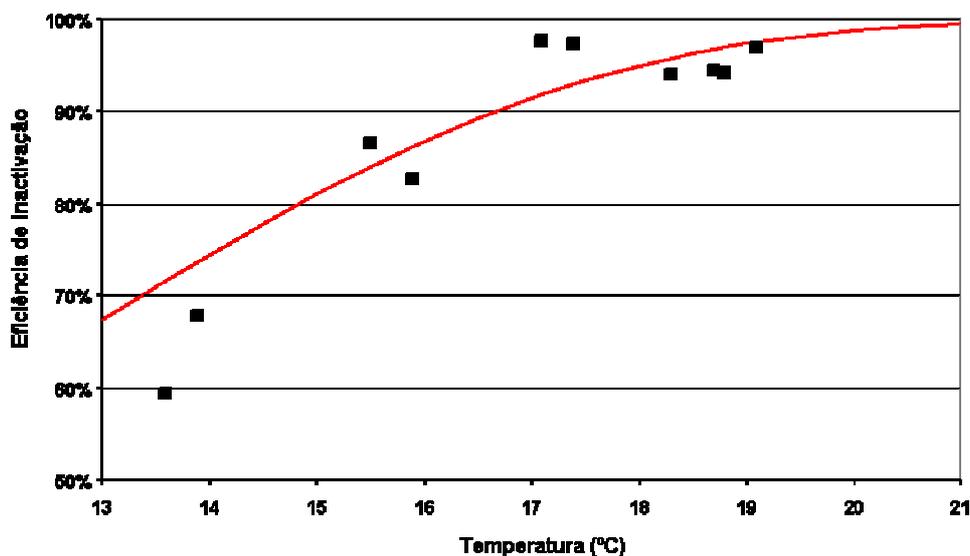


Figura 5 – Valores observados (■) e estimados (—) para a eficiência de inativação de endosporos na gama de temperaturas da água bruta da ETA de Beliche.

Como a figura 5 mostra, para uma mesma CT_{10} a eficiência de inactivação de endosporos pela pré-oxidação na ETA de Beliche depende muito significativamente da temperatura da água. Para as temperaturas de 13,6°C e 19,1°C, foram respectivamente observadas eficiências de 59% (0,39 log rem) e de 97% (1,5 log rem), o que representa uma diferença de 38%. Esta amplitude é ligeiramente maior do que a teoricamente estimada (32%) para os dias em que a água está mais fria (ca. 13°C) e mais quente (ca. 21°C).

Embora ainda com carácter preliminar, estes resultados põem em evidência a importância do efeito da temperatura para a gestão operacional da pré-oxidação, tanto no que se refere à eficácia do processo como barreira à passagem de agentes patogénicos, como à prescrição das CT em função da temperatura da água bruta e, conseqüentemente também no que se refere a gastos energéticos, custos e controlo da formação de sub-productos.

3.3.1 Influência da Turvação

No período de estudo a turvação foi fraca em intensidade e amplitude (0,8 NTU a 2,0 NTU). Mesmo assim, pesquisou-se a existência duma eventual influência deste parâmetro sobre a eficiência de inactivação de endosporos pelo ozono. Para tal os valores observados de eficiência foram comparados com os estimados em função da temperatura da água e da CT_{10} correspondentes. Como se pode inferir da figura 6, em que se apresentam os desvios da eficiência observada em relação à teórica para águas com diferente turvação, não foi encontrada qualquer relação entre a intensidade da turvação e os desvios encontrados.

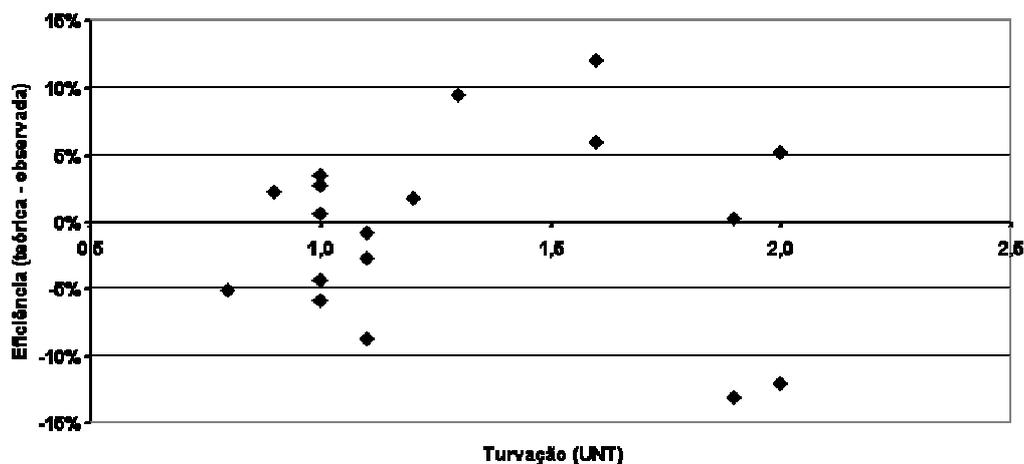


Figura 6 – Desvios dos valores de eficiência observados em relação aos teóricos.

Estes resultados mostram que para a gama estudada de turvação não é de esperar que este parâmetro tenha uma influência significativa sobre a inactivação de endosporos na pré-oxidação com ozono.

4. CONCLUSÕES

Ao demonstrarem a viabilidade e a praticabilidade da utilização de endosporos aeróbios como indicadores da eficiência da desinfecção da pré-oxidação, os resultados obtidos abriram caminho para a aplicação pela Águas do Algarve, S.A. do conhecimento científico actual à monitorização segura da

eficácia da pré-oxidação como barreira à passagem de agentes patogénicos resistentes (e.g., enterovírus, oocistos de *Cryptosporidium*).

Os conhecimentos e dados produzidos sobre os parâmetros (CT_{10} , temperatura, turvação), taxa e eficiência de inativação de agentes biológicos resistentes, são da máxima importância prática para a implementação da metodologia.

Assim, para além de garantir a segurança microbiológica da água, o uso de endosporos permite também estimar com segurança as concentrações de oxidante (C) a aplicar nas várias condições de operação (e.g., caudal, temperatura, turvação). Deste modo, o uso destes indicadores, que não envolve metodologias sofisticadas ou aumento de custos, tem também consequências na gestão da pré-oxidação, nomeadamente no relativo a gastos energéticos, custos e controlo da formação de sub-produtos.

Espera-se que nas suas fases subsequentes os estudos em curso venham possibilitar à Águas do Algarve, S.A. usufruir a curto prazo destes benefícios.

BIBLIOGRAFIA

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA) & WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF) – *Standard Methods for Examination of Water and Waste Water*, Washington DC (EUA), APHA, AWWA & WEF, 2005.

DRIEDGER, A.; ERNÖ, S.; PINKERNELL, U.; MARIÑAS, B.K; KÖSTER, W.; GUNTEN, U.V. – “Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores and Formation of Bromate During Ozonation”. *Water Research*, **35**, 2001, pp. 2950 - 2960.

FACILE, N.; BARBEAU, B.; PRÉVOST, M.; KOUDJONOU, B. - “Evaluating Bacterial Aerobic Spores as a Surrogate for *Giardia* and *Cryptosporidium* Inactivation by Ozone”. *Water Research*, **34**, 2000, pp. 3238 - 3246.

HUERTAS, A.; BARBEAU, B.; DESJARDINS, C.; GALARZA, A.; FIGUEROA, M.A.; TORANZOS, G.A. - “Evaluation of *Bacillus subtilis* and coliphage MS2 as indicators of advanced water treatment efficiency”. *Water Science & Technology*, **47**, 2003, pp. 255 - 259.

LARSON, M.; MARINAS, B. – “Inactivation of *Bacillus subtilis* spores with ozone and monochloramine”. *Water Research*, **37**, 2003, pp. 833–844.

LECHEVALLIER, M. W.; AU, K.K. - *Water Treatment and Pathogen Control – Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water*. London, UK. World Health Organization by IWA Publishing, 2004.

OECD - WHO - *Assessing Microbial Safety of Drinking Water improving approaches and methods*. London (Reino Unido), IWA Publishing, 2003.

PAYMENT, P.; FRANCO, E. – “*Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts”. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 1993, pp. 2418 - 2424.

RICE, E.W.; FOX, K.R.; MILTNER, R.J.; LYTLE, D.A.; JOHNSON, C.H. – “Evaluating plant performance with endospores”. *Journal of American Water Works Association*, **88**, 1996, pp. 122 - 130.

RICE, E. (2001) Disinfection. In USEPA Controlling Disinfection By-Products and Microbial Contaminants in Drinking Water. Robert M. Clark and Brenda K. Boutin, Eds. NTIS, Springfield, VA, USA.

USEPA – *LT1ESWTR Disinfection Profiling and Benchmarking - Technical Guidance Manual*. Washington D.C. (EUA), U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, 2003.

USEPA – *National Primary Drinking Water Regulations: Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule*. Washington D.C., U.S. Environmental Protection Agency, 2006.