

INATIVAÇÃO POR OXIDAÇÃO FOTOCATALÍTICA DE *Escherichia coli* E *Pseudomonas sp.*

Angela Cristina de Souza Cordeiro*

Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, 21041-210 Rio de Janeiro - RJ

Selma Gomes Ferreira Leite

Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21949-900 Rio de Janeiro - RJ

Márcia Dezotti

COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21945-970 Rio de Janeiro - RJ

Recebido em 5/5/03; aceito em 29/3/04; publicado na web em 19/7/04

INACTIVATION OF *Escherichia coli* AND *Pseudomonas sp.* BY PHOTOCATALYTIC OXIDATION. This study presents the bactericidal activity of titanium dioxide photocatalysis, using as model *Escherichia coli* and *Pseudomonas sp.* cells. It was observed that the process efficiency is related to initial cell concentration, light intensity, UV irradiation exposure time, TiO_2 concentration increase. The ultimate removal efficiency was above 99.9%.

Keywords: photocatalysis; titanium dioxide; bactericidal activity.

INTRODUÇÃO

Muitos segmentos da sociedade estão preocupados com as questões ambientais e vêm, cada vez mais freqüentemente, divulgando suas insatisfações com os acidentes ambientais, como os descartes tóxicos, lençóis freáticos contaminados, poluição do ar, disposição de contaminantes no solo, descartes de efluentes em rios e mares, entre outros. Assim, as exigências em relação às leis ambientais em todo o mundo vêm se tornando cada vez mais exigentes, principalmente devido ao aumento da conscientização em relação à saúde pública e aos riscos ecológicos associados à poluição ambiental. Os tratamentos primários e secundários de águas residuárias industriais e urbanas não eliminam completamente os riscos infecciosos e tóxicos já que, após estes tratamentos, substâncias tóxicas e recalcitrantes de difícil degradação e microrganismos patogênicos ainda estão presentes nos efluentes tratados¹. Por este motivo, nas últimas décadas, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas, visando o aprimoramento e desenvolvimento de tecnologias eficazes para o tratamento de resíduos e redução de poluentes, tendo sempre como base o requisito custo-benefício.

Os Processos Oxidativos Avançados (POA) são tecnologias alternativas que, embora façam uso de diferentes sistemas de reação, envolvem a geração de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) altamente oxidantes. Devido à alta reatividade, esses radicais podem reagir com uma grande variedade de compostos orgânicos. O interesse pelos POA tem crescido enormemente, por serem consideradas tecnologias limpas, podendo, em muitas situações, atingir a completa mineralização dos poluentes². Por outro lado, a decomposição parcial de contaminantes orgânicos não biodegradáveis, tais como aromáticos halogenados, gera intermediários biodegradáveis³. Assim, a combinação de um POA seguido de um processo biológico parece, do ponto de vista econômico, bastante promissor.

Entre os POA, a fotocatalise heterogênea tem se mostrado uma tecnologia promissora na oxidação/degradação de contaminantes orgânicos, visando o controle ambiental. Muitos catalisadores têm sido

testados, sendo que o dióxido de titânio (TiO_2), na forma cristalina anatase, parece ter as características mais importantes, como alta estabilidade, bom desempenho e baixo custo⁴. O processo envolve a geração de pares elétron-lacuna (e^-/h^+), quando um óxido de metal semiconductor é ativado por radiação ultravioleta, com energia maior ou igual à do seu "bandgap". Essas espécies podem se recombinar ou migrar para a superfície do catalisador, reagindo com espécies adsorvidas. O considerável poder redutor dos elétrons foto gerados permite a redução de alguns metais e do oxigênio dissolvido, formando o íon radical superóxido (O_2^-). O oxigênio apresenta uma importante função como sequestrador de elétrons, impedindo a recombinação do par e^-/h^+ , que é apontada como o principal fator limitante para o rendimento do processo^{4,5}. Os buracos foto gerados, poderosos agentes oxidantes, são capazes de gerar radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), oxidando moléculas de água (ou $\cdot\text{OH}$) previamente adsorvidos na superfície do semiconductor. Embora seja considerado o passo primário no mecanismo oxidativo, o ataque do radical $\cdot\text{OH}$ sobre o substrato, mecanismos de oxidação direta via lacunas foto geradas e via espécies reativas de oxigênio são também possíveis, embora com menor frequência⁵. Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas em vários países, visando maior adequação e otimização do processo fotocatalítico para sua utilização, tanto no âmbito industrial como na saúde pública. Além de promover a total mineralização de uma grande variedade de contaminantes orgânicos, as fotoxidações com TiO_2 são promissoras para a eliminação de microrganismos em muitas aplicações, como materiais autolimpantes e auto-esterilizantes. No Japão, uma das aplicações mais importantes da tecnologia fotocatalítica é o uso de azulejos de cerâmica auto-esterilizantes para hospitais, particularmente em salas cirúrgicas. Ao contrário dos bactericidas comuns, os azulejos revestidos com TiO_2 são continuamente ativos, enquanto houver iluminação⁶.

Visando a implementação de sistemas fotocatalíticos contínuos em grande escala, diversos estudos sobre a inativação de microrganismos, envolvendo bactérias, protozoários, vírus e fungos, vêm sendo realizados tanto na água como no ar, objetivando a desinfecção de efluentes, de águas para abastecimento e de ambientes interiores sujeitos a contaminação⁷⁻¹¹.

*e-mail: scangela@ensp.fiocruz.br

Neste estudo foram utilizadas culturas de dois gêneros bacterianos. As bactérias *Escherichia coli*, por serem de fácil cultivo em laboratório e relativamente conhecidas sob o ponto de vista genético, além de serem empregadas como indicador de contaminação fecal, pois têm seu habitat exclusivo no trato intestinal. Sua presença na água indica a possibilidade de também estarem presentes microrganismos entéricos/patogênicos, ressaltando que alguns sorotipos de *E. coli* são responsáveis por gastroenterites, sendo a diarreia o principal sintoma. As espécies da bactéria *Pseudomonas* estão amplamente distribuídas no solo e na água. Embora normalmente não sejam patogênicas, algumas espécies podem causar infecções graves no homem¹².

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho da fotocatalise empregando TiO_2/UV , na descontaminação de águas contendo *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp* como bactérias-modelo. Partindo-se de diferentes concentrações bacterianas, submetidas à variação do teor do catalisador TiO_2 , em diferentes intensidades luminosas e tempos de exposição à irradiação UV, a avaliação foi feita baseada na percentagem de sobrevivência destas espécies, antes e após o tratamento.

PARTE EXPERIMENTAL

Organismos e condições de crescimento

Os microrganismos-modelo utilizados para o estudo de desinfecção fotocatalítica foram *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.*, obtidos de um sistema ambiental poluído. Os organismos foram cultivados em meio de gelose simples e incubados a 35-37 °C por 24-48 h. Após o crescimento, as culturas foram estocadas a 5 °C¹³.

Preparo dos inóculos

Os inóculos, obtidos a partir das culturas-estoque, foram obtidos pelo crescimento em caldo simples a 30 °C e 150 rpm por 24 h. O caldo simples tem a mesma composição da gelose simples, isenta de ágar-ágar¹³.

Experimentos de fotólise e fotocatalise

O fotocatalisador usado neste trabalho foi TiO_2 (P-25 Degussa). O dióxido de titânio foi adicionado às soluções contendo as suspensões celulares imediatamente antes da reação fotocatalítica.

Os experimentos foram conduzidos em béquers de 250 mL, contendo 50 mL de solução com o inóculo, preparado no momento do teste, mais a quantidade adequada do catalisador. As amostras foram mantidas continuamente sob agitação. A irradiação por luz UV foi fornecida por uma lâmpada germicida Toshiba GL 30W, com uma

irradiância de cerca de 8 W m⁻², para comprimento de onda (λ) igual a 254 nm, ou por uma lâmpada de vapor de mercúrio de 250 W Philips HPL-N (sem o bulbo de vidro), com irradiância de cerca de 108 W m⁻² para $\lambda > 254$ nm. Foi utilizado um radiômetro Black Ray®, J-225, UVP Inc., Upland, CA 91786 USA, específico para $\lambda < 300$ nm, para as determinações das irradiâncias. As lâmpadas foram posicionadas a uma distância de 12 cm da superfície da suspensão. Os experimentos foram conduzidos em sistemas distintos, todos em duplicata, com e sem TiO_2 , variando-se o tempo de exposição à irradiação UV de 5 a 20 min; concentração de TiO_2 de 0 a 1 mg mL⁻¹ e concentração celular inicial de 10⁴ a 10¹⁰ UFC mL⁻¹ (número de Unidades Formadoras de Colônias por mL da amostra).

Determinação da viabilidade celular

A quantificação de células viáveis nas suspensões celulares, que foram submetidas à irradiação UV, na presença e ausência de TiO_2 , foi realizada pela técnica de semeadura em placa, empregando-se meio de gelose simples e incubação a 35-37 °C por 24-48 h. Os plaqueamentos foram feitos em duplicata e expressos UFC mL⁻¹.

Através da Equação (1), calcula-se a taxa de morte dos microrganismos, e através da Equação (2), encontra-se a taxa de sobrevivência, a qual foi utilizada nas tabelas com os resultados deste trabalho.

$$\frac{\eta_0 - \eta_t}{\eta_0} \cdot 100 = \text{eficiência (\%)} \quad (1)$$

$$\frac{\eta_t}{\eta_0} \cdot 100 = \text{sobrevivência (\%)} \quad (2)$$

onde η_0 = número de células vivas iniciais e η_t = número de células vivas ao final da aplicação dos processos.

RESULTADOS

Efeito da intensidade luminosa e das concentrações celulares de *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.* na atividade bactericida da irradiação UV, com e sem TiO_2

Ao se avaliar a intensidade luminosa na atividade bactericida, utilizou-se apenas a espécie bacteriana *Escherichia coli*. Conforme os resultados dos experimentos registrados na Tabela 1, utilizando-se concentração bacteriana de ~ 10⁹ UFC mL⁻¹, observou-se ausência de crescimento após a irradiação UV, com e sem TiO_2 , a partir de 10 min, tempo mínimo estipulado nos experimentos. No entanto, nos resultados registrados na Tabela 2, com uma lâmpada de intensi-

Tabela 1. Efeito da concentração celular inicial de *Escherichia coli* (UFC mL⁻¹) sobre a taxa de sobrevivência, após irradiação no UV, empregando lâmpada de mercúrio de alta pressão, com ou sem TiO_2 (1 mg mL⁻¹)

Concentrações celulares iniciais (UFC mL ⁻¹)		(4,66 ± 0,60)·10 ¹³	(1,05 ± 0,11)·10 ⁹	(3,16 ± 0,40)·10 ⁶
Concentrações celulares finais sem TiO_2 (UFC mL ⁻¹)	10 min	(1,80 ± 0,12)·10 ⁴	Zero	Zero
	% sobrev.	3,86·10 ⁻⁸	Zero	Zero
Concentrações celulares finais com TiO_2 (UFC mL ⁻¹)	10 min	(3,09 ± 0,20)·10 ⁷	Zero	Zero
	% sobrev.	6,63·10 ⁻⁵	Zero	Zero
	20 min	(2,34 ± 0,32)·10 ⁷	Zero	Zero
	% sobrev.	5,02·10 ⁻⁵	Zero	Zero
40 min		(4,23 ± 0,60)·10 ⁵	Zero	Zero
	% sobrev.	9,08·10 ⁻⁷	Zero	Zero

Lâmpada de vapor de mercúrio 250 W Philips HPL-N; irradiância: 108 W m⁻² em $\lambda > 254$ nm

dade menor, após 20 min de irradiação UV, com e sem TiO_2 , concentrações bacterianas de $3,13 \times 10^4$ UFC mL^{-1} e $2,87 \times 10^2$ UFC mL^{-1} , respectivamente, foram detectadas. Embora as taxas de sobrevivência destes valores ($1,50 \times 10^{-3}\%$ e $1,38 \times 10^{-5}\%$, respectivamente) sejam desprezíveis, estas quantidades maiores de células viáveis, comparadas com os resultados dos experimentos da Tabela 1, justificam-se pela menor intensidade luminosa empregada. A maior potência da lâmpada empregada nos experimentos mostrados na Tabela 1, determinou uma maior eficiência na atividade bactericida.

Comparando-se os resultados experimentais das Tabelas 2 e 3 e observando-se as maiores concentrações bacterianas iniciais, ou seja, $\sim 10^9$ UFC mL^{-1} para *E. coli* e $\sim 10^{10}$ UFC mL^{-1} para *Pseudomonas* sp., observou-se ausência de crescimento após 20 min de irradiação UV sem TiO_2 para *Pseudomonas* sp., o que não ocorreu com *E. coli*, mesmo com concentração celular inicial cerca de dez vezes menor em relação à concentração de *Pseudomonas* sp. Assim, a eficiência do tratamento sem TiO_2 foi maior na eliminação de *Pseudomonas* sp.

No caso de amostras com uma concentração celular intermediária para os dois gêneros bacterianos ($\sim 10^6$ UFC mL^{-1}), a eficiência foi 100% para o tratamento com TiO_2 , quando se usou *E. coli*, e 100% para o tratamento sem TiO_2 , quando se utilizou *Pseudomonas* sp. Ambos os tratamentos foram 100% eficientes para os dois microrganismos ao se utilizar a concentração celular inicial $\sim 10^4$ UFC mL^{-1} . A redução bacteriana ficou acima de 99,9%. Os diferentes resultados obtidos justificam-se pela utilização de gêneros bacterianos diferentes, uma vez que diferentes gêneros e espécies de bactérias apresentam uma variedade de propriedades morfológicas e fisiológicas que levam a distintas respostas celulares, mesmo quando essas células são submetidas às mesmas condições experimentais.

Efeito do tempo de exposição à irradiação UV, com e sem TiO_2 , sobre a atividade bactericida

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que após 20 min de irradiação UV, com e sem TiO_2 , os tratamentos foram eficientes para a completa eliminação de *Pseudomonas* sp., ressaltando-se uma diminuição bastante significativa já a partir de 5 min. Com relação à *E. coli*, tendo uma concentração inicial cerca de 10^2 vezes

menor ($\sim 10^8$ UFC mL^{-1}) em relação à concentração inicial de *Pseudomonas* sp. ($\sim 10^{10}$ UFC mL^{-1}), também foi atingida uma grande eficiência na eliminação de células em todos os tempos de exposição. Apesar do elevado percentual na eliminação bacteriana após os tratamentos, pode-se verificar, de maneira geral, que o número final de células viáveis de *E. coli* foi maior que para *Pseudomonas* sp., mesmo partindo-se de uma concentração inicial menor. Mesmo assim, os processos foram considerados eficientes para os dois microrganismos devido à baixa taxa de sobrevivência e, ressaltando-se mais uma vez, o comportamento dos diferentes gêneros bacterianos, determinando um número final distinto de células.

Efeito da concentração de TiO_2 na atividade bactericida

A Tabela 5 ilustra o efeito de diferentes concentrações de TiO_2 na eliminação das células de *E. coli* e *Pseudomonas* sp. Os resultados confirmam que a irradiação UV com TiO_2 exibe atividade bactericida e que a desinfecção está relacionada à dosagem de TiO_2 usada até a concentração de estudo (1 mg mL^{-1}). As concentrações acima deste valor podem resultar na diminuição da eficiência bactericida pela possível redução da intensidade da radiação UV sobre a suspensão celular com TiO_2 , causada pelas partículas do catalisador em suspensão, encobrindo as células microbianas¹⁴.

DISCUSSÃO

Dos resultados obtidos, assim como de estudos desenvolvidos por vários outros pesquisadores^{7,14-19} sobre a atividade fotobiológica do TiO_2 , observou-se que as menores concentrações de células viáveis, obtidas após o tratamento, corresponderam às menores concentrações celulares iniciais utilizadas, reportando também, a influência da intensidade luminosa, do tempo de irradiação, da concentração do TiO_2 e das diferentes fotossensibilidades dos microrganismos na capacidade do TiO_2 para exercer sua atividade bactericida.

Segundo Maness *et al.*¹⁴, concentrações de TiO_2 maiores que 1 mg mL^{-1} reduzem a eficiência bactericida. A turbidez causada pelas partículas do TiO_2 em suspensão e o baixo poder de penetração da luz UV reduzem a intensidade da radiação sobre as células

Tabela 2. Efeito da concentração celular inicial de *Escherichia coli* (UFC $\cdot \text{mL}^{-1}$) sobre a taxa de sobrevivência, após irradiação no UV, com ou sem TiO_2 (1 mg mL^{-1})

Concentrações celulares iniciais (UFC $\cdot \text{mL}^{-1}$)		$(2,08 \pm 0,07) \cdot 10^9$	$(5,93 \pm 0,63) \cdot 10^6$	$(2,78 \pm 0,40) \cdot 10^4$
Concentrações celulares finais sem TiO_2 (UFC mL^{-1})	20 min	$(2,87 \pm 0,64) \cdot 10^2$	$(1,00 \pm 0,10) \cdot 10$	Zero
	% sobrev.	$1,38 \cdot 10^{-5}$	$1,69 \cdot 10^{-4}$	Zero
Concentrações celulares finais com TiO_2 (UFC mL^{-1})	20 min	$(3,13 \pm 0,12) \cdot 10^4$	Zero	Zero
	% sobrev.	$1,50 \cdot 10^{-3}$	Zero	Zero

Lâmpada germicida UV Toshiba GL 30 W; irradiância: $\sim 8 \text{ W m}^{-2}$ em $\lambda = 254 \text{ nm}$

Tabela 3. Efeito da concentração celular inicial de *Pseudomonas* sp. (UFC mL^{-1}) sobre a taxa de sobrevivência, após irradiação no UV, com ou sem TiO_2 (1 mg mL^{-1})

Concentrações celulares iniciais (UFC $\cdot \text{mL}^{-1}$)		$(6,00 \pm 0,10) \cdot 10^{10}$	$(3,91 \pm 0,30) \cdot 10^6$	$(9,20 \pm 0,11) \cdot 10^4$
Concentrações celulares finais sem TiO_2 (UFC mL^{-1})	20 min	Zero	Zero	Zero
	% sobrev.	Zero	Zero	Zero
Concentrações celulares finais com TiO_2 (UFC mL^{-1})	20 min	$(2,42 \pm 0,90) \cdot 10^4$	$(1,70 \pm 0,11) \cdot 10^3$	Zero
	% sobrev.	$4,03 \cdot 10^{-5}$	$4,35 \cdot 10^{-2}$	Zero

Lâmpada germicida UV Toshiba GL 30 W; irradiância: $\sim 8 \text{ W m}^{-2}$ em $\lambda = 254 \text{ nm}$

Tabela 4. Efeito do tempo de irradiação no UV, com ou sem TiO₂ (1 mg mL⁻¹), sobre a taxa de sobrevivência de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp.

Concentrações celulares iniciais (UFC mL ⁻¹)		Microrganismos	
		<i>E. coli</i> (4,49 ± 0,20)·10 ⁸	<i>Pseudomonas</i> sp. (3,80 ± 0,22)·10 ¹⁰
Concentrações celulares finais sem TiO ₂ (UFC mL ⁻¹)	5 min	(4,97 ± 0,50)·10 ²	(1,30 ± 0,30)·10 ²
	% sobreviv.	1,11·10 ⁻⁴	3,42 x 10 ⁻⁷
	10 min	(2,35 ± 0,25)·10 ²	(8,00 ± 0,20)·10
	% sobreviv.	5,23·10 ⁻⁵	2,11·10 ⁻⁷
Concentrações celulares finais com TiO ₂ (UFC mL ⁻¹)	15 min	(2,15 ± 0,85)·10 ²	(4,50 ± 0,50)·10
	% sobreviv.	4,79·10 ⁻⁵	1,18·10 ⁻⁷
	20 min	(2,00 ± 0,10)·10	Zero
	% sobreviv.	4,45·10 ⁻⁶	Zero
Concentrações celulares finais com TiO ₂ (UFC mL ⁻¹)	5 min	(2,65 ± 0,20)·10 ⁵	(2,85 ± 0,80)·10 ⁵
	% sobreviv.	5,90·10 ⁻²	7,50·10 ⁻⁴
	10 min	(1,05 ± 0,30)·10 ⁴	(2,08 ± 0,20)·10 ⁴
	% sobreviv.	2,34·10 ⁻³	5,47·10 ⁻⁵
Concentrações celulares finais com TiO ₂ (UFC mL ⁻¹)	15 min	(1,95 ± 0,30)·10 ³	(1,45 ± 0,13)·10 ⁴
	% sobreviv.	4,34·10 ⁻⁴	3,82·10 ⁻⁵
	20 min	(3,35 ± 0,11)·10 ²	Zero
	% sobreviv.	7,46·10 ⁻⁵	Zero

Lâmpada germicida UV Toshiba GL 30 W; irradiância: ~ 8 W m⁻² em λ = 254 nm

Tabela 5. Efeito da concentração de TiO₂ (mg mL⁻¹) com irradiação no UV sobre a taxa de sobrevivência de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp.

Concentrações celulares iniciais (UFC mL ⁻¹)		Microrganismos	
		<i>E. coli</i> (4,00 ± 0,23)·10 ⁹	<i>Pseudomonas</i> sp. (6,33 ± 0,13)·10 ¹⁰
Concentrações celulares finais após 5 min de radiação UV (UFC mL ⁻¹)	0,0 mg mL ⁻¹	(2,67 ± 0,60)·10	(1,38 ± 0,11)·10 ²
	% sobreviv.	6,68·10 ⁻⁷	2,18·10 ⁻⁷
Concentrações celulares finais após 5 min de radiação UV (UFC mL ⁻¹)	0,1 mg mL ⁻¹	(1,77 ± 0,50)·10 ⁵	(1,19 ± 0,06)·10 ⁵
	% sobreviv.	4,43·10 ⁻³	1,88·10 ⁻⁴
Concentrações celulares finais após 5 min de radiação UV (UFC mL ⁻¹)	0,2 mg mL ⁻¹	(1,64 ± 0,07)·10 ⁴	(1,94 ± 0,94)·10 ⁴
	% sobreviv.	4,10·10 ⁻⁴	3,06·10 ⁻⁵
Concentrações celulares finais após 5 min de radiação UV (UFC mL ⁻¹)	0,4 mg mL ⁻¹	(1,64 ± 0,09)·10 ³	(1,32 ± 0,20)·10 ⁴
	% sobreviv.	4,10·10 ⁻⁵	2,09·10 ⁻⁵
Concentrações celulares finais após 5 min de radiação UV (UFC mL ⁻¹)	1,0 mg mL ⁻¹	(4,00 ± 0,10)·10 ²	(3,29 ± 0,11)·10 ³
	% sobreviv.	1,00·10 ⁻⁵	5,20·10 ⁻⁶

Lâmpada germicida UV Toshiba GL 30 W; irradiância: ~ 8 W m⁻² em λ = 254 nm

microbianas²⁰⁻²³. Portanto, no tratamento com radiação UV e TiO₂ ocorre a combinação de dois processos, o ataque das células pelos radicais hidroxila (·OH), gerados pela degradação na superfície do fotocatalisador e, também, a absorção direta da radiação UV pelas células, sendo que esta é sem dúvida a responsável por parte significativa da inativação celular.

A redução da transmissão da radiação UV pode surgir também em decorrência da deposição de sais pouco solúveis (por exemplo, CaCO₃) em volta da lâmpada, ou devido à redução da eficiência da lâmpada pelo excesso de uso da mesma²⁴. Esta possibilidade está afastada, pois a emissão da lâmpada foi monitorada em todos os experimentos.

A eficiência da desinfecção por radiação UV também pode ser afetada pela presença de alguns compostos, como ferro, sulfeto, nitrito e fenol, que absorvem radiação UV no comprimento de onda de 254 nm. Ainda, segundo Ireland *et al.*²⁵, a presença de matéria orgânica reduz a cinética da inativação, competindo ostensivamente com as

bactérias pelo radical hidroxila. Este fato foi verificado em nossos experimentos quando, por engano, a suspensão celular foi feita não em solução salina, mas em meio nutritivo. Neste experimento particular, não foi possível ser feita a quantificação, pois as baixas diluições estabelecidas para as contagens rotineiras, determinaram uma grande concentração de células viáveis finais, provavelmente a eficiência da desinfecção das células foi afetada pela presença da carga orgânica do meio nutritivo.

A luz ultravioleta é absorvida por muitos compostos intracelulares, mas o DNA é o que sofre o maior dano. A maior atividade bactericida ocorre em 260 nm, que é o comprimento de onda mais fortemente absorvido pelo DNA. Após o DNA ter sido exposto à luz UV, ocorre a formação de dímeros de pirimidina. Caso esses dímeros não sejam removidos por enzimas específicas de reparo intracelular, a replicação do DNA pode ser inibida ou alterada, causando mortes ou mutações. Assim, uma desvantagem significativa dos processos de desinfecção UV para monitorar os microrganismos de veiculação

hídrica, tanto em água potável quanto em água residuária, seria a capacidade dos microrganismos para reparar os danos causados na estrutura do seu DNA, caso uma dose subletal seja usada²⁶⁻²⁹.

Os mecanismos de recuperação dos microrganismos irradiados com UV incluem os processos enzimáticos da fotorreativação e da recuperação no escuro. A fotorreativação, que resulta na remoção dos dímeros do DNA, ocorre na presença de radiação na faixa de comprimento de onda de 310-480 nm, e a recuperação no escuro ocorre, como seu nome sugere, na ausência de luz. Num processo de tratamento com luz UV para desinfecção de efluentes, o tempo de residência dentro da tubulação, seguido pela disposição em águas superficiais, favorecem a ocorrência de ambos os mecanismos de regeneração celular^{24,26-29}. Portanto, deve-se assegurar uma dose suficiente de UV no processo para garantir a inviabilização celular.

Otaki *et al.*⁹ estudaram a inativação de três espécies de microrganismos, *Escherichia coli*, bacteriófago Q β e *Cryptosporidium parvum*, por desinfecção fotocatalítica com TiO₂, utilizando irradiação UV-C (0,2 mW cm⁻², em 254 nm) ou luz negra (7,0 mW cm⁻², em 360 nm). Como as células de *Escherichia coli* foram sensíveis à irradiação UV-C e UV-A, não houve diferença significativa entre a inativação feita com e sem TiO₂; quanto aos vírus, apresentaram sensibilidade somente para irradiação UV-C, e assim o efeito do TiO₂ não pôde ser observado nesta irradiação. Contudo, o efeito aditivo do TiO₂ pôde ser observado claramente, na inativação de Q β , com irradiação UV-A, e de *Cryptosporidium parvum*, com irradiação UV-C ou UV-A, porque esses microrganismos foram resistentes à irradiação da luz. Apesar da eficiência fotocatalítica ter sido igual em ambos os reatores, a inativação fotocatalítica para o protozoário foi mais rápida com UV-C que com UV-A.

De acordo com Ashikaga *et al.*³⁰, TiO₂ absorve UV-A eficientemente e exibe atividade fotocatalítica. Recentemente, a ação bactericida da fotocatalise heterogênea (UV-A/TiO₂) foi testada em microrganismos com diferentes fotossensibilidades¹⁸. Alta eficiência foi encontrada em todos os casos estudados, particularmente para o mais resistente, *Enterobacter cloacae*. Este microrganismo normalmente é encontrado no solo e na água e, devido a um eficiente sistema defensivo antioxidante³¹, não é inativado pela irradiação UV-A. Em todos os casos estudados, doses subletais de UV-A na presença de TiO₂ foram eficientes na eliminação microbiana.

A atividade bactericida do processo fotocatalítico com TiO₂, usando irradiação UV-A e oxigênio como agente oxidante, tem sido atribuída à geração de espécies reativas de oxigênio¹⁴. Os radicais hidroxila ([•]OH) e os ânions superóxido (O₂^{-•}), altamente reativos com amostras biológicas, são considerados as espécies principais produzidas durante o processo^{25,32-34}. Outras espécies, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroperóxil (HO₂[•]) e oxigênio singlete (¹O₂) têm sido também consideradas^{32,34,35}.

A grande sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* a UV-A foi reportada por Fernández *et al.*³⁶. A exposição à irradiação UV-A (365 nm, 120 kJ m⁻² h⁻¹) foi eficaz na eliminação desses microrganismos, mas não afetou a viabilidade das células de *Escherichia coli*.

Estudos^{33,37-40} sobre a ação microbicida do processo fotocatalítico com TiO₂ revelaram que os vírus são mais sensíveis ao processo, seguidos pelas células bacterianas, e estas pelos esporos bacterianos. Isso sugere que diferentes microrganismos respondem de maneira diferente ao fotocatalisador TiO₂ devido às suas diferenças estruturais, particularmente no que diz respeito à complexidade e espessura do envelope celular.

Segundo Huang *et al.*³⁵, a descontaminação feita com radiação UV e TiO₂ é assegurada pelos maiores prejuízos causados com o uso do catalisador TiO₂. A ação oxidativa exercida pelo processo UV/TiO₂ ocasiona danos na parede celular e na membrana citoplasmática. A ação fotocatalítica aumenta progressivamente a permeabilidade

celular, permitindo o efluxo livre do conteúdo intracelular, que conduz finalmente à morte celular. As partículas livres de TiO₂ podem também penetrar nas células danificadas, e o ataque direto posterior nos componentes intracelulares, como enzimas^{15,37} e DNA⁴¹, pode acelerar a morte celular. Com esse mecanismo, eles enfatizaram a importância da parede celular e da membrana citoplasmática como os alvos principais do ataque do TiO₂.

Sunada *et al.*¹⁹ estudando o mecanismo de inativação de células de *E. coli* através da ação oxidativa exercida pelo processo UV/TiO₂, observaram que a reação é iniciada por uma decomposição parcial da membrana externa, causada pelas espécies reativas produzidas no processo fotocatalítico. Eles observaram que nessa etapa não há a perda total da viabilidade. Contudo, há alterações na permeabilidade da membrana externa, possibilitando que as espécies reativas alcancem a membrana citoplasmática, e ocorra a peroxidação dos lipídeos da membrana¹⁴. Com as alterações estruturais e funcionais da membrana citoplasmática⁴²⁻⁴⁴, ocorre a perda da viabilidade e, finalmente, a morte celular.

Oguma *et al.*⁴⁵ observaram que a velocidade de fotorreativação de *E. coli*, após irradiação UV/TiO₂, foi menor que aquela ocorrida somente com irradiação UV, apesar de nenhuma diferença ter ocorrido entre as velocidades de inativação pela irradiação UV, com e sem TiO₂. Assim, mesmo que a irradiação feita somente com UV tenha uma boa eficiência na inativação da biomassa, a presença de TiO₂, pelos motivos acima expostos, poderá assegurar maior benefício ambiental, uma vez que promove danos irreversíveis às células bacterianas, evitando uma fotorreativação posterior.

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos nas condições experimentais utilizadas, concluiu-se que a taxa de sobrevivência das espécies bacterianas estudadas diminuiu quando se reduziu a concentração celular inicial, aumentando-se a intensidade luminosa, o tempo de exposição à irradiação UV ou a dosagem de TiO₂ até a concentração de 1 mg mL⁻¹.

Foi detectada maior resistência para *Escherichia coli* em relação a *Pseudomonas* sp. para os dois processos.

O desempenho dos processos de fotodegradação, com ou sem TiO₂, mostrou-se eficiente na descontaminação de água, podendo ser um método viável no tratamento de água.

REFERÊNCIAS

- Barros, R. T. V.; Chernicharo, C. A. L.; Héller, L.; Von Sperling, M.; *Manual de Saneamento e Proteção Ambiental para os Municípios, Saneamento DESA-UFGM* 1996, vol. 2, cap. 5.
- Andreozzi, R.; Caprio, V.; Insola, A.; Marotta, R.; *Catal. Today* **1999**, *53*, 51.
- Bertazzoli, R.; Pelegrini, R.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 477.
- Nogueira, R. F. P.; Jardim, W. F.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 69.
- Zioli, R. L.; Jardim, W. F.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 319.
- Tryk, D. A.; Fujishima, A.; Honda, K.; *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 2363.
- Watts, R. J.; Kong, S.; Orr, M. P.; Miller, G. C.; Henry, B. E.; *Water Res.* **1995**, *29*, 95.
- Melián, J. A. H.; Rodríguez, J. M. D.; Suárez, A. V.; Rendón, E. T.; Campo, C. V.; Arana, J.; Penã, J. P.; *Chemosphere* **2000**, *41*, 323.
- Otaki, M.; Hirata, T.; Ohgaki, S.; *Water Sci. Technol.* **2000**, *42*, 103.
- Dunlop, P. S. M.; Byrne, J. A.; Manga, N.; Eggins, B. R.; *J. Photochem. Photobiol., A* **2002**, *148*, 355.
- Kondo, M. M.; Orlanda, J. F. F.; Ferreira, M. G. A. B.; Grassi, M. T.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 133.
- Pelczar Jr., M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R.; *Microbiologia Conceitos e Aplicações*, 2nd ed., Makron Books, 1996.
- Rosemberg, J. A.; Penha, E. M.; *Técnicas Básicas de Microbiologia*, Apostila - Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1989.
- Maness, P.-C.; Smolinski, S.; Blake, D. M.; Huang, Z.; Wolfrum, E. J.; Jacoby, W. A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4094.

15. Matsunaga, T.; Tomoda, R.; Nakajima, T.; Nakamura, N.; Komine, T.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1330.
16. Wei, C.; Lin, W. Y.; Zainal, Z.; Williams, N. E.; Zhu, K.; Kruzic, A. P.; Smith, R. L.; Rajeshwar, K.; *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 934.
17. Bekbölet, M.; *Water Sci. Technol.* **1997**, *35*, 95.
18. Ibáñez, J. A.; Litter, M. I.; Pizarro, R.A.; *J. Photochem. Photobiol., A* **2003**, *157*, 81.
19. Sunada, K.; Watanabe, T.; Hashimoto, K.; *J. Photochem. Photobiol., A* **2003**, *156*, 227.
20. Qualls, R. G.; Flynn, M. P.; Johnson, J. D.; *J. Wat. Poll. Control Fed.* **1983**, *55*, 1280.
21. Baer, G.; *Public Works* **1979**, 59.
22. Block, S. S.; Goswami, D. W.; *Sol. Eng.* **1995**, *1*, 431.
23. Cooper, A. T.; Goswami, D. Y.; Block, S. S.; *J. Adv. Oxid. Technol.* **1998**, *3*, 151.
24. Chan, Y. Y.; Killick, E. G.; *Water Res.* **1995**, *5*, 1373.
25. Ireland, J. C.; Klostermann, P.; Rice, E. W.; Clark, R. M.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 1668.
26. Harris, G. D.; Adams, V. D.; Sorensen, D. L.; Curtis, M. S.; *Water Res.* **1987**, *6*, 687.
27. Lindenaer, K. G.; Darby, J. L.; *Water Res.* **1994**, *4*, 805.
28. Kashimada, K.; Kamido, N.; Yamamoto, K.; Ohgaki, S.; *Water Sci. Technol.* **1996**, *33*, 261.
29. Tosa, K.; Hirata, T.; *Water Res.* **1999**, *2*, 361.
30. Ashikaga, T.; Wada, M.; Kobayashi, H.; Mori, M.; Katsumura, Y.; Fukui, H.; Kato, S.; Yamaguchi, M.; Takamatsu, T.; *Mutat. Res.* **2000**, *466*, 1.
31. Opezzo, O. J.; Pizarro, R. A.; *J. Photochem. Photobiol., B* **2001**, *62*, 158.
32. Blake, D. M.; Maness, P. C.; Huang, Z.; Wolfrum, E. J.; Huang, J.; *Sep. Purif. Methods* **1999**, *28*, 1.
33. Pham, H. N.; Dowell, T. Mc; Wilkins, E.; *J. Environ. Sci. Health* **1995**, *3*, 627.
34. Kikuchi, Y.; Sunada, K.; Iyoda, T.; Hashimoto, K.; Fujishima, A.; *J. Photochem. Photobiol., A* **1997**, *106*, 51.
35. Huang, Z.; Maness, P-C.; Blake, D. M.; Wolfrum, E. J.; Smolinski, S. L.; Jacoby, W. A.; *J. Photochem. Photobiol., A* **2000**, *130*, 163.
36. Fernández, R. O.; Pizarro, R. A.; *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 334.
37. Matsunaga, T.; Tomoda, R.; Nakajima, T.; Wake, H.; *FEMS Microbiol. Lett.* **1985**, *29*, 211.
38. Saito, T.; Iwase, T.; Horis, J.; Morioka, T.; *J. Photochem. Photobiol., B* **1992**, *14*, 369.
39. Lee, S.; Nishida, K.; Otaki, M.; Ohgaki, S.; *Water Sci. Technol.* **1997**, *35*, 101.
40. Sjogren, J. C.; Sierka, R. A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 344.
41. Wamer, W. G.; Yin, J. J.; Wei, R. R.; *Free Radical Biol. Med.* **1997**, *23*, 851.
42. Lynch, R. E.; Fridovich, I.; *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 1838.
43. Girotti, A. W.; Thomas, J. P.; *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 1744.
44. Ginkek, G. V.; Sevanian, A.; *Methods Enzymol.* **1994**, *233*, 273.
45. Oguma, K.; Otaki, M.; Ohgaki, S.; *Proc. of the 53rd Annual Conference of the JSCE* **1998**, *7*, 250.