



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Diretoria de Pesquisa e Pós -Graduação

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

LUCIANA VERISSIMO SIQUEROLO

**EFEITOS DO PROCESSO OXIDATIVO UV/H₂O₂ NA FORMAÇÃO DE
CARBONO ORGÂNICO ASSIMILÁVEL E TRIHALOMETANOS NA
PRESENÇA DE CIANOBACTÉRIAS**

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2017**

LUCIANA VERISSIMO SIQUEROLO

**EFEITOS DO PROCESSO OXIDATIVO UV/H₂O₂ NA FORMAÇÃO DE
CARBONO ORGÂNICO ASSIMILÁVEL E TRIHALOMETANOS NA
PRESENÇA DE CIANOBACTÉRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental - Área de concentração: Controle e Monitoramento Ambiental.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Lucila Adriani Coral

Coorientador(a): Prof.^a Dr.^a Fatima de Jesus Bassetti

**CURITIBA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S618e
2017
2017

Siquerolo, Luciana Veríssimo
Efeitos do processo oxidativo UV/H₂O₂ na formação de carbono orgânico assimilável e trihalometanos na presença de cianobactérias / Luciana Veríssimo Siquerolo.-- 2017.
73 f. : il. ; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês
Disponível também via World Wide Web
Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2017
Bibliografia: f. 64-73

1. Cianobactéria. 2. Oxidação biológica. 3. Carbono – Formação. 4. Trihalometanos. 5. Matéria orgânica. 6. Tecnologia ambiental – Dissertações. I. Coral, Lucila Adriani. II. Bassetti, Fátima de Jesus. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. IV. Título.

CDD: Ed. 23 – 363.7

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba
Bibliotecário : Adriano Lopes CRB9/1429

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº084

A Dissertação de Mestrado intitulada EFEITO DO PROCESSO OXIDATIVO UV/H₂O₂ NA FORMAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO ASSIMILÁVEL E TRIHALOMETANOS NA PRESENÇA DE CIANOBACTÉRIAS, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Luciana Verissimo Siquerolo**, no dia 27 de junho de 2017, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias E Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Lucila Adriani Coral- Presidente - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Giselle Maria Maciel - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Guilherme Ferreira Silveira - FIOCRUZ

Prof(a). Dr(a). Maria Eliza Nagel Hassemer - UFSC

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 27 de junho de 2017.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que fez do impossível uma realidade e desde o princípio esteve à frente dos meus planos, preparando o caminho e me capacitando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, por sempre acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado foi o que me deu, em muitos momentos, a esperança para seguir. Pai, sua postura significou segurança e a certeza de que não estava sozinha nesta caminhada. Aos meus irmãos Rafa e Dandan, por me socorrerem nas horas mais inesperadas e sempre estarem dispostos a me ajudar em tudo, tornando meus dias mais leves e divertidos.

Ao Gustavo Ferdinandi, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigado pelo carinho, paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada dia.

Aos meus irmãos “Curitibanos”, Francielle Rocha, Bruna Cabral, Juliano Mastella, e Família Ferdinandi, que estiveram presentes e não mediram esforços para tornar meus dias mais descontraídos durante esses anos de adaptação em Curitiba.

Aos meus colegas do Laboratório LTPA, Ana Carolina, Bruno, Gabrielli, Raquel, Mariana, Camila, Lucicleide e Jonas. Obrigada pela companhia diária, por todo o auxílio, paciência e compreensão ao longo desses anos. Obrigado por estarem a meu lado na alegria e na tristeza, e por todo apoio emocional nos momentos de dificuldade. Sem vocês o mestrado não teria a mesma graça, a minha vitória também é de vocês.

À minha Orientadora Lucila Coral por me receber com toda dedicação, e mesmo diante de toda minha inexperiência na área, foi paciente e compreensiva. Obrigada por acreditar em mim, quando muitas vezes nem eu acreditava. Por compartilhar seu conhecimento e sempre estar disposta a sanar minhas dúvidas. Sou muito grata a você e ao crescimento profissional que me proporcionou. Agradeço também à minha coorientadora, professora Fatima Bassetti, por todo o auxílio e ensinamentos.

À professora Gisele Maria Maciel, que desempenhou papel de extrema importância para a conclusão desta pesquisa. Obrigada por ter me apresentado a Microbiologia e me despertado a paixão por esta área.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro na execução do projeto e na concessão da bolsa de estudos.

E por fim, mas não menos importante, agradeço aos profissionais envolvidos nas análises de COD e THM, Rúbia (UTFPR) e Alexandre (SENAI). Ao Instituto Carlos Chagas - Fiocruz/PR, a Plataforma de Citometria de Fluxo (RPT08L) e ao Pesquisador Guilherme Ferreira Silveira, que com sua enorme receptividade, nos recebeu e tornou possível as análises de COA. Obrigada por todas as horas dispensadas em prol desta pesquisa e por seu comprometimento ímpar.

Resumo

SIQUEROLO, L. V. **Efeitos do Processo Oxidativo UV/H₂O₂ na formação de carbono orgânico assimilável e trihalometanos na presença de cianobactérias.** 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

Estudos relatam que a matéria orgânica proveniente das células de cianobactérias é um importante precursor na formação de subprodutos da desinfecção (DBP), tais como trihalometanos totais (THM), o que é considerado indesejável, principalmente quando se adotam processos oxidativos avançados (POA) para o tratamento da água. Embora este processo induza a degradação dos compostos orgânicos, a mineralização completa destes pode não ser alcançada. Se o tratamento não for efetivo, a matéria orgânica é oxidada parcialmente, tendo como subproduto da oxidação o carbono orgânico assimilável (COA), podendo assim propiciar um aumento de precursores de trihalometanos. Este estudo teve por objetivo avaliar a formação de carbono orgânico assimilável a partir do processo oxidativo UV/H₂O₂ de água contendo células de cianobactéria e a sua correlação com a formação de trihalometanos. O desenvolvimento experimental do estudo foi dividido em duas etapas principais, sendo: adaptação da metodologia padronizada para quantificação de COA, e ensaios foto-oxidativos em diferentes condições operacionais. Na primeira etapa, a metodologia padronizada com os organismos P-17 e NOX foi adaptada, substituindo-se a técnica de avaliação do crescimento microbiano usual (contagem por placas) pela técnica de citometria de fluxo. Na segunda etapa, foram realizados ensaios foto-oxidativos a partir da exposição de água contendo células de *Microcystis aeruginosa* ao processo oxidativo UV/H₂O₂ em diferentes dosagens de H₂O₂ (10, 25, 50, 75 e 100 mg L⁻¹) a uma densidade celular de 250.000 cel mL⁻¹. Nesta etapa foram monitorados os parâmetros pH, residual de peróxido de hidrogênio, densidade de células de cianobactérias, carbono orgânico assimilável, carbono orgânico dissolvido (COD), e a formação de trihalometanos. A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que a aplicação de processo UV/H₂O₂ no tratamento de águas com a presença de cianobactérias de fato contribui para a formação de COA, porém neste caso, essa formação não foi diretamente proporcional à formação de THM, como era esperado. Observou-se que enquanto a concentração de COA aumentou após a oxidação, o inverso ocorreu com a concentração de THM, o qual apresentou uma redução significativa após a oxidação. A concentração de COD obtida mostrou uma tendência similar a formação de THM, pois a concentração de ambos foi reduzida ao longo do processo oxidativo. Relacionando os dados de COD e COA pode-se observar que estes também apresentaram comportamento inverso. Enquanto a concentração de COD diminuiu, a de COA aumentou após a oxidação. Do ponto de vista da eficiência do processo UV/H₂O₂ na remoção de matéria orgânica proveniente de células de cianobactérias e (ou) precursores de DBP's, a aplicação deste processo se mostrou uma alternativa factível no tratamento de águas contaminadas pela *M. aeruginosa*.

Palavras chave: Processos oxidativos avançados. Cianobactérias. Citometria de fluxo. Carbono orgânico assimilável. Trihalometanos.

Abstract

SIQUEROLO, L. V. **Effects of the UV / H₂O₂ Oxidative Process on the formation of assimilable organic carbon and trihalomethanes in the presence of cyanobacteria.** 2017. 73f. Thesis (Master in Environmental Science and Technology). Federal University of Technology - Parana. Curitiba, 2017.

Studies have reported that organic matter from cyanobacteria cells is an important precursor in the formation of disinfection by-products (DBP), such as total trihalomethanes (THM), which is considered undesirable, especially when adopting advanced oxidative The treatment of water. Although this process induces the degradation of organic compounds, complete mineralization of these compounds may not be achieved. If the treatment is not effective, the organic matter is partially oxidized, with the assimilable organic carbon (AOC) as the by-product of oxidation, which may lead to an increase in trihalomethane precursors. This study aimed to evaluate the formation of organic carbon assimilable from the UV/H₂O₂ oxidative process of water containing cyanobacteria cells and its correlation with the formation of trihalomethanes. The experimental development of the study was divided into two main steps: adaptation of the standardized methodology for AOC quantification, and photo oxidative assays under different operating conditions. In the first step, the methodology standardized with the P-17 and NOX organisms was adapted, replacing the usual microbial growth evaluation technique (plate counting) using the flow cytometry technique. In the second step, photo-oxidative assays were performed from the exposure of water containing *Microcystis aeruginosa* cells to the UV/H₂O₂ oxidative process at different dosages of H₂O₂ (10, 25, 50, 75 and 100 mg L⁻¹) at a density of 250.000 cell mL⁻¹. The pH, residual hydrogen peroxide, cell density of cyanobacteria, assimilable organic carbon, dissolved organic carbon (DOC), and the formation of trihalomethanes were monitored. From the obtained results, it can be observed that the application of UV/H₂O₂ process in the treatment of water contaminated by cyanobacteria does indeed contribute to the formation of AOC, however in this case, this formation was not directly proportional to the formation of THM, as Was expected. It was observed that while the concentration of AOC increased after oxidation, the inverse occurred with the concentration of THM, which showed a significant reduction after the oxidation. The DOC concentration obtained showed a tendency similar to THM formation, since the concentration of both was reduced throughout the oxidative process. Relating the data of DOC and AOC can be observed that these also presented an inverse behavior. While DOC concentration decreased, AOC increased after oxidation. From the point of view of the efficiency of the UV/H₂O₂ process in the removal of organic matter from cyanobacterial cells and (or) DBP precursors, the application of this process has proved to be a viable alternative in the treatment of water contaminated by *M. aeruginosa*.

Key-words: Advanced oxidative processes. Cyanobacteria. Flow cytometry. Assimilable organic carbon. Trihalomethanes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto da câmara de cultivo de cianobactérias do Laboratório de Tratamento e Potabilização de Água	28
Figura 2 - Foto do reator fotoquímico utilizado nos experimentos de oxidação UV/H ₂ O ₂	30
Figura 3 - Foto do sistema de refrigeração e caixa de proteção utilizada para os ensaios de oxidação UV/H ₂ O ₂	31
Figura 4 - Fluxograma do procedimento experimental.....	32
Figura 5 - Foto do Citômetro de Fluxo utilizado para contagem celular das amostras de inóculos puros de P-17 e NOX, bem como das amostras de água analisadas após processo oxidativo	33
Figura 6 - Fluxograma da sequência do procedimento utilizado para a quantificação de COA.....	37
Figura 7 - Gráficos obtidos por citometria de fluxo representando a contagem celular dos microrganismos P-17 e NOX em meio líquido. (a) <i>Density plote</i> ; (b) <i>Dote plote</i>	44
Figura 8 - Curva de crescimento dos microrganismos P-17 e NOX após 168 horas de incubação a 25 °C em estufa bacteriológica.....	45
Figura 9 - Avaliação da interferência do bissulfito de sódio no crescimento da P-17 e NOX.....	46
Figura 10 - Representação da densidade celular dos microrganismos na presença e ausência do bissulfito de sódio através do gráfico de citometria " <i>density plote</i> "	47
Figura 11 - Curva de decaimento do H ₂ O ₂ em exposição ao UV	50
Figura 12 - Concentração de COD antes e após processo oxidativo UV/H ₂ O ₂ antes e após 90 minutos de exposição.....	51
Figura 13 - Formação de COA a partir de processo oxidativo UV/H ₂ O ₂ após 90 minutos e oxidação.....	53
Figura 14 - Demonstração do nível de Estabilidade Biológica comparado as concentrações de COA obtidas em cada dosagem de H ₂ O ₂ estudada.....	54
Figura 15 - Relação da formação de COA e COD durante processo oxidativo UV/H ₂ O ₂ após 90 minutos de oxidação.....	55
Figura 16 - Concentração de THM totais antes e após 90 minutos de oxidação UV/H ₂ O ₂	56
Figura 17 - Concentração de THM em função de cada composto que compõe o grupo antes e após 90 minutos de exposição.....	58
Figura 18 - Formação de THM relacionada com a concentração de THM's Totais após processo oxidativo UV/H ₂ O ₂ , de acordo com cada de oxidante testada.....	59
Figura 19 - Formação de COA relacionada com a concentração de THM's Totais formados durante processo oxidativo UV/H ₂ O ₂	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COA	Carbono Orgânico Assimilável
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
COT	Carbono Orgânico Total
DBP	Subproduto da desinfecção (Disinfection by products)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
LTPA	Laboratório de Tratamento e Potabilização da água
NOX	<i>Spirillum sp. NOX</i>
POA	Processo Oxidativo Avançado
P-17	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
SENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem
DBP	Subproduto da Desinfecção
THM	Trihalometano
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 <i>Objetivo geral</i>	14
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 <i>Cianobactérias</i>	15
3.2 <i>Processos oxidativos e sua relação com a formação de trihalometanos</i>	19
3.2.1 <i>Aplicação do processo oxidativo UV/H₂O₂ na remoção de matéria orgânica natural</i>	21
3.3 <i>Carbono orgânico assimilável</i>	23
3.3.1 <i>Formação de carbono orgânico assimilável a partir de algas e cianobactérias</i>	26
4 METODOLOGIA	28
4.2 <i>Cultivo laboratorial de cianobactérias</i>	28
4.3 <i>Água de estudo</i>	29
4.4 <i>Equipamentos</i>	29
4.4.1 <i>Reator foto-oxidativo</i>	29
4.5 <i>Procedimento experimental</i>	31
4.5.1 <i>Adaptação da metodologia para quantificação de COA</i>	32
4.5.1.1 <i>Preparo dos materiais livres de carbono</i>	34
4.5.2 <i>Ativação das cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (P-17) e <i>Spirillum NOX</i> (NOX)</i>	34
4.5.3 <i>Preparo dos inóculos de P-17 e NOX e determinação do estágio estacionário de crescimento</i>	35
4.5.4 <i>Preparo das amostras para quantificação de COA</i>	36
4.5.5 <i>Efeitos de um agente de extinção do H₂O₂ na quantificação de COA</i>	38
4.6. <i>Estudos oxidativos</i>	39
4.6.1. <i>Estimativa da dosagem de H₂O₂</i>	39
4.7 <i>Análises Físico-Químicas e métodos analíticos</i>	40
4.7.1 <i>Determinação do residual de peróxido de hidrogênio</i>	40
4.7.2 <i>Carbono orgânico dissolvido</i>	41
4.7.3 <i>Concentração de trihalometanos</i>	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

5.1 <i>Adaptação da metodologia para quantificação de COA</i>	43
5.1.1 Método de contagem celular	43
5.1.2 Definição do estágio estacionário dos inóculos de P-17 e NOX.....	45
5.1.3 Avaliação da interferência do bissulfito no crescimento da P-17 e NOX.....	46
5.2 <i>Estudos Oxidativos</i>	49
5.2.1 Avaliação da degradação do peróxido de hidrogênio e estimativa do tempo de exposição à radiação UV	49
5.3. <i>Análises físico-químicas</i>	51
5.3.1 Carbono orgânico Dissolvido.....	51
5.3.2 Carbono Orgânico Assimilável	53
5.3.3 Formação de trihalometanos a partir do processo oxidativo UV/H ₂ O ₂	56
6. CONCLUSÕES	62
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A proliferação de cianobactérias em lagos e reservatórios eutrofizados tem se tornado cada vez mais frequente. De acordo com documento da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), em nível global, estima-se que o número de lagos com eventos de floração de cianobactérias tende a aumentar em cerca de 20% até 2050 e, portanto, os problemas relacionados ao tratamento de água com a presença desses organismos deverão ser ainda maiores (OECD, 2012).

Segundo Henderson, Baker e Parsons (2008), a principal consequência causada na água a partir da proliferação de cianobactérias em mananciais utilizados por estações de tratamento de água para abastecimento público, está relacionada com a matéria orgânica derivada de suas células. Estudos relatam que a matéria orgânica proveniente das células de cianobactérias é um importante precursor de subprodutos da desinfecção (DBP), incluindo trihalometanos totais (THM), ácidos haloacéticos (HAA) e emergentes DBPs nitrogenados (N-DBP), os quais contêm alta genotoxicidade e carcinogenicidade (FANG et al., 2010; LUI et al., 2011; YANG et al., 2011).

Considerando a capacidade de degradação de micropoluentes da água por agentes oxidantes, a adoção de processos oxidativos no tratamento é considerada como uma alternativa para produzir uma água segura para a população. Entretanto, invariavelmente, a aplicação de agentes oxidantes e desinfetantes no tratamento de água para abastecimento público, gera subprodutos. Um dos subprodutos da oxidação da matéria orgânica é o carbono orgânico assimilável (COA). A concentração de COA pode ser considerada como uma medida da estabilidade biológica da água para crescimento de microrganismos heterotróficos. São vários os estudos que relacionam o COA diretamente com o recrescimento microbiano e com a formação de biofilmes nos sistemas de distribuição da água de consumo (ROCHA, 2007). Além disso, a presença de COA pode vir a contribuir na formação de trihalometanos (THM).

A aplicação do processo UV/H₂O₂ para o tratamento de água com presença de cianobactérias, considerando-se uma etapa de pré-tratamento, pode contribuir para a formação de precursores de subprodutos da oxidação como o COA (a partir da oxidação parcial da matéria orgânica), o que diretamente influencia na formação

de subprodutos da desinfecção. Neste sentido, o controle dos parâmetros operacionais, tais como dosagem e tempo de contato, irá contribuir com a eficiência do processo, em que se espera obter uma reduzida formação de carbono orgânico assimilável e subprodutos. Diversos estudos avaliaram a formação de COA a partir da oxidação de matéria orgânica natural (MON), onde se constatou um aumento na concentração de COA após a oxidação pelo processo UV/H₂O₂ (BAHZRI; MOHSENI, 2016; METZ et al., 2010; PANTIN, 2009; SARATHY, 2010), porém, pouco se fala sobre a formação de COA proveniente das cianobactérias.

Considerando que a presença de cianobactérias em mananciais de abastecimento é cada vez mais constante e que a adoção de processos oxidativos em sistemas de tratamento de água é uma alternativa quando se considera a remoção de cianobactérias, compreender como esses microrganismos podem influenciar na formação de trihalometanos torna-se importante do ponto de vista de qualidade da água tratada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a contribuição de cianobactérias na formação de carbono orgânico assimilável (COA) por processo oxidativo UV/H₂O₂ e a sua influência na formação de trihalometanos (THM) em amostras de água de abastecimento.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer a metodologia de quantificação de carbono orgânico assimilável a partir de adaptação de método padronizado;
- Estimar a dosagem de H₂O₂ necessária para promover a oxidação da matéria orgânica e a formação de carbono orgânico assimilável;
- Avaliar a formação de carbono orgânico assimilável a partir do processo de oxidação UV/H₂O₂ e sua relação com a formação de subprodutos da desinfecção (DBPs) com cloro.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 *Cianobactérias*

As cianobactérias, também conhecidas como algas azuis ou cianofíceas, pertencem a um antigo grupo existente no planeta desde o surgimento da vida, há 3,5 bilhões de anos (YOO, 1995). Esses organismos desempenharam importante papel evolutivo e geológico no planeta e possuem grande importância ecológica, uma vez que são responsáveis pela produção primária e pela fertilidade dos corpos aquáticos e dos solos (RAI, 1990; SCHIRRMESTER et al., 2013).

As cianobactérias apresentam combinação de propriedades encontradas em algas e bactérias, uma vez que são organismos procariontes, não possuem núcleo nem estruturas definidas, assemelhando-se assim às bactérias, porém realizam fotossíntese produzindo oxigênio, como as algas (RAVEN; EICHHRN; EVERT, 2007). Algumas cianobactérias como as dos gêneros *Microcystis* sp., *Gomphosphaeria* sp., *Gloetrichia* sp., *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp., apresentam vacúolos gasosos (pseudovacúolos), os quais são associados à capacidade de controlar a flutuação da célula, o que permite que se mantenham em profundidade ótima em nutrientes, concentração de oxigênio e disponibilidade de luz (CALIJURI; ALVEZ; SANTOS, 2006). Além de apresentarem vacúolos gasosos, a necessidade de pouca luz para manter sua estrutura e funções celulares e a capacidade de estocar fósforo, possibilitam o seu crescimento mesmo em situações de baixa concentração de nutrientes e lhes conferem vantagens de sobrevivência em detrimento a outros grupos de algas (VON SPERLING; JARDIM, 2009).

Em decorrência de suas características fisiológicas e morfológicas, as cianobactérias são organismos que apresentam grande capacidade adaptativa nos mais diversos ambientes. São encontradas comumente em grande parte dos ambientes aquáticos do planeta, porém, também podem sobreviver em ambientes terrestres, como no solo e interior de rochas (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006). Segundo Guven e Howard (2011), mais de 2000 espécies de cianobactérias já foram identificadas em todo o mundo e estão presentes em diferentes ecossistemas, contando com excelentes habilidades para a sua sobrevivência.

As cianobactérias são também o principal componente de diversos ecossistemas aquáticos e terrestres. São importantes componentes na rede trófica, sendo altamente consumidas e metabolizadas por consumidores primários (ITURRIAGA; MITCHEL, 1986; JANSE et al., 2003). Nos oceanos, representam parcela significativa dos organismos diazotróficos e desempenham importante papel na síntese de nitrogênio orgânico (CAPONE, 2001). Em ambientes terrestres, as cianobactérias são, muitas vezes, pioneiras na colonização de rochas e solos inóspitos e exercem função chave na manutenção da integridade do solo de regiões áridas e semiáridas, bem como na fertilidade de terrenos agrícolas (WHITTON; POTTS, 2000).

Na maioria dos corpos d'água, as cianobactérias são componentes naturais (AZEVEDO et al., 2002), sendo os ambientes de água doce os mais favoráveis, visto que a maioria das espécies apresenta melhor crescimento em águas neutro alcalinas com pH entre 6 e 9, temperatura entre 15 e 30 °C e com alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (AZEVEDO, 1998). No entanto, o aumento da temperatura global e a redução da qualidade da água associada a condições de seca podem resultar em um crescimento populacional massivo e descontrolado das comunidades de cianobactérias, caracterizando-se assim a ocorrência de florações ou "bloom", conforme definido por Bittencourt-Oliveira e Molica (2003).

Apesar dos diferentes estudos na literatura, conforme descrito por Sant'Anna et al. (2006), não existe uma definição com relação ao número de células que caracteriza o fenômeno de floração. Domingues et al. (2011) mostraram que em uma floração de cianobactérias encontrada no Reservatório Costa e Silva, no Rio Grande do Sul, a densidade celular variou entre 22.162 e 191.858 cel mL⁻¹. Silva-Lins (2009), por sua vez, avaliou a qualidade do braço do Ribeirão Taquaraçu, no estado de Tocantins, nos anos de 2006, 2007 e 2008, e detectou a presença de florações de cianobactérias que variaram entre 22.016 e 237.500 cel mL⁻¹.

Em decorrência do aparecimento de florações em corpos hídricos, problemas com o tratamento de água potável envolvendo cianobactérias estão cada vez mais frequentes. Nas últimas décadas, a proliferação de cianobactérias tem ocorrido frequentemente em águas superficiais ao redor do mundo, tais como lagos, rios e reservatórios, sendo tais ocorrências associados ao fenômeno de eutrofização (HUISMAN, 2009; ISAACS et al., 2014; LAPOINTE et al., 2015; PAERL, 2009). Uma

recente floração de *Microcystis sp.* em reservatório na cidade de Toledo, Ohio, nos Estados Unidos por exemplo, interrompeu o abastecimento de água no local por 3 (três) dias no verão de 2014 e prejudicou mais de 400.000 habitantes (TANBER, 2014). Segundo, Harke et al. (2016), a *Microcystis aeruginosa*, objeto deste estudo, é uma das espécies de cianobactérias que formam florações com mais frequência em corpos d'água de água doce em todo o mundo. Do mesmo modo, é uma das espécies mais comuns de cianobactérias formadoras de florações no Brasil (SOARES et al., 2013).

Segundo Henderson et al. (2008), a principal consequência causada na água a partir da proliferação de cianobactérias em mananciais utilizados por estações de tratamento de água para abastecimento público, está relacionada com a matéria orgânica proveniente das células, incluindo a matéria orgânica extracelular e a matéria orgânica intracelular, gerada a partir da excreção metabólica e consequente produção de metabólitos secundários. Neste sentido, destacam-se aqueles que podem causar problemas organolépticos, conferindo sabor e odor à água (2-metilisoborneol e geosmina) e aqueles que podem afetar seriamente a saúde humana devido a seu elevado grau de toxicidade, como por exemplo, as cianotoxinas (HO; SAWADE; NEWCOMBE, 2012).

Além disso, estudos relatam que a matéria orgânica proveniente das células de cianobactérias são importantes precursores de subprodutos da desinfecção (DBPs), incluindo trihalometanos tradicionais (THMs), ácidos haloacéticos (HAAs) e emergentes DBPs nitrogenados (N-DBP), os quais contêm alta genotoxicidade e carcinogenicidade (FANG et al., 2010; LUI et al., 2011; YANG et al., 2011). Por serem ricas em nitrogênio orgânico na forma de proteínas, aminoácidos e aminas, as células de cianobactérias contribuem fortemente para a formação de subprodutos carbonáceos e nitrogenados como resultado da cloração (CUI et al., 2002).

Diante disso, os reservatórios de água utilizados para o abastecimento público que são sujeitos ao aparecimento de florações de cianobactérias precisam ser cuidadosamente monitorados. No Brasil, a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade cita que para minimizar os riscos de contaminação da água para consumo humano com cianotoxinas, deve ser realizado o monitoramento de cianobactérias, buscando-se identificar os diferentes gêneros, no ponto de captação do manancial superficial,

considerando, para efeito de alteração da frequência de monitoramento, o resultado da última amostragem.

Conforme indicado na Portaria nº 2.914/2011, os responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistemas de abastecimento supridos por mananciais superficiais devem monitorar a presença de cianobactérias no ponto de captação de água mensalmente, quando o número de células de cianobactérias foi inferior a 10.000 cel mL⁻¹ e semanalmente, quando o número de células de cianobactérias exceder este valor. Também exige que sempre que o número de cianobactérias exceder 20.000 cel mL⁻¹ seja realizada análise semanal das cianotoxinas na saída do tratamento (BRASIL, 2011).

A portaria nº 2.914/2011 não faz menção ao processo de tratamento que deve ser adotado em casos de contaminação do manancial de captação ou do sistema de tratamento, mas indica que os responsáveis pelo controle da qualidade da água devem elaborar e submeter para análise da autoridade municipal de saúde pública, o plano de amostragem de cada sistema e a solução adotada, respeitando os planos mínimos de amostragem descritos na Portaria (BRASIL, 2011).

Entretanto, deve-se tomar cuidado para que a intervenção não prejudique as células das cianobactérias, pois as cianotoxinas encontram-se predominantemente no interior das células viáveis (sadias) das cianobactérias tóxicas (toxinas intracelulares) e quando ocorre a lise da célula, seja pelo decaimento natural ou pela ação de ruptura das células exercidas por agentes químicos como o sulfato de cobre e oxidantes, a toxina intracelular é liberada para a coluna d'água (MIRANDA et al., 2017; STEFFENSEN et al., 1999; YOO, 1995). A lise celular, causada por algicidas para remover cianobactérias da água, já ocasionou a intoxicação grave e à morte de humanos (AZEVEDO et al., 2002). Por exemplo, uma lesão tóxica hepática foi encontrada nos consumidores de água potável proveniente de um reservatório em Armidale, na Austrália, onde uma floração de *Microcystis* foi remediada com sulfato de cobre (FALCONER et al., 1983).

Diante desta problemática, a Portaria nº 2.914/2011 complementa que em função dos riscos à saúde associados às cianotoxinas, fica proibido o uso de algicidas para o controle do crescimento de microalgas e cianobactérias no manancial de abastecimento ou qualquer intervenção que provoque a lise das células (BRASIL, 2011). Portanto, os métodos de remoção de cianobactérias em águas destinadas ao consumo humano, devem ser analisados em função da sua

capacidade de remover as células viáveis (biomassa algal) e de não promover a lise dessas células (GREENFIELD et al., 2014; MIRANDA, 2017; YOO, 1995).

3.2 Processos oxidativos e sua relação com a formação de trihalometanos

Os Processos Oxidativos Avançados (POAs) são conhecidos como tecnologias promissoras no tratamento de água e efluentes. São capazes de transformar muitas substâncias persistentes e dificilmente elimináveis, em substâncias ecologicamente inofensivas, biologicamente degradáveis ou, pelo menos, em substâncias que possam ser mais facilmente eliminadas por processos físico-químicos convencionais, apresentando como produtos finais do tratamento: CO₂, H₂O e íons inorgânicos (HIGARASHI et al., 2000).

Embora os sistemas reacionais de cada POA sejam diferentes, se resumem em converter compostos orgânicos complexos em moléculas simples, ou até mesmo mineralizar estes compostos. Estes processos consistem na utilização de um forte agente oxidante como, por exemplo, o ozônio (O₃), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e/ou catalisadores como o Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Dióxido de Titânio (TiO₂) na presença ou não de uma fonte de irradiação, para gerar radicais hidroxilas (•OH). Estes radicais são altamente reativos, de reduzida seletividade e capazes de atuar sobre uma grande diversidade de poluentes orgânicos e de até mineralizar substâncias orgânicas refratárias (ALATON; BALCIGLU; BAHNEMANN, 2002; HIGARASHI et al., 2000).

Como exemplo de POAs, têm-se os sistemas O₃/UV, reação Fenton ou Foto-fenton, ozonização, fotocátalise com dióxido de titânio (TiO₂) e a degradação via processo UV/H₂O₂, entre outros. Todos os processos citados se mostram alternativas viáveis no ponto de vista de eficiência, na remoção de compostos que não conseguem ser eliminados por meio de tratamentos convencionais (CRISTOVÃO et al., 2014; JARDIM; NOGUEIRA, 1998; URIGAN et al., 2012). Porém, vários estudos mostram que a aplicação de agentes oxidantes e desinfetantes no tratamento de água para abastecimento público, podem gerar subprodutos. Um dos precursores formados a partir da oxidação da matéria orgânica é o carbono orgânico assimilável (COA). Este pode ter influência na formação de subprodutos da desinfecção, como os trihalometanos, quando a água é submetida a

cloração na etapa de desinfecção. Apesar dos benefícios oriundos da desinfecção, o cloro e outros compostos oxidantes podem reagir com a matéria orgânica formando subprodutos de desinfecção que podem ser prejudiciais à saúde humana como os THMs (HONG, 2007). Segundo WHO (2005), os compostos do grupo de THM mais frequentes em águas de abastecimento são: clorofórmio ou triclorometano (CHCl_3), bromodiclorometano (CHCl_2Br), dibromoclorometano (CHClBr_2) e bromofórmio ou tribromoetano (CHBr_3).

Pelo fato de possuírem elevada toxicidade e por possuírem alto potencial carcinogênico e mutagênico, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA) em 1984 estabeleceram o valor máximo permitido (VMP) desses compostos sendo permitido até $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de trihalometanos totais (TTHM) em água de abastecimento público, porém, mais tarde esse valor foi reduzido para $80 \mu\text{g L}^{-1}$ (GOPAL et al., 2007; USEPA, 1999). No Brasil, a Portaria MS nº 2.914/2011 (BRASIL, 2011) regulamenta o padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde no que tange águas para consumo humano e estabelece o VMP para trihalometanos totais em $100 \mu\text{g L}^{-1}$, o que inclui triclorometano ou clorofórmio (TCM), bromodiclorometano (BDCM), dibromoclorometano (DBCM), tribromometano ou bromofórmio (TBM).

Diversos estudos mostram que, além das substâncias húmicas às quais tradicionalmente se atribui a formação de THM, as algas também se constituem em potenciais precursores de trihalometanos (CORAL et al., 2013; FANG et al., 2010; LIU et al., 2011). As primeiras observações publicadas a respeito da possibilidade de algas serem precursoras de THM foram reportadas por Morris e Baum (1978). Esses autores demonstraram que a cloração de matéria orgânica proveniente das algas poderia produzir clorofórmio. Segundo Graham et al. (1998), a produção de THM a partir de microalgas e cianobactérias depende da espécie e da fase do ciclo de vida da cultura, sendo que a maior produção, por unidade de biomassa algal, ocorre durante a fase de crescimento exponencial desses organismos.

Mais recentemente, Coral et al. (2013) investigaram o mecanismo de ação do ozônio em células de *M. aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae* cultivadas em laboratório e a potencialidade de formação de subprodutos da desinfecção e observaram um aumento da concentração de carbono orgânico extracelular para ambas as espécies, bem como um aumento na formação de THM e HAA após oxidação com ozônio. Liu et al. (2011), em estudos de cloração com *M. aeruginosa*,

também indicaram a formação de THM derivado da matéria orgânica extracelular de cianobactérias. Em estudos também com células de *M. aeruginosa*, Fang et al. (2010) avaliaram a contribuição da matéria orgânica intra e extracelular das células na formação de subprodutos da desinfecção. Todos esses resultados confirmam que a oxidação de células de cianobactéria pode impactar significativamente na formação de subprodutos da cloração em certas condições, especialmente quando a concentração de células é elevada. Por esta razão, torna-se importante a avaliação da formação de trihalometanos provenientes de células de cianobactérias durante o processo oxidativo.

3.2.1 Aplicação do processo oxidativo UV/H₂O₂ na remoção de matéria orgânica natural

A utilização de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em processos de tratamento de água possui vantagens expressivas, pois além de apresentar forte poder oxidativo, este oxidante demanda baixo capital de investimento se comparado a outras tecnologias, possui estabilidade térmica, apresenta solubilidade elevada em água, é de fácil armazenamento, tem disponibilidade comercial, além de não gerar subprodutos como halogenados ou íons bromato ao final do tratamento (IKEHATA; EL-DIN, 2006). Porém, a utilização do peróxido de hidrogênio em oxidações, muitas vezes demanda uma ativação como suporte, para que se obtenham índices de conversão satisfatórios. Por isso, a formação de radicais livres é estimulada através da radiação ultravioleta (UV) e/ou da adição de agentes ativadores como indicado nos estudos de Hassemer (2006).

O processo de fotodegradação via peróxido de hidrogênio combinado com a luz ultravioleta, se torna muito mais eficiente do que quando usados isoladamente, pois a geração de radicais hidroxila (\bullet OH) é consideravelmente maior, sendo estes menos seletivos ao composto alvo e capazes de converter uma grande variedade de compostos orgânicos em CO₂ e ácidos minerais, o que torna esse processo, assim como os demais POAs, mais vantajoso (JARDIM; TEIXEIRA, 2004; SHARMA et al., 2012).

A radiação ultravioleta é um mecanismo físico de desinfecção, no qual a radiação UV é absorvida pelos diferentes componentes orgânico-moleculares

essenciais ao funcionamento normal da célula. A ação germicida da radiação UV está associada às alterações estruturais que esta provoca no material genético (DNA e RNA) das células (WEF, 1996). Assim, a célula não consegue se reproduzir e por isso, diz-se que ocorre a inativação e não a morte do organismo.

A fonte primária de radiação ultravioleta é o sol, mas também pode ser emitida por lâmpadas incandescentes e fluorescentes, solda elétrica, maçarico de plasma, telas de computadores e equipamentos a laser (DANIEL, 1992). Segundo Oliveira (2003), a radiação ultravioleta abrange uma pequena parte do espectro eletromagnético, envolvendo o uso de radiação eletromagnética a partir do espectro de 100-400 nm e, em relação aos efeitos biológicos é classificada como UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) e UV-C (100-280 nm).

A faixa UV-A (320 a 400 nm) é a menos perigosa, devido à baixa energia. É utilizada para causar fluorescência em materiais sendo muito aplicado em fototerapia e câmaras de bronzeamento. A chamada “luz negra” encontra-se nesta faixa (RYER, 1997). A faixa UV-B (280 a 315 nm) é a mais destrutiva forma da luz UV, porque tem energia suficiente para gerar danos em tecidos biológicos e em quantidade mínima para não ser completamente absorvida na atmosfera. A radiação UV-B é conhecida como causadora do câncer de pele (RYER, 1997).

Já a faixa UV-C (100 a 280 nm) é a faixa aplicada como germicida. Os fótons de luz nesta faixa têm tanta energia, que a mesma é completamente absorvida no ar em poucas centenas de metros (RYER, 1997). O intervalo de comprimento de onda compreendido entre 240-285 nm é considerado a faixa germicida ótima para inativação de bactérias, pois a absorção de radiação UV pelas células é máxima nesta faixa (BASTOS, 2007; KEYSER et al., 2008; TINÔCO, 2011).

A presença de matéria orgânica natural (MON), incluindo células de cianobactérias, em águas destinadas ao abastecimento público, coloca vários desafios à prática comercial do processo UV/H₂O₂ para remoção de micropoluentes (BAZRI; BARBEAU; MOHSENI, 2012). As condições UV/H₂O₂ comercialmente viáveis aplicadas para remover microcontaminantes muitas vezes não são suficientes para eliminar/mineralizar a MON (SARATHY; MOHSENI, 2007, 2009; SARATHY; BAZRI, MOHSENI, 2011). Dentro das condições comerciais aplicadas (ou seja, UV até 2000 mJ cm⁻² e [H₂O₂] até 20 mg L⁻¹), a matéria orgânica sofre

mudanças estruturais e/ou transformações que posteriormente afetam a qualidade da água a jusante (SARATHY; MOHSENI, 2007, 2009).

Além disso, muitas pesquisas têm se concentrado no uso de UV/H₂O₂ para a remoção de matéria orgânica natural na tentativa de reduzir a formação de subprodutos de desinfecção (DBPs). Sob condições fortes de oxidação (tempo de irradiação longo e concentração inicial de H₂O₂ elevada), alguns estudos indicam que a MON pode ser mineralizada, levando a uma redução na formação de DBP (LIU et al. 2002; THOMSON et al., 2004; TOOR; MOHSENI, 2007; WANG et al., 2006). Estes estudos empregaram altas fluências UV e/ou concentrações de H₂O₂, bem acima da gama de condições tipicamente aplicadas para a oxidação de poluentes orgânicos na água potável (até 1500 mJ cm⁻² e 20 mg L⁻¹ H₂O₂).

Diante da escassez de trabalhos que avaliaram a formação de compostos orgânicos assimiláveis e subprodutos da desinfecção a partir de processo UV/H₂O₂ no tratamento de água com células de cianobactérias, torna-se importante avaliar o quanto estes microrganismos contribuem na formação destes compostos para auxiliar na criação de medidas de controle da qualidade da água, quando contaminada por estes microrganismos.

3.3 Carbono orgânico assimilável

Segundo Di Bernardo e Dantas (2005), o carbono orgânico assimilável (COA) pode ser considerado um subproduto da oxidação da matéria orgânica presente na água tratada. Em outros termos, o COA é uma fração da concentração total de carbono orgânico (COT) presente na água e é tipicamente a fração mais facilmente degradável, por serem compostos de pequena massa molecular. O COA normalmente contempla apenas uma pequena fração (0,1 - 9%) do COT que pode ser consumido por estirpes específicas ou misturas definidas de bactérias como fonte de carbono para o seu desenvolvimento (VAN DER KOOIJ, 1992).

A concentração de COA pode ser considerada como uma medida da estabilidade biológica da água para o crescimento de microrganismos heterotróficos, ou seja, microrganismos que não são capazes de produzir seu próprio alimento (ESCOBAR; RANDAL, 2001). Alguns estudos relacionam o COA diretamente com o recrescimento microbiano e com a formação de biofilmes nos sistemas de

distribuição da água de consumo (ESCOBAR et al., 2001; VAN DER KOOIJ, 2002). Kaplan, Bott e Reasoner (1993) consideraram que uma água é biologicamente estável quando apresenta valores entre 10 e 50 µg de COA L⁻¹.

A quantificação de COA é normalmente realizada utilizando-se bioensaio, em que bactérias específicas são cultivadas em uma amostra de água e enumeradas ao longo do tempo para determinar a densidade máxima de células. A concentração de COA é então calculada a partir da densidade máxima da cultura dividindo por um fator de rendimento obtido a partir do crescimento do organismo num substrato definido (acetato e/ou oxalato). De acordo com o método originalmente proposto por van der Kooij et al. (1982), a estirpe *Pseudomonas fluorescens* P-17 (P-17) é o organismo recomendado nesta análise, devido à sua versatilidade no uso de uma grande variedade de compostos orgânicos para crescimento, incluindo aminoácidos e carboidratos. Porém, este microrganismo não metaboliza ácidos carboxílicos e o ácido oxálico, um dos compostos frequentemente produzidos durante o tratamento da água com ozonização (VAN DER KOOIJ, 1982), por exemplo. Visto que outros compostos presentes na amostra podem não ser consumidos pela P-17, a estirpe *Spirillum* sp. NOX (NOX), cujo crescimento ocorre principalmente em presença de ácidos carboxílicos e é capaz de utilizar o oxalato, é adicionado à amostra de forma a expandir a gama de substratos do teste, a fim de fornecer uma informação mais completa da concentração de COA na amostra de água (VAN DER KOOIJ; HIJNEN, 1984).

De acordo com método descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), que tem como base a metodologia criada por Van der Kooij (1988), as amostras de água são coletadas em frascos livres de carbono e suplementadas com tiosulfato de sódio, para inativar o cloro residual que possa estar presente e inibir o crescimento de bactérias indesejáveis, e pasteurizadas para inativar a microflora nativa. Após a pasteurização, as amostras de água são inoculadas a partir de um inóculo estoque (suspensões individuais de cada estirpe teste) com 500 UFC mL⁻¹ da P-17 e NOX e incubadas a 15 °C durante 9 dias. O crescimento microbiano é quantificado nos dias 7, 8 e 9 por plaqueamento em ágar nutritivo. O resultado está, portanto, relacionado com o crescimento dos microrganismos teste em soluções puras de acetato (P-17) ou oxalato (NOX) por meio de valores de rendimento determinados empiricamente, e o resultado final é dado como equivalentes de C-acetato. O número de organismos em fase

estacionária é assumido ser o máximo que pode ser suportado pelos nutrientes na amostra, e o rendimento em acetato é assumido ser igual ao rendimento em COA.

Desde que o método para quantificação de COA foi publicado, vários pesquisadores introduziram inovações destinadas a acelerar e otimizar o método. Por exemplo, Kaplan et al. (1993) sugeriram o uso de frascos livres de carbono disponíveis comercialmente. Lechevallier et al. (1993) propuseram a utilização de uma densidade de inóculo mais elevada (10^4 cel mL⁻¹ vs 500 UFC mL⁻¹) e uma temperatura mais elevada de incubação (20-22 °C vs 15 °C), a fim de reduzir o tempo de incubação de 9 dias no método original para três ou quatro dias.

De forma a permitir uma quantificação de microrganismos mais rápida, Hammes e Egli (2005) demonstraram o uso de citometria de fluxo como uma alternativa viável à técnica de plaqueamento para a quantificação dos microrganismos. A citometria de fluxo é considerada um método rápido e preciso para contagem de células individuais em populações homogêneas ou heterogêneas, o que permite o processamento de um grande número de amostras com elevada precisão. Possibilita também mensurações simultâneas de múltiplos parâmetros celulares, tanto estruturais quanto funcionais, sendo geralmente baseadas na dispersão de luz e fluorescência (JEPRAS; CARTER; PEARSON, 1995).

Os experimentos realizados por Hammes e Egli (2005) utilizando a citometria de fluxo, dizem respeito principalmente à preparação de inóculo proveniente de consórcio natural, em alternativa ao uso de estirpes específicas como a P-17 e a NOX. Hammes et al. (2007), avaliaram a formação de COA proveniente da matéria orgânica de fitoplâncton após ozonização utilizando a citometria de fluxo em conjunto com um consórcio microbiano natural. Elhadidy et al. (2016) também utilizaram esta metodologia para avaliar a formação de COA e monitorar a qualidade da água de um reservatório de abastecimento, e os autores obtiveram resultados satisfatórios com a aplicação da metodologia.

Hammes e Egli (2005) também demonstram a possibilidade de quantificação de P-17 pela citometria de fluxo, embora a NOX não seja contemplada. A possibilidade de uso da citometria de fluxo para a quantificação desses microrganismos nas amostras tem como princípio a redução do tempo de análise e uma quantificação mais precisa e por isso, o interesse em realizar a adaptação da metodologia. Mais recentemente, Aggarwal e Jeon (2015) testaram a viabilidade em se utilizar um contador de partículas em comparação com a citometria de fluxo para

a quantificação das duas estirpes, P-17 e NOX, porém não foi obtido sucesso com o uso do contador de partículas para a enumeração de células da estirpe NOX, o que se deve ao seu tamanho relativamente pequeno. O tamanho médio das células de NOX medido por Aggarwal e Jeon (2015) foi de $0,51 \pm 0,03 \mu\text{m}$ enquanto o tamanho médio das células de P-17 foi de $0,68 \pm 0,09 \mu\text{m}$.

3.3.1 Formação de carbono orgânico assimilável a partir de algas e cianobactérias

Quando da ocorrência de fitoplâncton em altas quantidades, o que inclui algas e cianobactérias, verifica-se a presença da chamada matéria orgânica algogênica (MOA) nas águas superficiais, encontrada em diferentes formas e concentrações. A MOA compreende a matéria orgânica intracelular (MOI) gerada pela autólise das células e constituída por proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e pequenas moléculas como matéria orgânica extracelular (MOE), formada pela excreção metabólica e composta normalmente por polissacarídeos (FOGG, 1983).

As cianobactérias e as diatomáceas causam dificuldades no controle do carbono orgânico dissolvido devido à liberação de MOE e MOI na água por lise celular. Além disso, a MOA não é facilmente degradada, tanto quimicamente quanto biologicamente, a partir das técnicas convencionas de tratamento de água (FOGG, 1983).

A existência de MOA composta de substâncias como o ácido glicólico, carboidratos, aminoácidos e fósforo orgânico pode ser capaz de causar um aumento na concentração de carbono orgânico assimilável (COA) nas águas de abastecimento. Conseqüentemente, as algas e a matéria orgânica extracelular podem ser precursores de subprodutos de desinfecção (DBPs), como os trihalomentanos (HEM; EFRAIMSEN, 2001).

Segundo Hammes et al. (2007), o fitoplâncton pode contribuir substancialmente para a carga de carbono orgânico quando a água de superfície é utilizada como fonte para o tratamento de água potável. Os mesmos autores investigaram a formação de carbono orgânico dissolvido (COD) a partir da ozonização de uma cultura pura de *Scenedesmus vacuolatus* em condições laboratoriais definidas e concluíram que a ozonização de algas causou um aumento

substancial na concentração de COD e COA, quase instantaneamente após a exposição ao ozônio. Como resultado da exposição ao ozônio, as células algais encolheram-se, sem se desintegrarem completamente, sugerindo que o COD do citoplasma da célula saía através da membrana celular comprometida. Foi ainda ilustrado que a composição específica do COA recém-formado (como concentração de ácidos orgânicos, aldeídos e cetonas) na água oxidada do lago diferiu na presença e ausência de biomassa de algas adicionais.

Kim, Kim e Qureshi (2011) realizaram um estudo sobre a formação de carbono orgânico assimilável (COA) derivado de matéria orgânica algogênica, proveniente em especial de cianobactérias, em diferentes corpos hídricos. Os autores mostraram que mudanças sazonais na concentração de COA na barragem de Kamafusa, no Japão, foram dependentes do número de células. Além disso, constataram que o COA incluído na MOE não foi facilmente removido por cloração, diferindo-se do COA incluído na matéria orgânica intercelular (MOI), liberada das células de cianobactérias, que foi facilmente removida em condições onde o cloro residual foi detectado.

Ramseier (2010) estudou a formação de COA em água com células de cianobactérias durante tratamento oxidativo, e avaliou a formação do COA em relação a diferentes oxidantes, como o permanganato, cloro e ozônio. Os autores observaram que o tratamento de água contendo cianobactérias com ozônio e permanganato produziu uma concentração de COA significativamente maior do que o tratamento de água sem células. Além disso, sugeriram dois mecanismos para explicar a produção de COA pela oxidação de células: (i) danos da membrana celular pelo oxidante e posterior lixiviação de constituintes celulares facilmente biodisponíveis; e (ii) oxidação de material celular inicialmente não assimilável para compostos melhor assimiláveis.

Neste contexto, torna-se importante examinar variações nas concentrações de COA em águas para abastecimento público, bem como compreender as características do COA derivado do fitoplâncton, como as cianobactérias.

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Tratamento e Potabilização de água (LTPA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, e contou com o auxílio do Laboratório de Virologia do ICC – Fio Cruz Paraná e, com o laboratório de Análises Ambientais do SENAI Curitiba.

4.2 Cultivo laboratorial de cianobactérias

Uma cepa da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, produtora de toxina, cedida pela Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (UNESP - SP), foi cultivada no Laboratório de Tratamento e Potabilização da Água – LTPA da UTFPR campus Curitiba, de forma a possibilitar a realização dos ensaios propostos. Os microrganismos foram cultivados em meio de cultura ASM-1 e mantidos em ambiente climatizado a 26 ± 1 °C, aeração constante e sob regime de foto-período de 16/8 (16 horas claro e 8 horas escuro) (Figura 1). Para a realização dos ensaios, o cultivo foi utilizado em fase de crescimento exponencial, ou seja, fase em que a reprodução celular encontra-se extremamente ativa e apresenta maior atividade metabólica da célula, que neste caso corresponde a aproximadamente 20 a 23 dias.

Figura 1 - Foto da câmara de cultivo de cianobactérias do Laboratório de Tratamento e Potabilização de Água



Fonte: O autor (2016).

4.3 Água de estudo

De forma a evitar que variações na qualidade inicial da água interferissem na determinação dos resultados ao longo do estudo e mostrar a formação de THM proveniente da matéria orgânica das células de cianobactérias foi utilizada uma "água sintética", produzida a partir da adição de alguns sais inorgânicos (MgSO_4 , NaHCO_3 , KCl e $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (USA, 2002) e por células de *M. aeruginosa*, sendo estas, a única fonte de carbono presente na água.

Adotou-se a densidade celular de $250.000 \text{ cel mL}^{-1}$ e pH próximo a neutralidade. Para isso, a cada ensaio um volume de aproximadamente 100 mL de cultivo de *M. aeruginosa* foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, ressuspenso em água sintética, agitado em Vortex e encaminhado para determinação da densidade celular. A contagem foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico. Após cada contagem, calculou-se o volume de cultivo necessário para o preparo da água de estudo e adicionou-se o cultivo e a água sintética em balão volumétrico de 1 litro. Após o preparo da água de estudo, o pH foi medido para verificar se este estava próximo da neutralidade.

A escolha da densidade teve como base a Portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), que estipula a densidade de $20.000 \text{ cel mL}^{-1}$ como o limiar para que a frequência de monitoramento em um manancial de água aumente de mensal para semanal, diante disso optou-se por trabalhar com uma densidade que fosse acima do limiar estabelecido pela Portaria e que caracterizasse uma floração de cianobactérias.

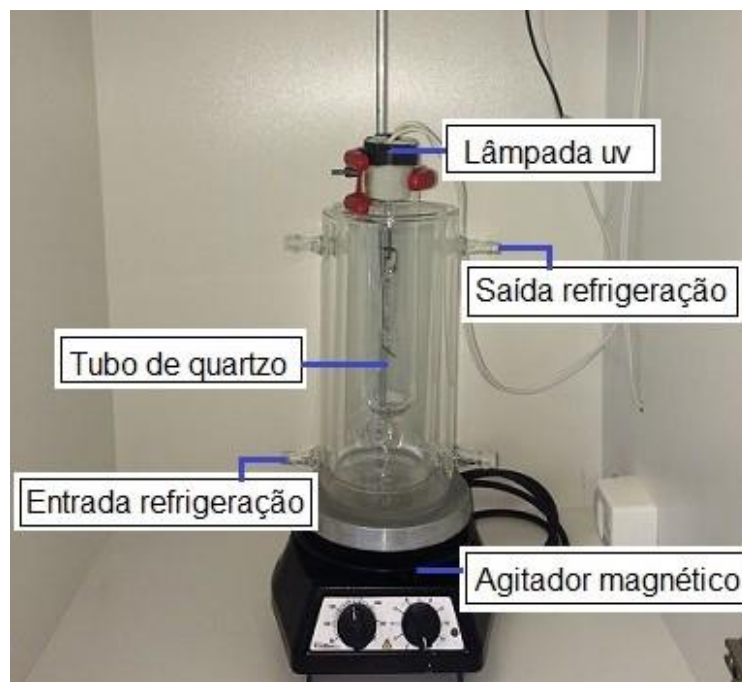
4.4 Equipamentos

4.4.1 Reator foto-oxidativo

Os experimentos foto-oxidativos UV/ H_2O_2 foram realizados em um reator de bancada, construído em vidro encamisado e com volume útil de 0,75 L. A radiação UV foi obtida a partir de uma lâmpada de mercúrio policromática de alta pressão (125 W) suportada por um tubo de quartzo, o qual permaneceu mergulhado no líquido amostral, permitindo a irradiação do seu interior de forma uniforme. O reator

apresenta na sua configuração parede dupla, permitindo sua associação a um sistema de refrigeração, de forma a evitar o sobreaquecimento da lâmpada e do líquido. Para que a amostra permanecesse em constante agitação durante os ensaios, o reator foi instalado sobre um agitador magnético (Figura 2). Os ensaios foram realizados em batelada durante 90 minutos.

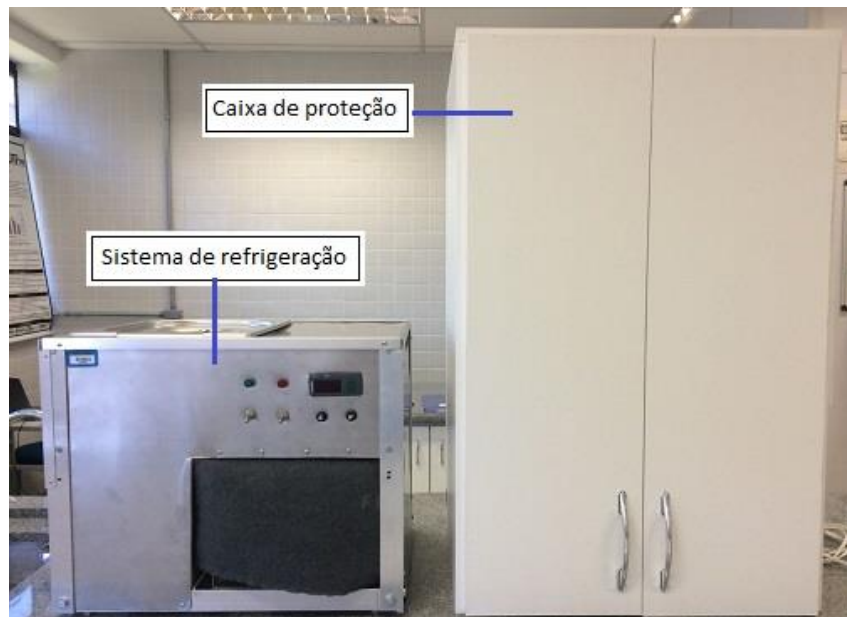
Figura 2 - Foto do reator fotoquímico utilizado nos experimentos de oxidação UV/H₂O₂



Fonte: O autor (2016).

Como medida de segurança com relação à exposição do usuário a radiação ultravioleta, o sistema foto-oxidativo permaneceu dentro de uma caixa de proteção construída em madeira, adaptada quanto à instalação elétrica, incluindo o reator conectado à lâmpada, além de aberturas laterais que permitiram o acesso de cabos e tubulações que foram necessárias. A refrigeração do sistema foto-oxidativo foi realizada por meio de um banho termostatizado com bomba de recirculação, o qual permitiu manter a temperatura no interior do reator a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 3).

Figura 3 - Foto do sistema de refrigeração e caixa de proteção utilizada para os ensaios de oxidação UV/H₂O₂

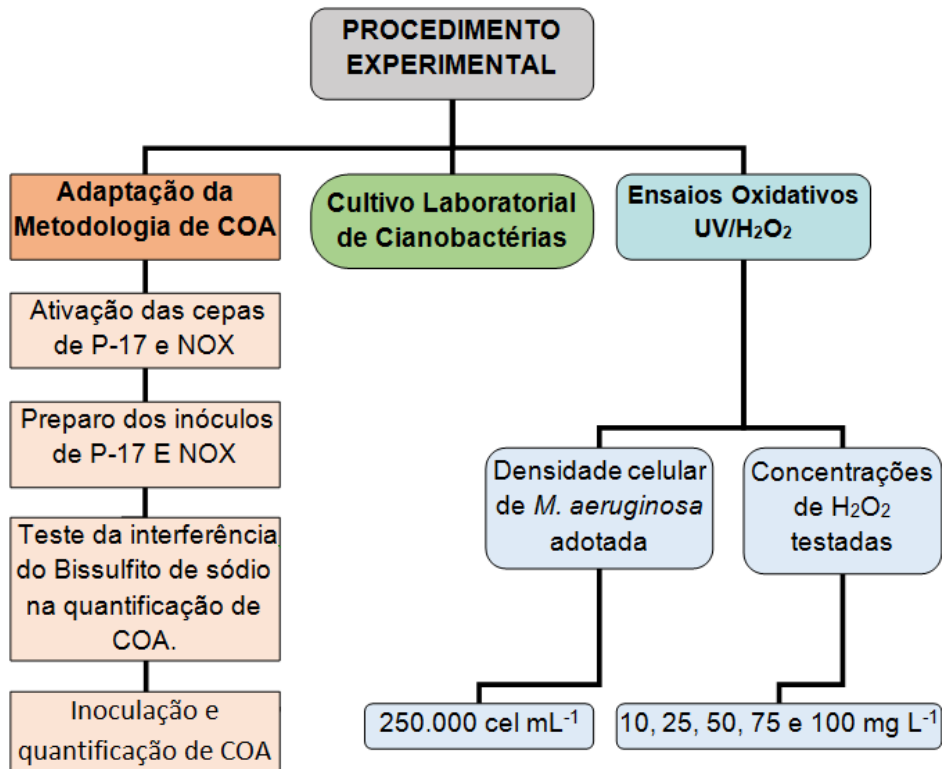


Fonte: O autor (2016).

4.5 Procedimento experimental

Para melhor entendimento, a metodologia foi dividida em três etapas distintas, porém, vale ressaltar que em determinados momentos da pesquisa estas ocorreram de forma simultânea. O procedimento experimental consistiu na Adaptação da Metodologia de determinação de carbono orgânico assimilável (COA), no cultivo laboratorial das cianobactérias utilizadas nos testes, bem como no estudo do processo foto-oxidativo UV/H₂O₂ quanto ao comportamento do processo na formação de COA na presença de células de cianobactérias, e a contribuição destas na formação de subprodutos da desinfecção (trihalometanos) em amostras de água. Na Figura 4 tem-se representado o fluxograma resumido das etapas desenvolvidas ao longo da pesquisa.

Figura 4 - Fluxograma do procedimento experimental



Fonte: O autor (2016).

4.5.1 Adaptação da metodologia para quantificação de COA

A metodologia utilizada nos ensaios para a determinação de COA teve como base o método descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (9217-B): "Pseudomonas fluorescens Strain P-17, Spirillum Strain NOX Method"* (9217 A) (APHA, 2005), a qual utiliza as estirpes P-17 e NOX para a quantificação de COA por meio de contagem em placas, em conjunto com o Método Eawag descrito por Hammes e Egli (2006), o qual utiliza a Citometria de Fluxo como método de contagem de células. Ambas as metodologias utilizadas foram adaptadas às condições do presente trabalho. A principal adaptação necessária para a realização do trabalho está no fato de que foram utilizadas as estirpes P-17 e NOX para a quantificação de COA assim como no primeiro método citado, porém, o método de contagem celular foi feito a partir de citometria de fluxo assim como no segundo método citado, por reduzir o tempo dos ensaios e ser um método de

contagem mais confiável e que envolve menos erros em vista da contagem por plaqueamento.

A quantificação de COA se baseia na medição do crescimento de duas estirpes bacterianas, *Pseudomonas fluorescens* P-17 (ATCC 9642) e *Spirillum* sp. NOX (ATCC 49643) até a saturação de um nutriente que seja essencial para o seu desenvolvimento. Quando o nutriente que é consumido até a sua saturação é o carbono, o crescimento das estirpes reflete a concentração de carbono no meio, neste caso, as amostras de água analisadas. O bioensaio quantifica a densidade celular quando a cultura alcança a fase estacionária, ou seja, a concentração máxima obtida numa cultura, sendo a própria amostra o meio de cultura (APHA, 2005).

A densidade celular das estirpes P-17 e NOX foi determinada a partir da contagem por citometria de fluxo realizada no laboratório da Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz), localizada na Cidade de Curitiba, Paraná. O Equipamento utilizado foi um citômetro de fluxo da Marca Becton and Dickinson, modelo: FACSCanto II, laser 488, 405 e 640 nm, e filtros FSC (tamanho celular) e SSC (complexidade celular) (488/10 e 488/10) (Figura 5).

Figura 5 - Foto do Citômetro de Fluxo utilizado para contagem celular das amostras de inóculos puros de P-17 e NOX, bem como das amostras de água analisadas após processo oxidativo



Fonte: Fiocruz Paraná, 2016.

4.5.1.1 Preparo dos materiais livres de carbono

Toda vidraria e materiais utilizados para a realização dos testes de determinação de COA devem ser livres de carbono. Para isto, os materiais foram lavados com detergente neutro, enxaguados com água e em seguida deixados em banho de ácido clorídrico HCl 0,1 N por 60 minutos e enxaguados três vezes com água ultrapura. Esperou-se secar a temperatura ambiente e toda vidraria foi envolvida com papel alumínio e colocada na mufla a 550 °C durante 6 horas. Já os materiais que não poderiam ser colocados na mufla, foram imersos em solução de persulfato de sódio 10% (p/v) a 60 °C por 60 minutos e após o resfriamento, enxaguados três vezes com água ultrapura.

4.5.2 Ativação das cepas de *Pseudomonas fluorescens* (P-17) e *Spirillum NOX* (NOX)

As cepas dos microrganismos utilizados para a quantificação de COA foram adquiridos através da ATCC (American Type Culture Collection) e ativadas no Laboratório de Microbiologia da UTFPR. A ativação foi realizada por meio da inoculação em placas primárias tanto da *Pseudomonas fluorescens* (ATCC49642) quanto da *Spirillum NOX* (ATCC49643) em meio ágar nutriente e incubação em estufa bacteriológica a 25 °C. A cepa P-17 possui um tempo de crescimento de 24 a 48 horas, já a NOX de aproximadamente 6 (seis) dias em meio sólido. Após o crescimento dos microrganismos nas placas, estas foram utilizadas para inocular as cepas de forma independente em tubos com R2 ÁGAR inclinado, modelo K25-610129-KASVI, com a seguinte composição: 0,5 g L⁻¹ de peptona proteose, 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g L⁻¹ de digestão ácida de caseína, 0,5 g L⁻¹ de glicose, 0,5 g L⁻¹ de amido solúvel, 0,3 g L⁻¹ de piruvato de sódio e 15 g L⁻¹ de Agar, pH final a 25 °C igual a 0,2 ± 0,2. Estes foram incubados a 25 °C até o crescimento das colônias de acordo com cada tempo de crescimento e armazenados na geladeira para posterior uso.

4.5.3 Preparo dos inóculos de P-17 e NOX e determinação do estágio estacionário de crescimento

O preparo dos inóculos foi baseado na metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (9217-B): "Pseudomonas fluorescens Strain P-17, Spirillum Strain NOX Method"* (9217 A) (APHA, 2005).

Foram preparadas suspensões individuais de cada uma das culturas utilizadas, P-17 e NOX. Para isso, adicionou-se 2 a 3 mL de água ultrapura aos tubos de culturas puras em meio ágar R2 inclinado citados na seção anterior. A água ultrapura foi previamente autoclavada, filtrada com filtro de seringa (poro 0,22 µm). Posteriormente, os tubos foram agitados para promover a transferência das colônias de P-17 e NOX do ágar para a água e a partir dessa suspensão, transferiu-se 100 µL de cada cultura para frascos individuais com 50 mL de água destilada filtrada. Como fonte de carbono, adicionou-se 125 µL de acetato de sódio (400 mg acetato-C L⁻¹) aos frascos contendo 50 mL de água, de forma que a suspensão apresentasse concentração de 1 mg acetato-C L⁻¹. As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 25 °C até que se atingisse o estado estacionário, ou seja, quando a densidade celular dos microrganismos se torna constante a partir de certo tempo de incubação.

Para determinação do estado estacionário de cada cultura (P-17 e NOX) realizou-se a cinética de crescimento dos microrganismos por 120 horas. Para isso, foram preparados, em triplicata, frascos com as suspensões individuais (inóculos) de P-17 e NOX como descrito anteriormente. Destes frascos foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação. Para cada tempo analisado, foram retiradas alíquotas de 3 (três) frascos e estes mesmo frascos foram guardados na geladeira após o preparo das amostras. As amostras de cada tempo foram preservadas em paraformaldeído 1,5% na geladeira até a data da quantificação no citômetro de fluxo. Após a obtenção da curva de crescimento e do tempo de incubação necessário para que o inóculo atingisse o estágio estacionário, os frascos dos inóculos correspondentes ao tempo de incubação que haviam sido previamente guardados, permaneceram na geladeira para serem utilizados nos ensaios posteriores. De acordo com APHA (2005), os inóculos de P-17 e NOX podem ser mantidos em geladeira por até 6 (seis) meses a 5 °C.

4.5.4 Preparo das amostras para quantificação de COA

A concentração de COA foi determinada em triplicata, a partir de amostras coletadas no início (tempo zero) e no final do processo oxidativo UV/H₂O₂. As amostras foram coletadas em frascos de vidro de 60 mL (50 mL de amostra) livres de carbono. Em seguida, foram filtradas utilizando filtro de seringa com membrana de polietersulfona (PES) (poro de 0,22 µm, livre de carbono) e pasteurizadas a 70 °C por 60 minutos para inativar a possível microbiota presente nas amostras, de acordo com metodologia utilizada por Hammes e Egli (2005).

Após a pasteurização e resfriamento das amostras, as mesmas foram inoculadas com 100 µL de uma suspensão individual das estirpes teste P-17 e NOX, de modo que a amostra tivesse uma densidade celular de 1×10^4 cel mL⁻¹. Para isso, previamente aos ensaios, realizou-se a contagem da densidade celular dos inóculos de P-17 e NOX preparadas conforme descrito anteriormente. Após a inoculação, as amostras foram incubadas por 96 horas a temperatura de 25 °C em estufa bacteriológica, para que a cultura atingisse o estado estacionário. Após esse período, uma alíquota de cada amostra foi coletada, transferida para um tubo de citometria e preservadas em paraformaldeído 1,5%. Após o preparo, as amostras foram mantidas na geladeira até a data da leitura no citômetro de fluxo, não ultrapassando um período de 5 (cinco) dias. A sequência do procedimento utilizado para a quantificação de COA pode ser observada na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma da sequência do procedimento utilizado para a quantificação de COA.



Fonte: O autor (2017).

A concentração de células bacterianas em fase estacionária está relacionada com a concentração de COA que foi consumida, por meio de um valor teórico de conversão proposto por Hammes e Egli (2006) em que: 1 µg de COA equivale a 1×10^7 células, resultando na fórmula de conversão descrita no método Eawag de Hammes e Egli (2006):

$$\text{AOC } (\mu\text{gC L}^{-1}) = \frac{\text{Crescimento celular L}^{-1}}{1 \times 10^7 \text{ (células } \cdot \mu\text{gC}^{-1})}$$

Através desta equação, o número de células presentes nas amostras foi convertido em COA, em µgC L⁻¹.

De acordo com a metodologia utilizada por Hammes et al. (2006), primeiramente calculou-se a média líquida da densidade celular, ou seja, a diferença entre a densidade de célula medida na fase estacionária e a densidade celular diretamente após a inoculação. E a partir disso, converteu-se o valor da média

líquida da densidade celular em equivalentes de carbono utilizando a equação anteriormente citada.

4.5.5 Efeitos de um agente de extinção do H₂O₂ na quantificação de COA

Em ensaios de quantificação de COA, a presença de H₂O₂ residual (> 0,2 ppm) nas amostras pode inibir o crescimento dos microrganismos e levar a uma quantificação de COA incorreta (BAZRI; BARBEAU; MOHSENI, 2012; BAZRI; MOHSENI, 2013; SARATHY, 2009). Por esta razão, torna-se crítico remover o H₂O₂ residual após o tratamento oxidativo UV/H₂O₂ e anteriormente aos bioensaios. Neste sentido, faz-se necessário o uso de um agente que interrompa a reação do H₂O₂ nas amostras analisadas e consiga extinguir qualquer residual que possa ter ficado nas amostras. No presente estudo, optou-se por avaliar o efeito do Bissulfito de sódio (NaHSO₃), composto químico comumente utilizado para neutralizar a ação do H₂O₂. Porém, este pode exercer função antimicrobiana no meio onde é adicionado, ou seja, uma vez adicionado nas amostras de água oxidada, pode interferir no crescimento dos microrganismos (P-17 e NOX) utilizados para a quantificação de COA. Diante disso, realizou-se uma avaliação da interferência do bissulfito de sódio no crescimento dos microrganismos através do preparo de amostras sem e com a presença do reagente, para comprovar se este prejudicaria a quantificação de COA nas amostras analisadas.

Para o teste, um volume de 750 mL de água de estudo foi oxidada no reator UV com 100 mg L⁻¹ de H₂O₂ por 90 minutos. Ao final da oxidação, a água de estudo foi transferida para frascos (livres de carbono) de 60 mL com 50 mL de amostra. Parte dos frascos foram suplementados com uma solução de bissulfito de sódio (NaHSO₃) em uma proporção de 3,06 mg de NaHSO₃/mg de H₂O₂ para que a reação fosse finalizada. Outra parte das amostras foram mantidas sem NaHSO₃. Posteriormente, todas as amostras foram filtradas em filtro de seringa (0,22 µm) e pasteurizadas a 70 °C por 30 min., seguindo a metodologia para quantificação de COA descrita anteriormente (4.5.4). Após o resfriamento, as amostras foram inoculadas individualmente com 100 µL dos inóculos de P-17 e NOX e incubadas por 96 horas em estufa bacteriológica a 25 °C. Após atingirem o estado estacionário, uma alíquota de cada frasco foi preparada para leitura no Citômetro de Fluxo. Vale

ressaltar que os frascos não foram inoculados com a mesma densidade celular, podendo assim, haver diferença na concentração inicial de células entre os frascos de P-17 e NOX.

4.6. Estudos oxidativos

Os ensaios de degradação fotoquímica foram realizados em batelada (750 mL de amostra) com água sintética contaminada com células de *Microcystis aeruginosa* a uma densidade celular fixada a 250.000 cel mL⁻¹. Previamente aos ensaios, foi necessário determinar a curva de decaimento de H₂O₂ para se estabelecer o tempo dos ensaios e assegurar a ausência de H₂O₂ ao final dos ensaios. A partir do tempo de exposição ao UV estabelecido, às amostras foram coletadas no tempo zero (início) e no tempo de 90 minutos (final) de cada batelada para a determinação de carbono orgânico dissolvido (COD), carbono orgânico assimilável (COA), trihalometanos (THM) e quantidade de células presente nas amostras. Nos ensaios com peróxido de hidrogênio (30%), o mesmo foi adicionado à amostra em diferentes dosagens anteriormente ao acionamento da lâmpada, sendo as dosagens de 10, 25, 50, 75 e 100 mg L⁻¹ de H₂O₂.

4.6.1. Estimativa da dosagem de H₂O₂

Para os ensaios foto-oxidativos UV/H₂O₂, inicialmente foi adicionada à água de estudo células de *M. aeruginosa* a uma densidade celular de 250.000 cel mL⁻¹ onde cinco dosagens de H₂O₂ foram testadas (10, 25, 50, 75 e 100 mg L⁻¹), sendo a água então encaminhada ao reator fotoquímico. A partir de ensaios de decaimento de H₂O₂ ao longo do processo oxidativo foi determinado o tempo de exposição necessário para que houvesse a atuação do oxidante na totalidade do volume da amostra e excluiu a necessidade de se utilizar o bissulfito de sódio para interromper a reação do H₂O₂ no final dos ensaios. As curvas de decaimento e residual de H₂O₂ de cada dosagem testada bem como o tempo de exposição ao UV necessário para degradação podem ser observadas na seção dos resultados.

4.7 Análises Físico-Químicas e métodos analíticos

Para cada uma das etapas do estudo, assim como a água inicialmente preparada, foram realizadas análises pertinentes, tais como: residual de H₂O₂, carbono orgânico dissolvido, carbono orgânico assimilável, concentração de trihalometanos, residual de cloro e contagem celular. Medidas de residual H₂O₂, residual de cloro e carbono orgânico dissolvido foram realizadas nos equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Tratamento e Potabilização de Água (LTPA) e do Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi). As análises de concentração de THM foram realizadas no Instituto SENAI de Tecnologia em Meio Ambiente e Química de Curitiba. E de COA, com o auxílio do Laboratório de Virologia Molecular do ICC Fio Cruz – Paraná, em Curitiba.

No Quadro 1 tem-se a indicação de forma resumida das diferentes análises que foram realizadas, equipamentos e laboratórios utilizados.

Quadro 1 - Parâmetros analíticos avaliados e seus respectivos métodos de análise e equipamentos

ANÁLISE	METODOLOGIA	EQUIPAMENTO
Carbono Orgânico Dissolvido (COD)	APHA (2005)	Analizador Thermo HiperTOC-UTFPR
Carbono Orgânico Assimilável (COA)	Adaptada de APHA (2005) e Hammes e Egli (2006)	Citômetro de Fluxo - Laboratório de Virologia Molecular do ICC FioCruz-Paraná
Trihalometano (THM)	Norma ISO 10301 (1997)	Cromatógrafo Gasoso - Laboratório Ambiental - SESI SENAI Curitiba.
Residual de Cloro	DPD 4500C1-G (APHA, 2005)	ALFAKIT e Espectrofotômetro UV-Vis - LTPA UTFPR Curitiba
Residual de Peróxido	Criada por Klassen et al. (1994) e adaptada por Bazri (2010)	UV- Visível - LTPA UTFPR Curitiba.

4.7.1 Determinação do residual de peróxido de hidrogênio

Todas as dosagens de H₂O₂ estudadas foram testadas em triplicata, onde a concentração de H₂O₂ ao longo dos ensaios foto oxidativos foi medida através da reação com iodeto catalisado por molibdato de amônio, de acordo com metodologia estabelecida por Klassen et al. (1994) e adaptada por Bazri (2010). Para isto, previamente a realização dos ensaios, foram preparadas duas soluções, a solução A

(Hidrogenofталato de Potássio (KPH) + Água destilada) e a solução B (Iodeto de Potássio (KI) + Hidróxido de Sódio (NaOH) + Molibdato de Amônio tetrahidratado + água destilada), as quais foram posteriormente adicionadas às amostras. Dado o início dos ensaios foto-oxidativos, as amostras foram coletadas do reator fotoquímico e preparadas para a leitura imediata da absorbância (351 nm). Para isto, adicionou-se às amostras 2,5 mL da solução A, 2,5mL da solução B e 0,5 mL de água de estudo (água oxidada) diluída com água destilada em balão volumétrico de 10 mL. Também foram preparadas as amostras “branco”, composta de 2,5 mL das soluções A e B diluídas em água destilada em balão volumétrico de 10 mL.

Para a determinação dos valores de residual de H₂O₂, utilizou-se o cálculo a seguir:

$$[H_2O_2] \text{ (ppm)} = (Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 10 \times D / (0,7776 \times S)$$

em que *D* é a diluição adicional e *S* é o volume da amostra (0,5 mL).

4.7.2 Carbono orgânico dissolvido

As amostras para COD foram coletadas no início e final de cada ensaio UV/H₂O₂. Após a coleta, as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose 0,45 µm de porosidade e armazenadas em frascos de vidro previamente tratados e livres de carbono. As amostras foram preservadas com ácido clorídrico (pH < 2) e mantidas sob refrigeração até a leitura. As leituras foram realizadas no analisador Thermo HiperTOC da UTFPR Ecoville seguindo o método de combustão a 680 °C e detecção de CO₂ (APHA, 2005).

4.7.3 Concentração de trihalometanos

Para a determinação da concentração de trihalometanos, as amostras, após a coleta, passaram por processo de cloração, o que permite a formação de subprodutos da desinfecção. Para tanto, foi adicionado cloro livre às amostras

recolhidas, sendo este suficiente para alcançar uma concentração de cloro residual de $1 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Cl_2 após 24 horas de tempo de contato a aproximadamente 25°C . O cloro livre residual foi determinado em laboratório por meio de kit comercial (ALFAKIT) “Spectro Kit Cloro DPD Livre” da marca ALFAKIT (cód. 204), utilizado para determinação de cloro DPD Livre na água através de leitura em espectrofotômetro (515 nm). O método baseia-se na metodologia do DPD Colorimétrico 4500-G, onde o cloro livre oxida o DPD (N,N-dietil-p-fenilenediamina) para formar um complexo róseo de intensidade de cor diretamente proporcional com a concentração de cloro (APHA, 2005).

A metodologia utilizada para determinação de THM segue a Norma ISO 10301 (1997) – *Water Quality – Determination of highly volatile halogenated hydrocarbons – Gas chromatographic methods*. Após a cloração, as amostras foram transferidas para *vials* de 40 mL, de forma que o frasco ficasse totalmente preenchido com o líquido amostral evitando a presença de bolhas (frasco isento de ar) e preservadas com aproximadamente 100 μL de HCl 1:1 para cada 40 mL de amostra. As amostras foram mantidas sob refrigeração a uma temperatura de aproximadamente 5°C até o momento da leitura.

A quantificação dos trihalometanos foi realizada por meio de cromatografia gasosa em parceria com o Laboratório Ambiental - SESI SENAI de Curitiba. O Cromatógrafo Gasoso Agilent com detector de Espectrometria de Massas Triplo Quadrupolo é composto por coluna cromatográfica com fase estacionária 6% Cianopropil e 94% Dimetilpolisiloxano de 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 1,4 μm de espessura do filme, gases hélio, nitrogênio e sistema automático de injeção CombiPAL. Foram passíveis de quantificação a partir da metodologia implementada no laboratório os trihalometanos clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados em duas seções distintas. Primeiramente, estão apresentados os resultados referentes à adaptação da metodologia para quantificação de carbono orgânico assimilável (COA) e posteriormente os resultados obtidos a partir dos ensaios de oxidação UV/H₂O₂.

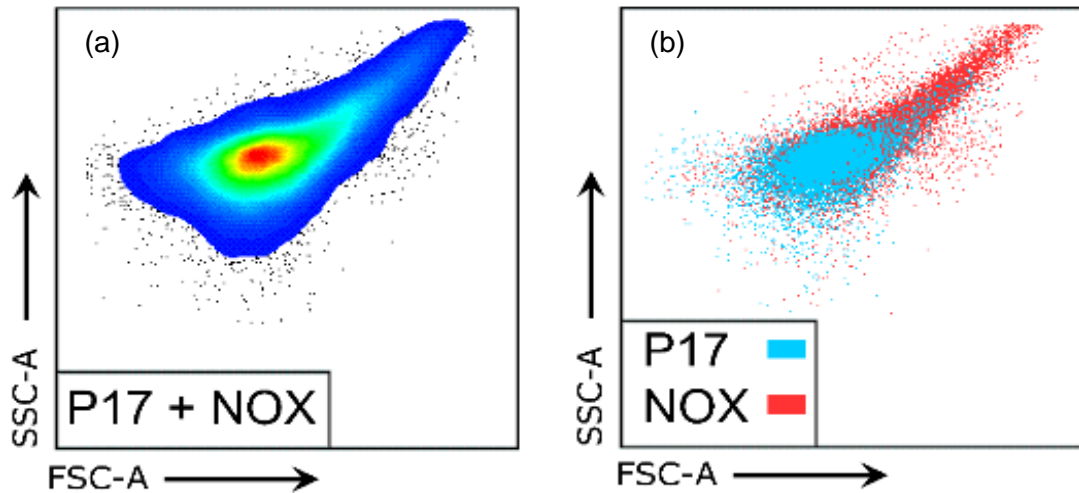
5.1 Adaptação da metodologia para quantificação de COA

5.1.1 Método de contagem celular

Esta fase do estudo consistiu na alteração do método de contagem celular dos microrganismos utilizados para a quantificação do COA, sendo indicado pelo *Standard Methods* (APHA, 2005) como contagem em placa, o qual foi substituído pelo método de contagem por citometria de fluxo.

No método de contagem em placas, os microrganismos P-17 e NOX são inoculados simultaneamente em meio sólido e incubados para formarem colônias visíveis a “olho nu”. As estirpes podem ser identificadas separadamente devido às diferenças na sua morfologia, tanto em relação à coloração quanto ao tamanho das colônias, e também por possuírem tempos de crescimento distintos (ROCHA, 2007). Porém, através das contagens obtidas por citometria de fluxo, observou-se que quando inoculadas em meio líquido simultaneamente, a diferenciação celular das estirpes não se torna possível. Através dos gráficos gerados nas contagens, pode-se visualizar que as duas estirpes ocupam a mesma região de leitura (Figura 7), o que sugere que ambas possuam tamanho e complexidade celular semelhantes, ao ponto de não ser possível a diferenciação das populações em nível de citometria. O gráfico *Density plote* (Figura 7a) representa a densidade celular de ambos os microrganismos e o gráfico *Dote plote* (Figura 7b) mostra a sobreposição virtual das estirpes no gráfico.

Figura 7 - Gráficos obtidos por citometria de fluxo representando a contagem celular dos microrganismos P-17 e NOX em meio líquido. (a) *Density plote*; (b) *Dote plote*



* O eixo "x" de cada gráfico representa o filtro FSC-A que faz referência ao tamanho da célula analisada, e o eixo "y" representa o filtro SSC- A, que mede a complexidade celular dos microrganismos.

A importância em se diferenciar as estirpes durante a contagem celular está relacionada ao fato de a mesma tornar possível a avaliação da quantificação de COA em função de cada microrganismo, podendo-se mensurar quanto de COA em $\mu\text{gC L}^{-1}$ foi proveniente do crescimento celular da P-17 e da NOX. Diante disso, optou-se por inocular os microrganismos separadamente nas amostras, porém, esta adaptação só se tornou possível, uma vez que os microrganismos utilizados consomem compostos diferentes, incluindo aminoácidos e carboidratos (P-17), e ácidos carboxílicos e o ácido oxálico (NOX). Ou seja, o fato de serem inoculados separadamente não interfere na quantificação de COA, já que não competem pela mesma fonte de carbono. Sendo assim, a quantificação de COA foi feita em função do crescimento celular da P-17 e da NOX separadamente, e posteriormente realizou-se a somatória das concentrações de COA para a obtenção do valor de COA total presente nas amostras analisadas.

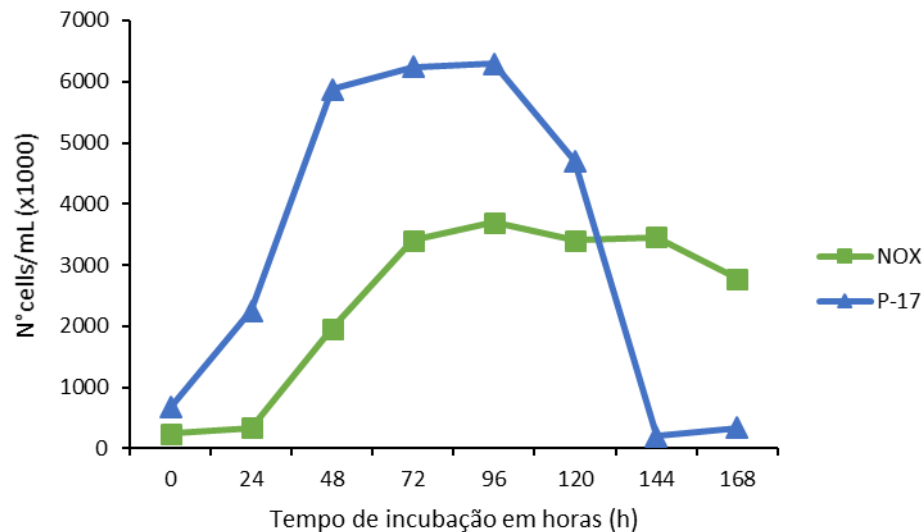
Apesar da citometria de fluxo não possibilitar a diferenciação dos microrganismos, os dados gerados pelo método apresentam maior estabilidade que os de plaqueamento, possivelmente, devido a este último ser um método mais propenso a contaminação ou alterações fisiológicas das bactérias. Além disso, a citometria analisa especificamente o crescimento numérico de uma cultura, que é o princípio fundamental do conceito de quantificação do COA (ROCHA, 2007). Outro fator que torna a utilização da citometria de fluxo mais viável é o fato de a mesma

diminuir o tempo dos ensaios de quantificação se comparado ao plaqueamento, passando de nove dias para aproximadamente quatro dias de ensaio.

5.1.2 Definição do estágio estacionário dos inóculos de P-17 e NOX

A partir da realização da cinética de crescimento dos microrganismos P-17 e NOX, pode-se definir o tempo de incubação necessário que cada estirpe leva para atingir o estágio estacionário. Os dados de crescimento celular obtidos ao longo de 168 horas de incubação estão representados na Figura 8. O estágio estacionário é assumido quando a densidade celular dos microrganismos se torna constante a partir de certo tempo de incubação. Através da figura pode-se observar que para ambas as estirpes, o estágio estacionário de crescimento foi atingido entre 72 e 96 horas de incubação a 25 °C.

Figura 8 - Curva de crescimento dos microrganismos P-17 e NOX após 168 horas de incubação a 25 °C em estufa bacteriológica

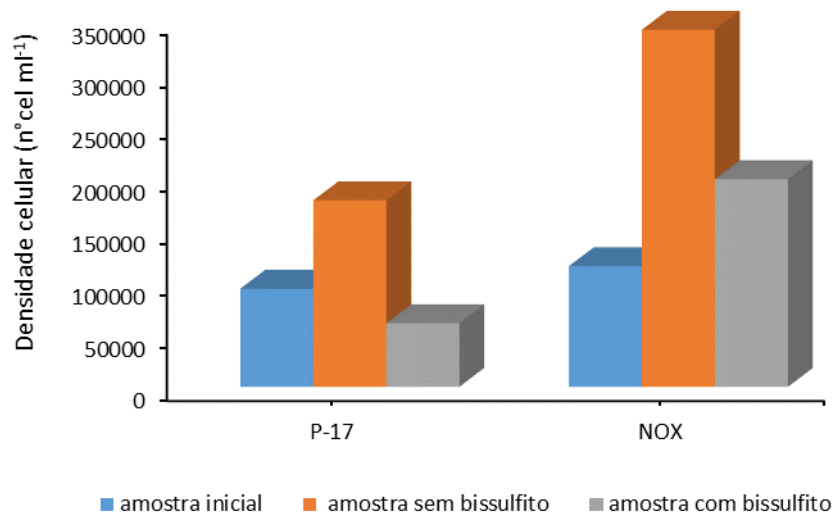


Diante dos resultados obtidos, assumiu-se que o número de microrganismos obtidos entre 72 e 96 horas (estágio estacionário) corresponde ao número máximo de células que pode ser suportado pela fonte de carbono presente na amostra.

5.1.3 Avaliação da interferência do bissulfito no crescimento da P-17 e NOX

A partir da avaliação do crescimento dos microrganismos na presença e ausência do bissulfito de sódio (NaHSO_3), pode-se observar que este composto químico interferiu no crescimento celular dos microrganismos P-17 e NOX. Os resultados das contagens do crescimento celular das amostras podem ser observados através da Figura 9. Nota-se que nas amostras inoculadas com a P-17, o NaHSO_3 atuou como um agente microbiano e acabou inibindo o crescimento do microrganismo nas amostras de água oxidada, ocasionado em uma queda da densidade celular em relação a amostra inicial, porém nas amostras sem o NaHSO_3 , houve um aumento considerável da densidade celular se comparada com a amostra inicial. Já nas amostras inoculadas com a NOX, a presença do NaHSO_3 não inibiu o crescimento, mas interferiu no mesmo, resultando em crescimento deficiente se comparado com as amostras sem o NaHSO_3 .

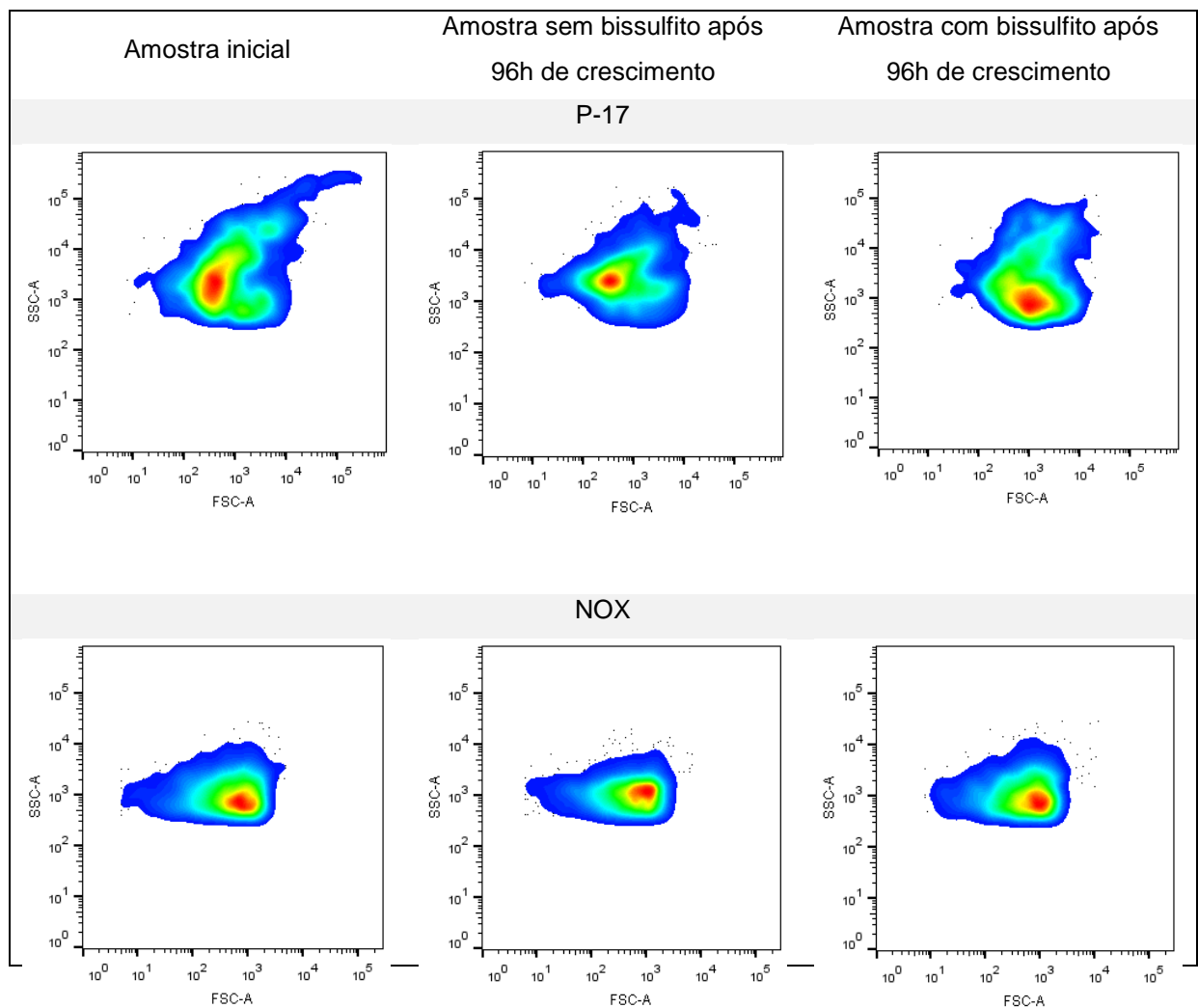
Figura 9 - Avaliação da interferência do bissulfito de sódio no crescimento da P-17 e NOX



Na Figura 10 são apresentados os gráficos de citometria de fluxo (density plote) referente as medidas de densidade celular nas condições avaliadas (amostra inicial, sem bissulfito de sódio e com bissulfito de sódio). Assim como na Figura 9, pode-se observar que tanto para a P-17 quanto para a NOX, o NaHSO_3 interferiu no crescimento. Nos gráficos a densidade é representada por cores, onde as cores quentes (vermelho, amarelo e verde) representam as áreas com maior densidade

populacional e as cores frias (azul claro e azul escuro) as áreas com menor densidade populacional. O eixo "x" de cada gráfico representa o filtro FSC-A que faz referência ao tamanho da célula analisada, e o eixo "y" representa o filtro SSC-A, que mede a complexidade celular dos microrganismos. A soma destes dois parâmetros é chamada de morfologia celular. No gráfico, o agrupamento de células formado sugere a existência de uma população de organismos com morfologia celular aproximada, neste caso uma população de P-17 e outra de NOX. Quanto maior o afastamento da população em relação ao agrupamento central, mais diferente ela é em relação a tamanho e complexidade celular.

Figura 10 - Representação da densidade celular dos microrganismos na presença e ausência do bissulfito de sódio através do gráfico de citometria "density plote"



Outros autores também relataram a interferência de agentes de extinção de H₂O₂ em ensaios de quantificação de COA. Sarathy (2004), ao quantificar COA presente em águas de abastecimento público a partir de um consórcio natural de

microrganismos, observou que o uso de catalase de fígado bovino e do tiosulfato de sódio após os ensaios oxidativos UV/H₂O₂, também interferem no crescimento dos microrganismos; enquanto a catalase superestimou a concentração de COA provavelmente por sua natureza orgânica, o tiosulfato de sódio causou uma queda no número de células em relação às amostras controle, assim como o bissulfito de sódio. Bazri e Mohseni (2013) testaram o uso de agentes orgânicos, como a catalase bovina, e também agentes inorgânicos como o dióxido de manganês (MnO₂), óxido de ferro (Fe₂O₃), óxido de chumbo (PbO₂) e Prata (Ag). Assim como Sarathy (2004), estes autores observaram que a concentração de COA da água aumentou como resultado da utilização de catalase após o processo UV/H₂O₂, indicando que a utilização desta enzima, mesmo em concentração muito baixa (0,2 ppm), em forma livre, interfere na análise de COA. Em relação aos agentes inorgânicos avaliados, o MnO₂ demonstrou efeito prejudicial sobre o COA quando foi utilizado para eliminar H₂O₂ na água, porém em estudos anteriores, Sarathy (2004), mostrou que este pode ser um agente apropriado para a remoção de H₂O₂ antes dos testes de COA, tornando inconclusivo o uso deste composto. O uso de Fe₂O₃ resultou em COA mais alto, enquanto o PbO₂ e Ag também inibiram o crescimento bacteriano dentro da amostra.

Paralelamente, Bazri e Mohseni (2013) avaliaram o efeito da catalase bovina imobilizada em grânulos de vidro (GV) e em um substrato polimérico (SP). Para o GV imobilizado com catalase, o COA da água estudada aumentou após a eliminação de H₂O₂. Este aumento foi atribuído à liberação da enzima imobilizada com ligação fraca à superfície do grânulo de vidro. Já a catalase suportada por SP mostrou resultados promissores com impacto prejudicial mínimo na quantificação de COA das amostras de água originais. Além disso, observou-se que a eliminação de peróxido de hidrogênio era rápida e eficaz quando se usava SP (10 mg L⁻¹ de H₂O₂ reduzido para abaixo de 0,1 mg L⁻¹ em 20 minutos). Mais tarde, Bari e Mohseni (2016) aplicaram o uso da catalase bovina imobilizada em substrato polimérico e também obtiveram resultados satisfatórios em ensaios de quantificação de COA após tratamento oxidativo UV/H₂O₂.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo e dos trabalhos citados, pode-se sugerir que a catalase bovina imobilizada pode ser uma alternativa eficaz para eliminar o H₂O₂ para os ensaios de COA, porém deve-se considerar que a

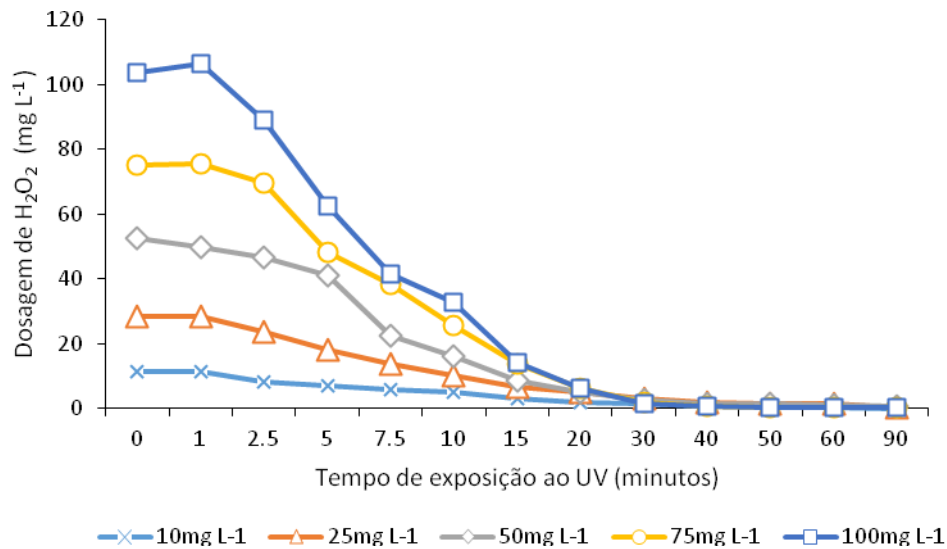
aplicação desta enzima possui custo elevado se comparado a outros compostos, além de exigir técnicas de aplicação morosas.

Diante desta problemática, optou-se por não adicionar nenhum composto químico utilizado para extinção do H_2O_2 , de modo a evitar a inibição do crescimento dos microrganismos. Para tanto, fez-se necessário avaliar o tempo de degradação do H_2O_2 na presença do UV para garantir que ao final da oxidação, todo o H_2O_2 havia sido consumido, deixando as amostras livres de qualquer residual de H_2O_2 e possibilitando uma quantificação de COA mais precisa.

5.2 Estudos Oxidativos

5.2.1 Avaliação da degradação do peróxido de hidrogênio e estimativa do tempo de exposição à radiação UV

Através dos ensaios de degradação do H_2O_2 , foi possível traçar a curva de decaimento para todas as dosagens de H_2O_2 estudadas (10, 25, 50, 75 e 100 mg L^{-1}). Como exposto na Figura 11, o tempo de exposição ao UV necessário para degradar o H_2O_2 na sua totalidade foi de 30 minutos para as dosagens de H_2O_2 mais baixas (10 e 25 mg L^{-1}) e variou entre 50 e 90 minutos para as dosagens mais altas (50, 75 e 100 mg L^{-1} H_2O_2). Nestes tempos, todas as dosagens apresentaram valores residuais abaixo de 0,1 mg L^{-1} , como pode ser observado na Tabela 1.

Figura 11 - Curva de decaimento do H₂O₂ em exposição ao UV**Tabela 1** - Valores de residual de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) obtidos após 90 minutos de degradação para cada dosagem testada

Tempo de oxidação (min)	DOSAGENS DE H ₂ O ₂ AVALIADAS				
	10 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹	75 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹
0	11,17	28,30	52,48	74,95	103,84
1	11,12	28,17	49,68	75,40	106,34
2,5	8,20	23,77	46,59	69,78	89,22
5	7,09	18,04	40,90	48,05	62,30
7,5	5,92	13,72	22,36	38,13	41,52
10	4,91	9,99	15,90	25,73	32,65
15	3,01	6,62	8,42	13,70	14,25
20	1,73	4,91	4,95	6,22	5,96
30	1,51	2,91	2,46	1,68	1,37
40	0,73	1,68	1,31	0,69	0,50
50	0,67	1,28	1,21	0,31	0,17
60	0,10	1,23	0,34	0,16	0,15
90	0,00	0,09	0,06	0,07	0,11

Apesar da diferença entre os tempos de degradação, optou-se por fixar o tempo de 90 minutos para todos os ensaios foto-oxidativos subsequentes, independentemente da dosagem do oxidante, para assegurar que a quantificação de COA não sofresse interferência do H₂O₂ residual.

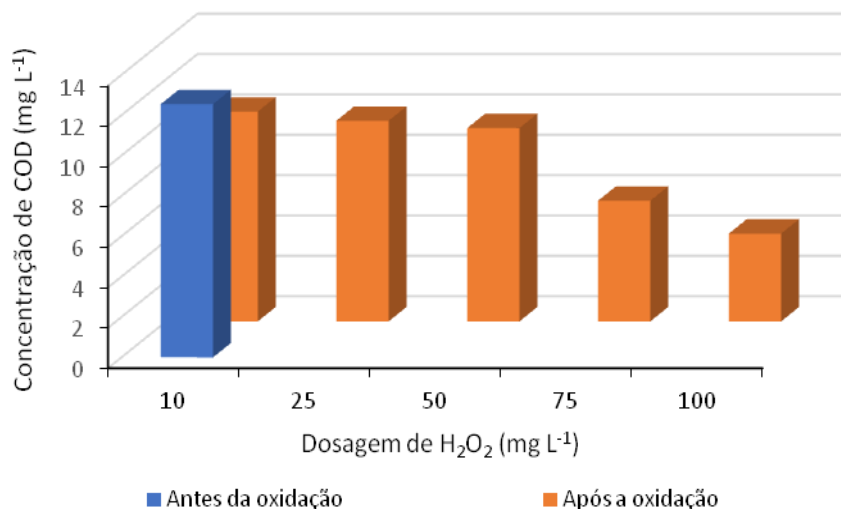
5.3. Análises físico-químicas

5.3.1 Carbono orgânico Dissolvido

A matéria orgânica natural (MON) em água pode ser separada em partículas e frações dissolvidas. Do ponto de vista operacional, Danielsson (1982) define a fração da matéria orgânica que passa através de um filtro de 0,45 μm como carbono orgânico dissolvido (COD). Sua importância ambiental deve-se ao fato de servir como fonte de energia para bactérias e algas, além de complexar metais. (CETESB, 2009).

A concentração de carbono orgânico dissolvido presente na água de estudo foi analisada antes e após a oxidação UV/H₂O₂ para cada dosagem de peróxido testada (10, 25, 50, 75 e 100 mg L⁻¹). A partir dos resultados (Figura 12), pode-se observar que a água de estudo sem tratamento, apresentou uma concentração de COD de aproximadamente 12 mg L⁻¹, o que está relacionado às células de cianobactérias presentes nas amostras a uma densidade de 250.000 cel mL⁻¹, pois estas representam a única fonte de carbono presente nas amostras.

Figura 12 - Concentração de COD antes e após processo oxidativo UV/H₂O₂ antes e após 90 minutos de exposição



Segundo Quall e Haines (1992), as concentrações de carbono orgânico apresentam valores entre 1 e 10 mg L⁻¹ em rios, 1 e 50 mg L⁻¹ em lagos, 8,6 mg L⁻¹ em águas residuais. Meybeck (1982) cita que a concentração de carbono orgânico dissolvido em águas naturais em rios costuma variar entre 1 e 20 mg L⁻¹, tendo como

valor médio 5 mg L⁻¹. Se comparada com estes valores, a concentração de COD inicial das amostras contaminadas pela *Microcystis aeruginosa* é consideravelmente alta. Pode-se deduzir que nas condições de foto-oxidação e densidade celular estudadas, a presença da *M. aeruginosa* a uma densidade de 250.000 cells mL⁻¹ contribuiria para a formação de aproximadamente 12 mg L⁻¹ de carbono orgânico dissolvido na água, o que caracteriza uma preocupação, uma vez que mudaria consideravelmente a característica da água natural e, conseqüentemente, a eficiência do tratamento de água empregado. Além disso, Namkung e Rittmann (1987) mostraram que a concentração de 0,1mg L⁻¹ de COD suportou um crescimento de biofilme oligotrófico capaz de degradar os compostos odoríferos MIB e geosmina, além de fenol e naftaleno em águas de abastecimento. Isto sugere que as concentrações de COD obtidas no presente estudo foram significativamente altas no ponto de vista da bioestabilidade da água para consumo humano.

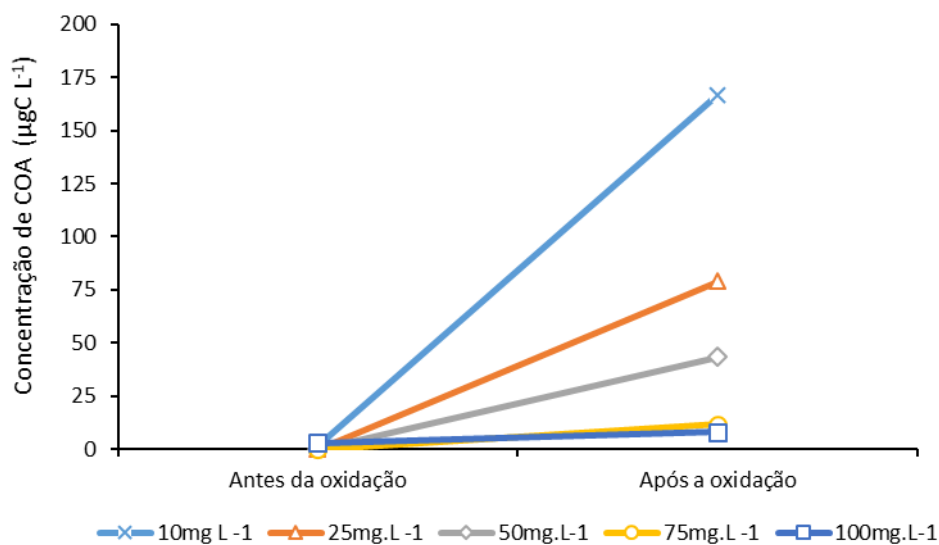
Observando os valores obtidos nas amostras de água após o tratamento oxidativo UV/H₂O₂, nota-se que houve uma redução gradual do COD em relação às dosagens de H₂O₂ testadas, apresentando 10 mg L⁻¹ de COD para a dosagem mais baixa (10 mg L⁻¹ H₂O₂) e 4 mg L⁻¹ de COD com a aplicação da dosagem mais alta (100 mg L⁻¹ H₂O₂). Na Figura 12 pode-se observar que quanto maior a concentração de H₂O₂ utilizada, maior foi a redução de COD ao longo dos 90 minutos de exposição à radiação UV. Esta redução gradual na concentração de COD sugere que quanto maior a concentração do agente oxidante, maior é a taxa de reação dos radicais •OH e maior é a capacidade de mineralização dos compostos orgânicos biodegradáveis gerados.

Diversos autores mencionam que as concentrações de H₂O₂ aplicadas em escala comercial no processo UV/H₂O₂ ([H₂O₂] até 20 mg L⁻¹) não são suficientes para mineralizar a matéria orgânica natural. Portanto, obter-se-á uma degradação parcial da matéria orgânica e a geração de moléculas orgânicas de menor peso molecular (SARATHY; MOHSENI, 2007; SONG et al., 2008; TOOR; MOHSENI, 2007), neste caso, o carbono orgânico assimilável.

5.3.2 Carbono Orgânico Assimilável

A formação de COA a partir do tratamento da água de estudo por processo UV/H₂O₂ foi avaliada em função do emprego das cinco dosagens de H₂O₂ estabelecidas (10, 25, 50, 75 e 100 mg L⁻¹). Os resultados de quantificação de COA estão apresentados na Figura 13.

Figura 13 - Formação de COA a partir de processo oxidativo UV/H₂O₂ após 90 minutos e oxidação



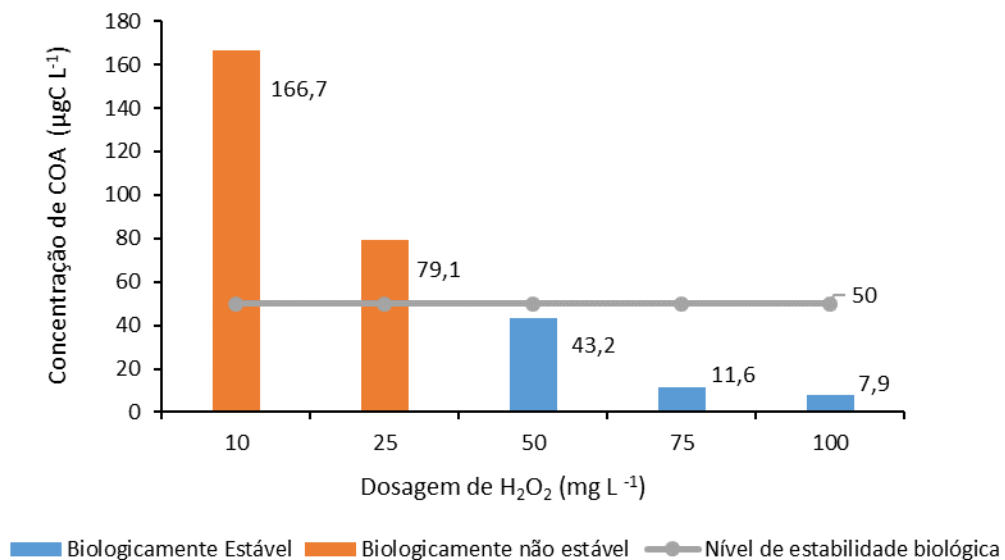
Pode observar que a dosagem de 10 mg L⁻¹ (menor dosagem estudada) apresentou uma concentração de COA consideravelmente maior em relação as outras dosagens, apresentando 166,7 µgC L⁻¹ de COA após a oxidação. Resultado semelhante foi observado por Bahzri e Mohseni (2016). Ao avaliar a formação de COA em água naturais após tratamento com oxidação avançada UV/H₂O₂, os autores obtiveram um aumento significativo no COA para dosagem de 10 mg L⁻¹ de H₂O₂ se comparado com concentrações mais altas de H₂O₂. Conforme os autores, este aumento se deve à oxidação parcial e à quebra de moléculas orgânicas maiores, em menores, como resultado da reação com radicais •OH.

Nota-se que ao aplicar dosagens superiores a 50 mg L⁻¹, a concentração de COA reduziu significativamente em relação as outras dosagens. Esta redução sugere que o emprego de dosagens de H₂O₂ maiores, promove uma oxidação mais completa da matéria orgânica, e segue uma tendência a mineralização dos

compostos orgânicos assimiláveis formados, reduzindo assim, a concentração final de COA nas amostras. Porém, o uso de altas concentrações de H_2O_2 nem sempre é viável quando utilizados em escalas reais de tratamento. Por esta razão, processos de oxidação avançada são tipicamente seguidos por um processo de filtração biológica para remover COA através de degradação microbiana (HAMMES et al., 2006; VAN DER KOOIJ et al., 1989).

Analisando os resultados pela ótica da estabilidade biológica da água, e considerando que para uma água ser biologicamente estável, esta deve apresentar concentrações de COA de até $50 \mu\text{gC L}^{-1}$, pode-se dizer que apenas a aplicação das dosagens de 50, 75 e 100 mg L^{-1} foram capazes de produzir uma água biologicamente estável, apresentando valores aproximados de 43, 11 e 7 $\mu\text{gC L}^{-1}$ de COA, respectivamente (Figura 14).

Figura 14 - Demonstração do nível de Estabilidade Biológica comparado as concentrações de COA obtidas em cada dosagem de H_2O_2 estudada

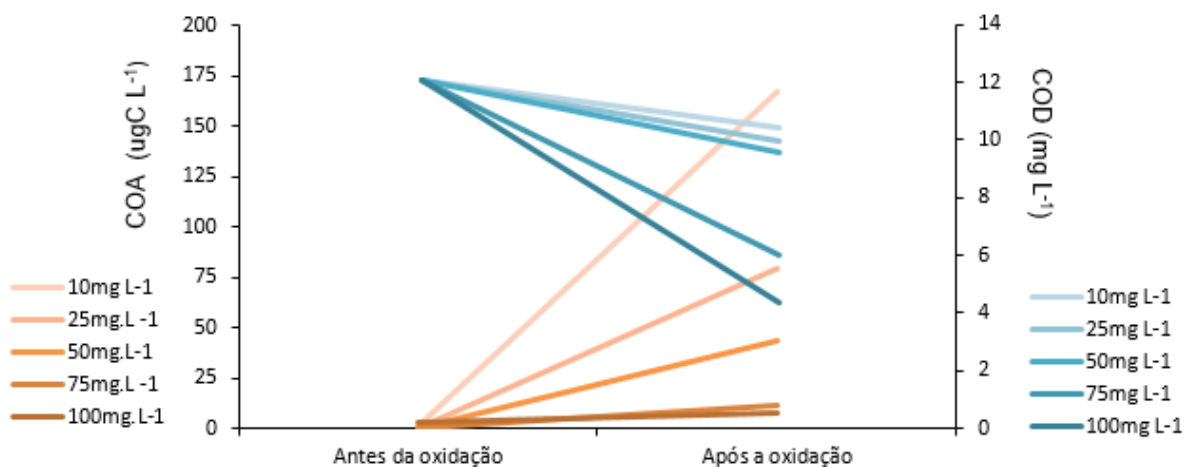


A preocupação com a presença de compostos orgânicos assimiláveis na água está ligada ao fato destes suportarem o crescimento de bactérias heterotróficas e que estão associados ao recrescimento de microrganismos e a formação de biofilmes em sistemas de distribuição de água. Uma abordagem de tratamento sustentável é, portanto, limitar a quantidade de COA na água potável, limitando assim o recrescimento de microrganismos e a formação de biofilmes em sistemas de armazenamento e distribuição (VAN DER KOOIJ et al., 1999). Por esta razão, processos de oxidação avançada são tipicamente seguidos por um processo

de filtração biológica para remover COA através de degradação microbiana (HAMMES et al., 2006; VAN DER KOOIJ et al., 1989).

Relacionando os dados de COA com os dados de COD, observa-se que em relação à concentração inicial (água sem tratamento), estes apresentaram uma tendência inversa. Enquanto a concentração de COD diminuiu, a formação de COA aumentou após a oxidação UV/H₂O₂ (Figura 15).

Figura 15 - Relação da formação de COA e COD durante processo oxidativo UV/H₂O₂ após 90 minutos de oxidação



Esta relação sugere que ao longo do processo, boa parte do COD inicial presente nas amostras foi convertida em compostos orgânicos mais simples (COA) como resultado da oxidação e da reação com radicais •OH, ocasionando assim, um aumento na concentração COA presente nas amostras (Figura 15). Conforme Westphalen, Corção e Benetti (2016), o carbono orgânico assimilável (COA) mede a fração do COD que é biodegradável e rapidamente assimilada por microrganismos. Segundo Escobar e Randall (2001), o COA representa entre 0,1 e 9,0% do COD de água para consumo humano.

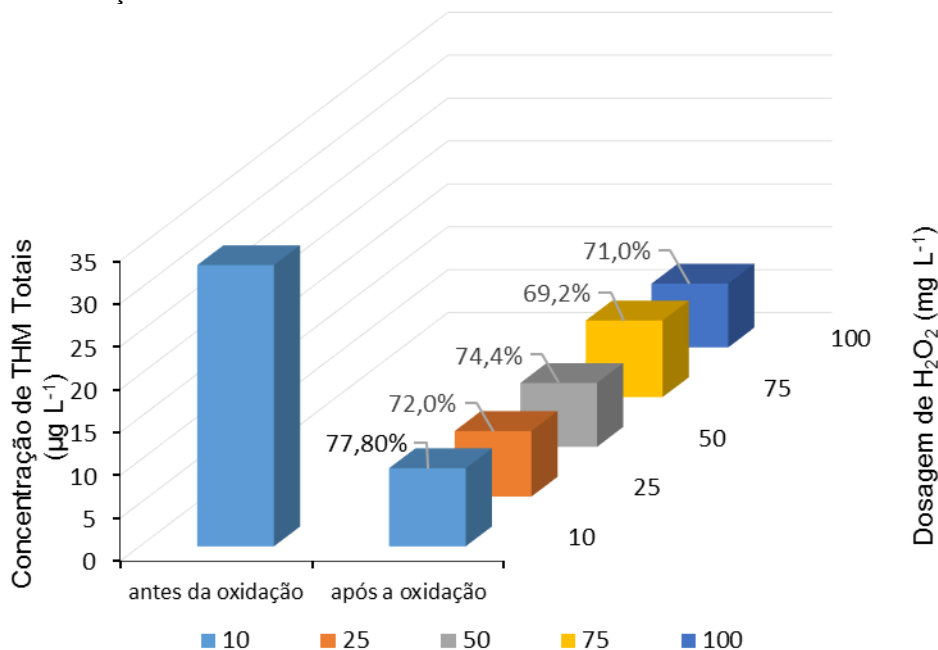
Ao analisar os dados de COA e COD para as diferentes dosagens de H₂O₂ aplicadas, pode-se sugerir que entre as dosagens de 10 e 50 mg L⁻¹ de H₂O₂, ocorreu uma maior tendência às reações entre os radicais •OH e o COA, uma vez que se verifica maior redução dessa fração em comparação ao COD. Para as dosagens superiores, 75 e 100 mg L⁻¹, sugere-se a ocorrência de reações simultâneas dos radicais •OH com o COA e o COD, em que um menor residual de

COA é quantificado, devido a presença de H_2O_2 excedente no meio, o que permite a transformação da molécula de COD em COA e sua imediata mineralização. Dessa forma, menores são os valores de COD e COA nas amostras simultaneamente.

5.3.3 Formação de trihalometanos a partir do processo oxidativo UV/ H_2O_2

A concentração de trihalometanos foi avaliada antes e após o processo oxidativo UV/ H_2O_2 referente a cada dosagem de peróxido testada (10, 25, 50, 75 e 100 mg L^{-1}). A partir dos resultados, pode-se observar que para todas as dosagens testadas houve uma redução significativa da concentração de THM formada (Figura 16).

Figura 16 - Concentração de THM totais antes e após 90 minutos de oxidação UV/ H_2O_2



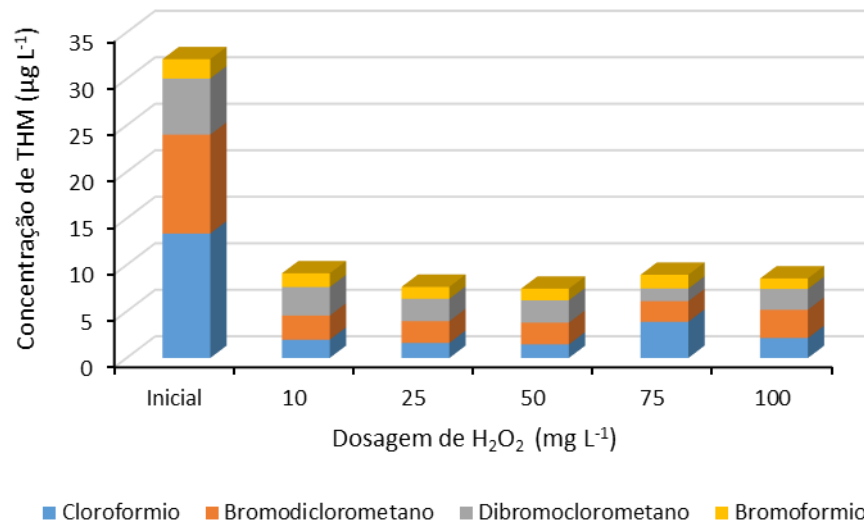
A concentração de THM inicial das amostras apresentou uma queda considerável, decaindo de valores em torno de $31 \mu\text{g L}^{-1}$ para uma concentração de aproximadamente $7 \mu\text{g L}^{-1}$ para todas as dosagens testadas (Figura 16). Esta queda representou uma redução na formação de THM que variou entre 69,2% de redução para a dosagem de 75 mg L^{-1} e 77,8% de redução para a dosagem de 10 mg L^{-1} .

Resultados similares foram descritos por Liu et al. (2002), Thomson et al. (2004a), Wang et al. (2006) e Toor e Mohseni (2007), em que, durante estudos de oxidação de matéria orgânica natural, observaram uma significativa redução na formação de THMs sob condições fortes de oxidação, ou seja, utilizando-se concentrações de H₂O₂ acima de 20 mg L⁻¹ e longos períodos de exposição ao UV (superiores a 20 minutos), assim como no presente estudo.

Ao analisar a concentração inicial de THM total (água de estudo sem tratamento), pode-se depreender que nas condições de densidade celular de cianobactérias estudada (250.000 cels mL⁻¹), a contribuição das células de *M. aeruginosa* foi de 31 µg L⁻¹ de THM totais após cloração das amostras. Levando-se em conta que a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) estabelece um valor de 100 µg L⁻¹ de THM em águas destinadas a abastecimento público e que existe uma infinidade de compostos orgânicos que podem ser precursores de THM em águas naturais, a contribuição de 31 µg L⁻¹ de THM's a uma densidade de 250.000 cels mL⁻¹ torna-se significativa, já que é proveniente de uma única fonte de carbono, as células de *M. aeruginosa*.

Além da concentração de THM total, avaliou-se também a concentração em função dos diferentes compostos que compõem o grupo de trihalometanos analisados. A partir da cloração das amostras, houve a formação de quatro diferentes compostos: clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio. Através da Figura 17, pode-se observar que nas amostras iniciais (água sem tratamento), a concentração de THM foi predominantemente em função da formação do clorofórmio e do bromodiclorometado. As primeiras observações publicadas a respeito da possibilidade das algas serem precursoras de THM foram reportadas por Morris e Baum (1978), e assim como no presente estudo, os autores demonstraram que a cloração de matéria orgânica proveniente das algas pode produzir clorofórmio.

Figura 17 - Concentração de THM em função de cada composto que compõe o grupo antes e após 90 minutos de exposição



Grande parte do clorofórmio e do bromodiclorometano, predominantes na água de estudo, apresentaram uma formação reduzida após o processo oxidativo UV/H₂O₂, se comparada ao bromoformio, que praticamente não apresentou redução após o tratamento. Pode-se observar também, que a concentração mais elevada de THM apresentada na dosagem de 75 mg L⁻¹ H₂O₂, foi em função da concentração de clorofórmio que, se comparada com as demais dosagens, foge da tendência e apresenta uma redução menor após a oxidação, diferente do que ocorre com as outras dosagens de H₂O₂. Porém, sugere-se que possivelmente, esta diferença não seria significativa se analisada estatisticamente.

Analisando cada um destes compostos separadamente, fica evidente que a relevância no monitoramento de THM em águas de abastecimento público se dá pelo potencial tóxico destas moléculas. De acordo com documentos elaborados pela WHO (2008), o clorofórmio foi classificado no Grupo 2B pela Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*), sendo considerado como possivelmente cancerígeno para os seres humanos, principalmente em função de evidências suficientes de carcinogenicidade em animais experimentais.

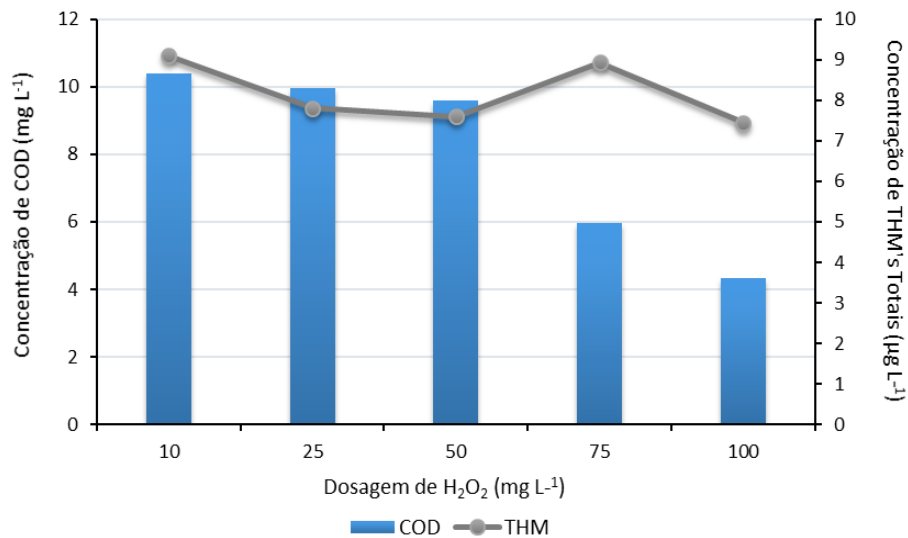
O bromoformio, embora seja classificado no Grupo 3 pela IARC (não classificável quanto à sua carcinogenicidade para seres humanos), pode colaborar no aumento de tumores relativamente raros no intestino grosso de ratos. Estudos envolvendo dibromoclorometano sugerem a indução de tumores hepáticos em ratos

fêmeas e em filhotes machos, mas não em ratos adultos. A genotoxicidade do dibromoclorometano foi também estudada em vários ensaios, mas os dados disponíveis são considerados inconclusivos. Assim, este THM também é classificado no Grupo 3 pela IARC. O bromodiclorometano é classificado no Grupo 2B pela IARC (possivelmente cancerígeno para os seres humanos), em função de resultados positivos e negativos em ensaios de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*. Segundo o IARC, a exposição à bromodiclorometano tem sido associada a um possível aumento do risco de aborto espontâneo e ocorrência de natimortos (WHO, 2008).

O risco de contaminação por THM não envolve apenas a ingestão de água contendo esses subprodutos, mas também a inalação e o contato pela pele, principalmente em usuários de piscinas, conforme estudos desenvolvidos por Amjad et al. (2013), Chowdhury (2014) e Maia et al. (2014).

Relacionando-se a formação de THM com a concentração de COD a partir do processo oxidativo, pode-se observar que ambos sofreram redução após a oxidação (Figura 18).

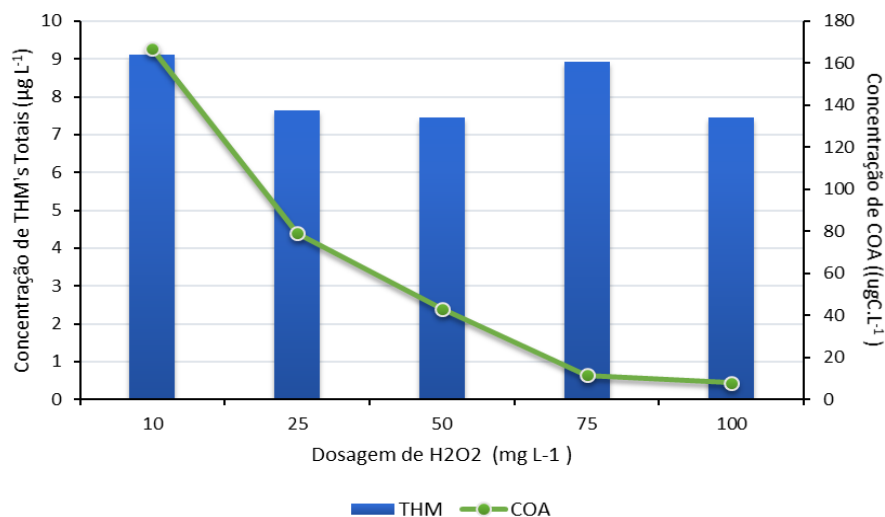
Figura 18 - Formação de THM relacionada com a concentração de THM's Totais após processo oxidativo UV/H₂O₂, de acordo com cada de oxidante testada



Através dos resultados, pode-se notar que para todas as dosagens de H_2O_2 , a concentração de ambos foi reduzida após o processo oxidativo UV/ H_2O_2 . Porém, como apresentado na Figura 18, ao contrário do COD, a partir da dosagem de 10 mg L^{-1} de H_2O_2 , a formação de THM se manteve praticamente constante, enquanto que o COD continuou reduzindo conforme a dosagem de H_2O_2 foi aumentada. Pode-se observar que há uma tendência muito sutil entre a presença de COD e formação de THM, sugerindo-se que ao mesmo tempo em que a concentração de COD reduz, a formação de THM também diminui. Considerando que a formação de THM é proveniente da reação do cloro com a matéria orgânica presente na água, pode-se dizer que independente da dosagem de H_2O_2 aplicada no processo, a quantidade de matéria orgânica disponível (não degradada) foi similar em todos os ensaios, resultando em concentrações de THM muito próximas.

Já em relação à formação de COA, observou-se que, enquanto a concentração de COA aumentou significativamente após a aplicação da dosagem de 10 mg L^{-1} e foi reduzindo gradualmente com o aumento da dosagem, a concentração de THM diminuiu com a aplicação de 10 mg L^{-1} de H_2O_2 e manteve-se constante mesmo com o aumento da concentração do oxidante (Figura 19).

Figura 19 - Formação de COA relacionada com a concentração de THM's Totais formados durante processo oxidativo UV/ H_2O_2



Esta comparação pode sugerir que em termos de formação de THM, a aplicação da dosagem de 10 mg L⁻¹ já seria suficiente para reduzir a formação destes compostos. Entretanto, do ponto de vista da formação de COA, esta mesma dosagem seria insuficiente, pois neste caso resultou em uma formação significativa de COA nas amostras, provavelmente por conta da oxidação parcial da matéria orgânica proveniente das células de *M. aeruginosa*. A queda na formação de COA a partir da dosagem de 10 mg L⁻¹ pode ter ocorrido em função da presença de oxidante suficiente na água, o que promoveu a mineralização de parte dos compostos.

Estes resultados, ao contrário do esperado, mostraram que dentro das condições de H₂O₂ e tempo de exposição ao UV, a formação de COA não teve relação direta com a formação de THM. Esta ausência de relação entre as análises pode sugerir que os compostos orgânicos assimiláveis, por serem de baixo peso molecular, não reagem com o cloro da mesma forma que outros compostos orgânicos e, portanto, não contribuem para a formação de THM, como o esperado inicialmente.

6. CONCLUSÕES

Do ponto de vista da eficiência do processo UV/H₂O₂ na remoção de matéria orgânica proveniente de células de cianobactérias e (ou) precursores de DBP's, a aplicação deste processo oxidativo avançado se mostrou uma alternativa factível no tratamento de águas contaminadas pela *M. aeruginosa*.

Além disso, pode-se concluir que:

- A metodologia de COA adaptada no presente trabalho se mostrou uma alternativa viável a quantificação de COA por plaqueamento. Através da citometria foi possível reduzir o tempo dos bioensaios significativamente e obter dados precisos em relação a contagem celular dos microrganismos utilizados.
- A aplicação de processo UV/H₂O₂ no tratamento de águas contaminadas por cianobactérias de fato contribui para a formação de COA.
- A formação de COA não foi proporcional à formação de THM, como era esperado. Observou-se que enquanto a concentração de COA aumentou após a oxidação, o inverso ocorreu com a concentração de THM, o qual apresentou uma redução significativa após a oxidação.
- A concentração de COD obtida mostrou uma tendência similar a formação de THM, pois a concentração de ambos foi reduzida ao longo do processo oxidativo.
- Os de COD e COA também não se mostraram proporcionais. Enquanto a concentração de COD diminuiu, a de COA aumentou após a oxidação. Isso sugere que ao longo do processo, boa parte do COD inicial presente nas amostras foi convertido em compostos orgânicos mais simples, como o COA, que possuem moléculas menores, ocasionando assim, um aumento na concentração COA presente nas amostras.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos e dos parâmetros avaliados neste estudo, pode-se sugerir a realização de estudos complementares, de forma a possibilitar uma avaliação mais clara sobre formação de COA em água, e também esclarecer alguns pontos que não ficaram claros através dos resultados obtidos nesta pesquisa. Diante disso:

- Sugere-se testar dosagens de H_2O_2 mais baixas, inferiores a 10 mg L^{-1} , e também densidades celulares de cianobactérias superiores a $250.000\text{ cels mL}^{-1}$, a fim de possibilitar uma avaliação mais clara sobre a contribuição da *M. aeruginosa* na formação de COA em água.
- Em função da necessidade de eliminar qualquer residual de H_2O_2 nas amostras, trabalhou-se com tempos de exposição ao UV muito longos, o que não seria adequado em sistemas em escala real. Portanto, sugere-se avaliar a utilização de um agente de extinção de H_2O_2 que não interfira na quantificação de COA, como a catalase bovina imobilizada, a fim de comparar os resultados de quantificação de COA em função do longo tempo de irradiação das amostras.
- Sugere-se testar tempos de exposição ao UV diferentes, para se avaliar se há variáveis em função deste parâmetro.
- E por fim, sugere-se também, realizar uma avaliação da formação de COA, THM e COD ao longo do processo oxidativo, através da coleta de amostras em tempos variados durante a realização do processo UV/ H_2O_2 , e não somente no início e fim, como foi avaliado no presente estudo, o que poderá ser realizado a partir da escolha de um agente que permita a extinção do oxidante sem comprometer a viabilidade da análise de COA.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; JEON, Y.; HOZALSKI, R. M. Feasibility of using a particle counter or flow-cytometer for bacterial enumeration in the assimilable organic carbon (COA) analysis method. **Biodegradation**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.387-397, 2015.

ALATON, I. A.; BALCIOGLU, I. A.; BAHNEMANN, D. W.; Advanced oxidation of a reactive dye bath effluent: comparison of O₃, H₂O₂/UV-C and TiO₂/UV-A processes. **Water Research**, v. 36, n. 5, p. 1143-1154, 2002.

AMJAD, H.; HASHM, I.; REHMAN, M. S. U.; AWAN, M. A.; GHAFAR, S.; KHAN, Z.; Cancer and non-cancer risk assessment of trihalomethanes in urban drinking water supplies of Pakistan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 91, p. 25-31, 2013.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. APHA, A., WEF Washington, D. C.: American Public Health Association, 2005.

AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L., LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru*/Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p. 441-446, 2002.

AZEVEDO, S. M. F. O. **Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. 3 ed. Medonline. 1998.** Disponível em: <<http://letc.biof.ufrj.br/sites/default/files/1998%20Azevedo%20Toxinas.pdf>>. Acesso em: 13/04/2015.

BASTOS, P. F. Tratamento de água da chuva através de filtração lenta e desinfecção UV. 2007. 135 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, Espírito Santo. 2007.

BAZRI, M. M. **Assimilable Organic Carbon Formation during Ultraviolet-Hydrogen Peroxide Advanced Oxidation Treatment of Surface Water**. 2010. 207 f. Tese (Doutorado) - Chemical And Biological Engineering, The University Of British Columbia, Vancouver, 2010.

BZARI, M. M.; BARBEAU, B.; MOHSENI, M.; Impact of UV/H₂O₂ advanced oxidation treatment on molecular weight distribution of NOM and biostability of water. **Water Research**, v. 46, n. 16, p. 5297-304, 2012.

BAZRI, M. M.; MOHSENI, M. Pretreatment of natural organic matter to control biological stability. **Environ. Sci.: Water Research and Technology**, v. 2, p. 298-303, 2016.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; PICCIN-SANTOS, V.; MOURA, A. N.; ARAGÃO-TAVARES, N. K. C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K. Cyanobacteria, microcystins and

cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 86, n. 1, p. 297-310, 2014.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MOLICA, R. Cianobactéria invasora – Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. VI, n. 30, p. 82-90, 2003.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 2.914 de 14 de dezembro de 2011**. Normas e padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano. Diário Oficial da União. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

CALIJURI, M. D. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. D. **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**. São Carlos: Rima, 118 p., ISBN 85-7656-102-6, 2006.

CAPONE, D.G. Marine nitrogen fixation: What's the fuss?. **Current Opinions in Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 341-348, 2001.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Relatório de qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2009.

CORAL, L. A.; ZAMYADI, A.; BARBEAU, B.; BASSETI, F. J.; LAPOLLI, F.R.; PREVOST, M. Oxidation of *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae* by ozone: Impacts on cell integrity and chlorination by-product formation. **Water Research**, v. 47, n. 9, p. 2983-2994, 2013.

CHIAMOLERA, L. B.; ANGELO, A. C. Resposta de espécies nativas em áreas com diferentes graus de sucessão, Reservatório Irai, PR. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 132-134, 2007.

CHORUS I.; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in Water. **A Guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E&FN Spon; 1999.

CHOWDHURY, S.; AL-HOOSHANI, K.; KARANFIL, T.; Disinfection byproducts in swimming pool: occurrences, implications and future needs. **Water Research**, v. 53, p. 68-109, 2014.

CRISTÓVÃO, R. O.; GONÇALVES, C.; BOTELHO, C. M.; MARTINS, R. J.E.; BOAVENTURA, R. A. R. Chemical oxidation of fish canning wastewater by Fenton's reagent. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 4, p. 2372-2376, 2014.

CUI, F.Y.; LIN, T.; MA, F. The excess propagation and research on biological control of the water flea of zooplankton in raw water. **Journal HIT**, v. 34, n. 3, p. 399-403, 2002.

DANIEL, L. A; CAMPOS, J. R. Fundamentos e aspectos de projeto de sistemas de desinfecção de esgoto sanitário com radiação ultravioleta. **Revista DAE-SABESP**, n. 163, p. 5-11, 1992.

DANIELSSON, L. G. On the use of filters for distinguishing between dissolved and particulate fractions in natural waters. **Water Research**, v. 16, p. 103-82, 1982.

DI BERNARDO, L., DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. v. 1-2. São Carlos, SP, Editora LDiBe, 2008.

DOMINGUES, A. L.; PEREIRA FILHO, W.; OLIVEIRA, M. A.; WACHHOLZ, F.; CORAZZA, R.; BARBIERI, D. W. **Características espectrais de uma floração de cianobactérias no Reservatório Rodolfo Costa e Silva – RS**. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto – SBSR, Anais XV, Curitiba, PR, Brasil, INPE p. 8452, 2011.

ESCOBAR, I. C.; RANDALL, A. A.; TAYLOR, J. S. Bacterial growth in distribution systems: effect of assimilable organic carbon and biodegradable dissolved organic carbon (BDOC). **Environmental Science and Technology**, v. 35, 3442-3447p., 2001.

ELHADIDY, A. M.; VAN DICK, M. I.; PELDSZUS, S.; HUCK, P. M. Application of flow cytometry to monitor assimilable organic carbon (AOC) and microbial community changes in water. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 130, p.154-163, 2016.

ESCOBAR, I. C.; RANDALL, A. A. Assimilable organic carbon (COA) and biodegradable dissolved organic carbon (BDOC): complementary measurements. **Water Research**, v. 35, n.18, p. 4444-4454, 2001.

FACONER, J. R.; BERESFORD, A. M.; RUNNEGAR, M. T. C. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue green alga *Microcystis aeruginosa*. **Med. J. Aust.**, v. 1, p. 511-514, 1983.

FANG, J.; MA, J.; YANG, X.; SHANG, C. Formation of carbonaceous and nitrogenous disinfection by-products from the chlorination of *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 44, n. 6, p. 1934-1940, 2010.

FANG, J.; YANG, X.; MA, J.; SHANG, C.; ZHAO, Q. A. Characterization of algal organic matter and formation of DBPs chlor(am)ination. **Water Research**, v. 44, p. 5897-5906, 2010.

FOGG, G. E. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. **Bot. Mar**, v. 26, p. 3-14, 1983.

FREITAS, A. M.; SIRTORI, C.; LENZ, C. A.; PERALTA ZAMORA, P. G. Microcystin-LR degradation by solar photo-Fenton, UV-A/photo-Fenton and UV-C/H₂O₂: a comparative study. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 12, n. 4, p. 696-702, 2013.

FUNASA. Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. – Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 56 p. 2003.

GEHR, R.; SWARTZ, C.; OFFRINGA, O. Removal of trihalomethane precursors from eutrophic water by dissolved air flotation. **Water Research**, v. 27, n. 1, p. 9-41, 1993.

GOPAL, K.; TRIPATHY, S. S.; BERSILLON, J.; DUBEY, S. P. Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, p. 1-6, 2007.

GRAHAM, N. J. D.; WARDLAW, V. E.; PERRY, R.; JIANG, J. Q. The significance of algae as trihalomethane precursors. **Water Science & Technology**, v. 37, n. 2, p. 9-83, 1998.

GREENFIELD, D.I.; DUQUETTE, A.; GOODSON, A.; KEPPLER, C.J.; WILLIAMS, S.H.; BROCK, L.M.; STACKLEY, K.D.; WHITE, D.; WILDE, S.B. The effects of three chemical algaecides on cell numbers and toxin content of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Anabaenopsis* sp. **Environ. Manage.**, v. 54, n. 5, p.1110-1120, 2014.

GUVEN, B.; HOWARD, A. Sensitivity analysis of a cyanobacterial growth and movement model under two different flow regimes. **Environmental Modeling and Assessment**, v. 16, n. 6, p. 577-589, 2011.

HAMMES F., A.; SALHIA, E.; KOSTER, O.; KAISER, H-P.; EGLI, T.; GUNTEGA, U. V. Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during the ozonation of drinking water. **Water Research**, v. 40, p. 2275-2286, 2006.

HAMMES F., A.; EGLI, T. New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum. **Environmental Science and Technology**, v. 39, p. 3289-3294, 2005.

HAMMES, F.; EGLI, T. A flow cytometric method for COA determination. **Technique**, v. 6, 16 p. 2007.

HARKE, M.; STEFFEN, M.; GOBLER, C.; OTTEN, T.; WILHELM, S.; WOOD, S. A.; PEARL, H. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis*. **Harmful Algae**, v. 54, p. 4-20, 2016.

HASSEMER, M. E. N. **Oxidação fotoquímica - UV/H₂O₂ - para degradação de poluentes em efluentes da indústria têxtil**. 2006. 161f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

HE, X.; PELAEZ, M.; WESTRICK, J. A.; O'SHEA, K. E.; HISKIA, A.; TRIANTIS, T.; KALOUDIS, T.; STEFAN, M. I.; CURZ, A.; DIOONYSIOU, D. Efficient removal of microcystin-LR by UV-C/H₂O₂ in synthetic and natural water samples. **Water Research**, v. 46, p. 1501-1510, 2012.

HEM, L. J.; EFRAIMSEN, H. Assimilable organic carbon in molecular weight fractions of natural organic matter. **Water Research**, v. 35, p. 1106-1110, 2001.

HENDERSON, R. K.; BAKER, A.; PARSONS, S. A.; JEFFERSON, B. Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. **Water Research**, v. 42, p. 3435-3445, 2008.

HIGARASHI, M. M.; MOREIRA, J. C.; OLIVEIRA, A. S.; FERREIRA, L. F. V. - A Utilização de Processos Oxidativos Avançados na Descontaminação do Meio Ambiente. **Química** - Boletim SPQ. Lisboa., n. 79, p. 16-20, 2000.

HO, L.; SAWADE, E.; NEWCOMBE, G. Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal - A review. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1536-1548, 2012.

HONG, H. C.; LIANG, Y.; HAN, B. P.; MAZUMDER, A.; WONG, M. H. Modeling of trihalomethane (THM) formation via chlorination of the water from Dongjiang River (source water for Hong Kong's drinking water). **Science of the Total Environment**, v. 385, p. 48-54, 2007.

IKEHATA, K.; EL-DIN, M. G. Aqueous pesticide degradation by hydrogen peroxide/ultraviolet irradiation and fenton-type advanced oxidation processes: a review. **Journal of Environmental Engineering**, v. 5, n. 2, p. 81-135, 2006.

ISAACS, J. D.; STRANGMAN, W. K.; BARBERA, A. E.; MALLIN, M. A.; MCIVER, M. R.; WRIGHT, J. L. C. Microcystins and two new micropeptin cyanopeptides produced by unprecedented *Microcystis aeruginosa* blooms in North Carolina's Cape Fear River. **Harmful Algae**, v. 31, p. 82–86, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, **ISO 10301**: Water Quality, Determination of highly volatile halogenated hydrocarbons, Gas chromatographic methods, 1997.

ITURRIAGA, R.; MITCHELL, B. G. Chroococcoid cyanobacteria: a significant component in the food web dynamics of the open ocean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 28, p. 291-297, 1986.

JANSE I.; MEIMA M.; KARDINAAL W. E. A.; JANSE I.; MEIMA M., KARDINAAL W. E. A., ZWART G. High-resolution differentiation of Cyanobacteria by using rRNA-Internal Transcribed Spacer Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6634-6643, 2003.

JARDIM, W. D. F.; TEIXEIRA, C. P. A. B. **Processos oxidativos avançados, conceitos teóricos. V. 3**, Unicamp, Campinas – SP, 2004.

JARDIM, W. F.; NOGUERIA, R. F. P. A. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. **Química Nova**, v. 21, p. 69-72, 1998.

JEPRAS, R.I.; CARTER, J.; PEARSON, S.C. Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2696-2701, 1995.

KAPLAN, L. A.; BOTT, T. L.; REASONER, D. J. Evaluation and Simplification of the Assimilable Organic Carbon Nutrient Bioassay for Bacteria Growth in Drinking Water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1532-1539, 1993.

KEYSER, M.; MÜLLER, A. I.; CILLIERS, P. F.; NEL, W.; GOUWS, A. P. Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 348-354, 2008.

KIM, J. H., KIM, Y. J., QURESHI, T. I. Assimilable organic carbon generation from algogenic organic matter in drinking water. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 35, p. 245-253, 2011.

KLASSEN N., V. MARCHINGTON D., MCGOWAN H., C. H₂O₂ determination by the I3-method and by KMnO₄ titration. **Analytical chemistry**, v. 66, n. 18, p. 2921-2925, 1994.

LAPOINTE, B. E.; HERREN, L. W.; DEBORTOLI, D. D.; VOGEL, M. A. Evidence of sewage-driven eutrophication and harmful algal blooms in Florida's Indian River Lagoon. **Harmful Algae**, v. 43, p. 82-102, 2015.

LECHEVALLIER, M. W., SHAW, N. E., KAPLAN, L. A.; BOTT, T. L. Development of a rapid assimilable organic carbon method for water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1526-1531, 1993.

LIU, W.; ANDREWS, S. A.; SHARPLESS, C.; STEFAN, M.; LINDEN, K. G.; BOLTON, J.R. Bench-scale investigations into comparative evaluation of DBP formation from different UV/H₂O₂ technologies. **Water Quality Technology Conference**, 2002.

LIU, Z. Q.; CUI, F. Y.; MA, H, FAN, Z. Q.; ZHAO, Z. W. The role of nitrobenzene on the yield of trihalomethane formation potential in aqueous solutions with *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 45, p. 6489-6495, 2011.

LUI, Y, S.; QIU J. W.; ZHANG, Y. L.; WONG, M. H.; LIANG, Y. Algal-derived organic matter as precursors of disinfection by-products and mutagens upon chlorination. **Water Research**, v. 45, p. 1454-1462, 2011.

METZ, D.H.; REYNOLD, K.; MEYER, M.; DIONYSIOU, D.D. The effect of UV/H₂O₂ treatment on biofilm formation potential. **Water Research**, v. 45, p. 497-508, 2010.

MIRANDA, M.; NOYMA, N.; PACHECO, F. S.; MAGALHÃES, L.; PINTO, E.; SANTOS, S.; SOARES, M. F. A.; HUSZAR, V. L.; LÜRLING, M.; MARINHO, M. M. The efficiency of combined coagulant and ballast to remove harmful cyanobacterial blooms in a tropical shallow system. **Harmful Algae**, v. 65, p. 27-39, 2017.

MORRIS, J. C; BAUM, B. Precursors and mechanisms of haloformations in the chlorination of water supplies. In: **Relative Dominance of Haloacetic Acids and Trihalomethanes in Treated drinking water**. AWWA, Research Foundation. ISBN: 1-58321-117-9, 2002.

NAMKUNG, E.; RITTMANN, B. E. Removal of taste and odor compounds by humic-substances-grown biofilms. **Journal American Water Works Association**, v. 79, n. 7, p. 107-112, 1987.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD Environmental Outlook to 2050 - The consequences of inaction. OECD Publishing, 353 p., 2012.

OGASHAWARA, I.; ZAVATTINI, J. A.; TUNDISI, J. G. The climatic rhythm and blooms of cyanobacteria in a tropical reservoir in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 74, n. 1, p. 72-78, 2014.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. **Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms.** . Environmental Microbiology Report: 10 p., 2009.

PANTIN, S. **Impacts of UV/H₂O₂ treatment for taste and odour control on secondary disinfection, 2009, 159f.** Dissertação (Master of Applied Science), Department of Civil Engineering, University of Toronto, 2009.

QIAO R., N LI, QI, X-H.; WANG, Q.-S.; ZHUANG, Y.-Y. Degradation of microcystin-RR by UV radiation in the presence of hydrogen peroxide. **Toxicon**, v. 45, p. 745-752, 2005.

QUALLS, R. G.; HAINES, B. L. Biodegradability of dissolved organic matter in forest throughfall, soil solution, and stream water. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 2, p. 578-586, 1992.

RAI, A. N. **CRC Handbook of simbiotic cyanobacteria.** Boca Raton: CRC Press. 253p. 1990.

RAMSEIER, M. K. **Assimilable Organic Carbon Formation and Disinfection during Oxidative Drinking Water Treatment.** 171 f. 2010. Tese de Doutorado. Swiss Federal Institute of Technology (ETH ZURICH), 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 7^a. ed. Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 830p., 2007.

ROCHA, V. S. **Determinação de carbono orgânico assimilável em amostras de água: Estudo de comparação do método de determinação da concentração de ATP com o método clássico de contagem de colónias.** 2007. 96 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Biológica, Universidade Técnica de Portugal, Portugal, 2007.

RYER, A. D. Light Measurement Handbook. 2. ed. Newburyport – MA: Technical Publications – International Light Inc, 64 p., 1997.

SANT' ANNA, C. L, AZEVEDO, M. T. P., AGUJARO, L. F., CARVALHO, M. C., CARVALHO, L. R., SOUZA, R. C. R. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctónicas de águas continentais brasileiras.** Ed. Interciência, J. Sociedade Brasileira de Ficologia, Rio de Janeiro, 58 p. 2006.

SARATHY, S.R.; MOHSENI, M. The impact of UV/H₂O₂ advanced oxidation on molecular size distribution of chromophoric natural organic matter. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 24, p. 8315-8320, 2007.

SARATHY, S. R. **Effects of UV/H₂O₂ Advanced Oxidation on Physical and chemical Characteristics of Natural Organic Matter in Raw Drinking Water Sources**. 2009. 230f. Tese (Doutorado) – Chemical and Biological Engineering, The University Of British Columbia, Vancouver, 2009.

SARATHY, S. R.; MOHSENI, M. The fate of natural organic matter during UV/H₂O₂ advanced oxidation of drinking water. **Canadian Journal of Civil Engineering**, v. 36, n. 1, p. 160-169, 2009.

SARATHY, S. R.; MOHSENI, M. Effects of UV/H₂O₂ advanced oxidation on chemical characteristics and chlorine reactivity of surface water natural organic matter. **Water Research**, v. 44, p. 4087-4096, 2010.

SARATHY, S. R.; BAZRI, M. M.; MOHSENI, M. Modelling the transformation of chromophoric natural organic matter during UV/H₂O₂ advanced oxidation. **Journal of Environmental Engineering**, v. 137, n. 10, p. 903-912, 2011.

SCHIRRMEISTER, B. E.; DE VOS, J. M.; ANTONELLI, A.; BAGHERI, H. C. Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 110, p.1791-1796, 2013.

SHARMA, V. K.; TRIANTIS, T. M.; ANTONIOU, M. G.; HE, X.; PELAEZ, M.; HAN, C.; SONG, W.; O'SHEA, K. E.; DE LA CRUZ, A. A.; KALOUDIS, T.; HISKIA, A.; DIONYSIOU, D. D. Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: a review. **Separation and Purification Technology**, v. 91, p. 3-17, 2012.

SILVA-LINS J. R. **Dinâmica de cianobactérias e cianotoxinas em um braço do reservatório da Usina Hidroelétrica Luís Eduardo Magalhães e suas implicações para o abastecimento público de Palmas – TO**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SOARES, M. C. S.; HUSZAR, V. L.; MIRANDA, M. N.; MELLO, M. M.; ROLAND, F.; LÜRLING, M. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. **Hydrobiologia**, v. 717, n. 1, p. 1-12, 2013.

SONG, W.; RAVINDRAN, V.; PIRBAZARI, M. Process optimization using a kinetic model for the ultraviolet radiation-hydrogen peroxide decomposition of natural and synthetic organic compounds in groundwater. **Chemical Engineering Science**, v. 63, n. 12, p. 3249-3270, 2008.

SPERLING, E. V.; JARDIM, F. A. Influence of climatic conditions on cyanobacteria blooms in a tropical water supply river. In: 34 WEDC CONFERENCE. LOUGHBOROUGH. **Proceedings Loughborough University**, v. 1, p. 832-836, 2009.

STEFFENSEN, D.; BURCH, M.; NICHOLSON, B.; DRIKAS, M.; BAKER, P. Management of toxic blue-green algae (cyanobacteria) in Australia. **Environ. Toxicol.**, v. 14, n. 1, p. 183-195, 1999.

TANBER, G. **Toxin leaves 500,000 in northwest Ohio without drinking water**, **Reuters**, 2014. Disponível em: < <http://www.reuters.com/article/us-usa-water-ohio-idUSKBN0G20L120140802>>. Acesso em: 19 mai de 2016.

TINÔCO, D. J. **Desinfecção por radiação ultravioleta: estudo do desempenho do processo e avaliação econômica**. 2011. 229 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, São Paulo. 2011.

TOOR, R.; MOHSENI, M. UV/H₂O₂ based AOP and its integration with biological activated carbon treatment for DBP reduction in drinking water. **Chemosphere**, v. 66, p. 2087-2095, 2006.

THOMSON, J.; RODDICK, F.A.; DRIKAS, M. Vacuum ultraviolet irradiation for natural organic matter removal. **J. Water SRT Aqua**, v.53, n.4, p.193–206, 2004.

USEPA – United States Environmental Protection Agency, Alternative Disinfectants and Oxidants. **Guidance Manual**, Cincinnati, Ohio, EUA (a), 1999.

URIGAN, M. A. B.; VAZ, S.R.; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação de poluentes emergentes por processos Fenton e foto-Fenton. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1381-1387, 2012.

VAN DER KOOIJ, D. Assimilable Organic Carbon as an Indicator of Bacterial Regrowth. **Research & Technology**, v. 84, n. 2, p. 57-65, 1992.

VAN DER KOOIJ, D. Determining the Concentration of Easily Organic Carbon in Drinking Water. **Journal of American Water Work Association**, v. 74, p. 540-559, 1982.

VAN DER KOOIJ, D.; HIJNEN, W.A.M.; KRUIHOF, J.C. The effects of ozonation, biological filtration and distribution on the concentration of easily assimilable organic carbon (AOC) in drinking water. **Ozone Science Eng.**, v. 11, p. 297-311, 1989.

VAN DER KOOIJ, D. Assimilable organic carbon (AOC) in treated water: determination and significance. In: **Encyclopedia of Environmental Microbiology**, Bitton, G. (Ed.), John Wiley & Sons, Hoboken, USA, 312 – 327p., 2002.

WANG, G.S.; LIAO, C.H.; CHEN, H.W.; YANG, H.C. Characteristics of natural organic matter degradation in water by UV/H₂O₂ treatment. **Environ. Technol.**, v. 27, p. 277-287, 2006.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating 1 st and 2nd addenda**. V1, Recommendations. – 3 rd ed. Geneva, 2008

WEF - WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Wastewater Disinfection – Manual of Practice FD-10. 1. ed. Alexandria – VA: WEF, 299 p., 1996.

WESTPHALEN, A. P. C.; CORÇÃO, G.; BENETTI, A. D. Utilização de carvão ativado biológico para o tratamento de água para consumo humano. **Eng Sanit Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 425-436, 2016.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The Ecology Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space**. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. 669p. 2000.

YANG, X.; GUO, W.; SHEN, Q. Formation of disinfection byproducts from chlor(am)ination of algal organic matter. **J. Hazard. Materials**, v. 197, p. 378-388, 2011.

YOO, R. S. **Cyanobacterial (blue-green Algal) Toxins : A resource Guide**. U.S.A: American Water Works Association, 229 p., ISBN 0-89867.824-2, 1995.