



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL
MESTRADO EM ENGENHARIA CIVIL
SANEAMENTO AMBIENTAL**

ALLAN CLEMENTE DE SOUZA

**EFEITO EM CIANOBACTÉRIAS FILAMENTOSAS DAS CONDIÇÕES
HIDRÁULICAS DA COAGULAÇÃO E FLOCULAÇÃO NA PRESENÇA OU NÃO
DE PRÉ-OXIDAÇÃO**

**FORTALEZA
2019**

ALLAN CLEMENTE DE SOUZA

EFEITO EM CIANOBACTÉRIAS FILAMENTOSAS DAS CONDIÇÕES HIDRÁULICAS
DA COAGULAÇÃO E FLOCULAÇÃO NA PRESENÇA OU NÃO DE PRÉ-OXIDAÇÃO

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil. Área de Concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. José Capelo Neto.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S713 Souza, Allan Clemente de.
Efeito em cianobactérias filamentosas das condições hidráulicas da coagulação e floculação na presença ou não de pré-oxidação / Allan Clemente de Souza. – 2019.
124 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil: Saneamento Ambiental, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. José Capelo Neto.
1. Teste exato de Fisher. 2. Odds ratio. 3. Regressão logística. 4. Cianobactérias filamentosas. 5. Tratamento de água. I. Título.

CDD 628

ALLAN CLEMENTE DE SOUZA

EFEITO EM CIANOBACTÉRIAS FILAMENTOSAS DAS CONDIÇÕES HIDRÁULICAS
DA COAGULAÇÃO E FLOCULAÇÃO NA PRESENÇA OU NÃO DE PRÉ-OXIDAÇÃO

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil. Área de Concentração: Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 22/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Capelo Neto (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr(a). Vanessa Becker
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof.^a Dr(a). Sílvia Maria de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fernando José Araújo da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.
A minha esposa, Izabelle.
Aos meus pais, José de Souza Neto e Vandir
Clemente de Souza e meus irmãos Thiago,
Vanessa, Raquel, Davi e Tomás.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. José Capelo Neto, meu Orientador, pela sua atenciosa orientação na realização deste trabalho, bem como pela sua presteza e prontidão.

Aos professores participantes da banca examinadora Dr(a). Helena Becker, Dr(a). Sílvia Maria de Freitas, e Dr. Fernando José Araújo da Silva pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Ma. Antonia Samylla, amiga, coorientadora, por ter me guiado na trajetória da pesquisa, à mestranda Indira Menezes, pelas incontáveis horas de trabalho que viabilizaram esse trabalho e à Amanda Viana, pela dedicação e auxílio nas análises de microscopia.

Aos amigos do SELAQUA Eduardo (“BDML”), Dayvson (na última hora!), “Hilton” (Hilder), “Balboa” (Matheus), Jackson, Renan, Marciana, Marianna, Helísia, Cida (“Maria Aparecida”), Diana (pelo risco de vida com o Hg), Jolita e Jéssica, Suiane (“Suzane”), Pedro (Mossoró), João (PET) e João Victor agradeço pelo companheirismo, pelo aprendizado, pelas conversas e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Prof. Dr. Ismael Carloto e ao Dr. Mario Ubirajara, por compartilharem seus conhecimentos, por estarem sempre à disposição e ajudarem na elaboração desse trabalho.

Aos colegas Anderson Honório, Misael Torres, Paulo Coelho, Silvio Luiz pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

A Shirley Gomes e a Edneuzza Firmino por toda ajuda nos assuntos administrativos ao longo de todo o curso.

A todos os professores que tive o privilégio de ter ao longo do mestrado.

A minha esposa Maria Izabelle Fontes Pinheiro pela força, companheirismo, paciência e todo amor que me fez conseguir alcançar esse objetivo.

Em especial e em memória ao meu pai, José de Souza Neto, por todos os ensinamentos, amor e dedicação que me ensinara a admirar e sonhar em ser um dia engenheiro.

A minha mãe, Vandir Clemente de Souza, exemplo de garra, força, coragem e fé por ensinar até hoje como lutar e não desistir de dos objetivos, mesmo diante das inúmeras dificuldades.

“Ora, o SENHOR disse a Abrão: Sai-te da tua terra, da tua parentela e da casa de teu pai, para a terra que eu te mostrarei.

E far-te-ei uma grande nação, e abençoar-te-ei e engrandecerei o teu nome; e tu serás uma bênção.

E abençoarei os que te abençoarem, e amaldiçoarei os que te amaldiçoarem; e em ti serão benditas todas as famílias da terra.

Assim partiu Abrão como o Senhor lhe tinha dito, e foi Ló com ele; e era Abrão da idade de setenta e cinco anos quando saiu de Harã.

Gênesis 12:1-4”. *Gênesis 12:1-4*

RESUMO

Pouca informação acerca dos possíveis efeitos deletérios das etapas de pré-oxidação, coagulação e floculação em *Dolichospermum circinale* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, cianobactérias cosmopolitas e potencialmente tóxicas são encontradas na literatura. Portanto, o presente estudo avaliou, na presença e ausência de pré-oxidação, os impactos causados pela coagulação (mistura rápida) e floculação (mistura lenta) em *D. circinale* e de *C. raciborskii*. Para tal, foram realizados experimentos, em escala de bancada, que simularam os efeitos mecânicos dessas etapas na presença ou não dos oxidantes Cl_2 ou KMnO_4 e utilizaram as recomendações de gradiente de velocidade e tempo de mistura sugeridas por normas técnicas internacionais. Para análise dos dados, dois métodos estatísticos foram comparados. Na abordagem tradicional (teste exato de Fisher e razão de chances - OR) se mostrou apropriado para identificar a associação entre causas (condições experimentais) e efeito (integridade celular), respeitando as características específicas de cada espécie. Na abordagem multivariada, utilizando regressão logística, os OR estimados requereram uma interpretação diferenciada em relação à abordagem tradicional, pois as estimativas foram ajustadas para o efeito de todas as variáveis do modelo. Com isso, os resultados de integridade celular de uma espécie influenciaram nas chances da outra. Adicionalmente, os resultados encontrados apontaram que apenas as condições hidráulicas da mistura rápida (gradiente de velocidade de 750 s^{-1} durante 60 s) reduziram as chances de células íntegras de *D. circinale* para menos de 50% em comparação com as condições iniciais. Já na presença de 1 mg.L^{-1} de qualquer um dos dois oxidantes, essas chances caem para menos de 5%. Os resultados evidenciaram que *C. raciborskii* se mostrou imune aos efeitos das condições hidráulicas da mistura rápida e lenta (gradiente de velocidade de 70 s^{-1} durante 14 min) mesmo na presença de 1 mg.L^{-1} de Cl_2 ou até 4 mg.L^{-1} de KMnO_4 . Contudo, a partir de 2 mg.L^{-1} de Cl_2 , as chances de encontrar células íntegras após a mistura rápida ou lenta reduzem para menos de 6% das condições experimentais iniciais. Os estresses hidráulicos também podem reduzir significativamente o comprimento dos tricomas de *D. circinale* tanto na ausência quanto na presença dos oxidantes, fato observado também em *C. raciborskii* apenas na presença da etapa de pré-oxidação. Os resultados obtidos apontaram que as condições hidráulicas recomendadas por normas técnicas podem causar lise apenas nas cepas de *D. circinale*, mas não em *C. raciborskii*. Isso enfatiza que tanto projeto quanto operação das estações de tratamento de água devem ser ajustados de acordo com a espécie dominante no manancial, principalmente, quando se realiza a etapa de pré-oxidação.

Palavras-chave: Teste exato de Fisher. Odds ratio. Regressão logística. Cianobactérias filamentosas. *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Dolichospermum circinale*

ABSTRACT

There is a lack of information in the literature on the possible harmful effects of the pre-oxidation, coagulation and flocculation steps in *Dolichospermum circinale* and *Cylindrospermopsis raciborskii*, cosmopolitan and potentially toxic cyanobacteria. Therefore, the present study evaluated, in the presence and absence of pre-oxidation, the impacts caused by coagulation and flocculation in *D. circinale* and *C. raciborskii*. For this purpose, bench scale experiments were performed to simulate the mechanical effects of coagulation (rapid mixing) and flocculation (slow mixing) steps in the presence or absence of the oxidants Cl_2 or KMnO_4 and using the recommendations of the velocity gradient and mixing time suggested by international technical standards. For statistical analysis, two methods were compared. In the traditional approach (Fisher exact test and odds ratio - OR), it was appropriated to identify the association between causes (experimental conditions) and effect (cell integrity), respecting the specific characteristics of each species. In the multivariate approach using logistic regression, the estimated ORs required a differentiated interpretation in relation to the traditional approach, since the estimates were adjusted for the effect of all variables of the model. Thus, the cell integrity results of one species influenced the odds of the other one. Additionally, the results demonstrated that only hydraulic conditions of rapid mixing (velocity gradient of 750 s^{-1} for 60 s) reduced the chances of *D. circinale* intact cells to less than 50% compared to baseline conditions. Already in the presence of 1 mg.L^{-1} of either of the two oxidants, these odds decay to less than 5%. The results showed that *C. raciborskii* was immune to the effects of hydraulic conditions of fast and slow mixing (velocity gradient of 70 s^{-1} for 14 min) even in the presence of 1 mg.L^{-1} of Cl_2 or up to 4 mg.L^{-1} of KMnO_4 . However, with 2 mg.L^{-1} of Cl_2 , the chances of finding intact cells after rapid or slow mixing reduce to less than 6% of the initial experimental conditions. Hydraulic stresses can also significantly reduce the length of *D. circinale* trichomes in both the absence and presence of oxidants, a fact also observed in *C. raciborskii* only in the presence of the pre-oxidation stage. The results obtained indicated that the hydraulic conditions recommended by technical standards could cause lysis only in the strains of *D. circinale*, but not in *C. raciborskii*. This emphasizes that both design and operation of water treatment plants should be adjusted according to the dominant species in the reservoir, especially when the pre-oxidation stage is carried out

Keywords: Fisher exact test. Odds ratio. Logistic binomial regression. Filamentous cyanobacteria. *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Dolichospermum circinale*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Justificativa do trabalho	12
1.2	Hipóteses do trabalho	16
1.3	Objetivos do trabalho	17
1.3.1	<i>Objetivo geral</i>	17
1.3.2	<i>Objetivos específicos</i> :.....	17
1.4	Estrutura e organização do trabalho	18
2	ANALISES DE DADOS CATEGÓRICOS DE INTEGRIDADE/VIABILIDADE CELULAR DE CIANOBACTÉRIAS.....	19
2.1	Introdução	20
2.2	Materiais e Métodos	24
2.2.1	<i>Banco de dados</i>	24
2.2.2	<i>Abordagem tradicional: teste exato de Fisher e o odds ratio calculado</i>	27
2.2.3	<i>Abordagem multivariada</i>	29
2.3	Resultados e discussão.....	31
2.3.1	<i>Abordagem tradicional</i>	31
2.3.2	<i>Abordagem multivariada: regressão logística</i>	35
2.4	Conclusões	45
3	EFEITOS DAS CONDIÇÕES HIDRÁULICAS DA COAGULAÇÃO-FLOCULAÇÃO EM <i>Dolichospermum circinale</i> E <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> NA PRESENÇA OU NÃO DE PRÉ-OXIDAÇÃO COM KMnO ₄ E CL ₂ : AS RECOMENDAÇÕES DAS NORMAS TÉCNICAS INTERNACIONAIS AUMENTAM AS CHANCE DE LISE?	53
3.1	Introdução	55
3.2	Materiais e métodos.....	59
3.2.1	<i>Diagrama experimental</i>	59
3.2.2	<i>Análises estatísticas e integridade celular</i>	63
3.3	Resultados.....	66
3.3.1	<i>Efeitos dos estresses causados pela mistura rápida e lenta na ausência de pré-oxidação</i>	66
3.3.1.1	<i>Efeito da mista rápida e lenta sobre a integridade celular</i>	67

3.3.1.2	<i>Impacto da mistura rápida e lenta nos tricomas</i>	70
3.3.1.3	<i>Medida da associação entre os efeitos hidráulicos na ausência de pré-oxidação</i>	72
3.3.2	<i>Efeitos dos estresses causados pela mistura rápida e lenta na presença da etapa de pré-oxidação</i>	74
3.3.2.1	<i>Efeito dos estresses causados pela mistura rápida e lenta sobre a integridade celular na presença de pré-oxidação</i>	74
3.3.2.2	<i>Efeitos da mistura rápida e da mistura lenta na redução dos tricomas na presença de pré-oxidação</i>	76
3.3.2.3	<i>Medida da associação dos estresses causados pela mistura rápida e lenta na presença de pré-oxidação</i>	78
3.3.3	<i>Efeitos da mistura rápida e lenta na presença ou não de pré-oxidação em parâmetros físico-químicos</i>	80
3.4	Discussão	84
3.4.1	<i>Efeitos da mistura rápida e lenta</i>	84
3.4.2	<i>Efeitos da pré-oxidação</i>	89
3.5	Conclusão	94
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS	104
	REFERÊNCIAS	106
	APÊNDICE A – Quadro com os valores do OR_{rel} e IC(95%)	123
	APÊNDICE B – Quadro com os p-valores dos testes de Wilcoxon	124

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa do trabalho

Devido, principalmente, a uma longa história evolutiva e ao modo de vida fotoautotrófico que garante sua presença em diversos ambientes, as cianobactérias são o grupo mais importante de organismos vivos em termos de abundância no planeta (PADE; HAGEMANN, 2015). Apesar do papel extremamente relevante na biosfera, produzindo de 30% a 40% do total de oxigênio atmosférico, esses organismos podem causar alguns efeitos nocivos aos ecossistemas aquáticos. Por exemplo, durante surtos populacionais, fenômeno conhecido como floração ou bloom, as cianobactérias inibem vários organismos, limitando o acesso à luz ou liberando metabólitos tóxicos (cianotoxinas) no meio aquático (CEPOI, 2019).

No panorama do tratamento de água, as florações de cianobactérias impactam severamente o desempenho das estações de tratamento de água (ETA) (BARROS *et al.*, 2017; CAPELO NETO; NEYCOMBE, 2017; LI, X.; DREHER; LI, 2016; LOPES *et al.*, 2015; WERT *et al.*, 2014). A presença desses organismos em certas concentrações na água bruta pode acarretar diversos problemas, tais como:

- a redução da eficiência e aumento do consumo de químicos na coagulação, impactando os custos operacionais (LIU, B. *et al.*, 2017; XIE *et al.*, 2016);
- a colmatação prematura de unidades filtrantes (PESTANA *et al.*, 2018);
- liberação de compostos capazes de alterar as características organolépticas da água, influenciando na aceitação da água tratada pelos consumidores (HE *et al.*, 2016; LI, L. *et al.*, 2019; PESTANA *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2016);
- a produção de precursores dos subprodutos da desinfecção potencialmente carcinogênicos (QI *et al.*, 2016; RIZZO, 2014; YANG; GUO; LEE, 2013);
- a inviabilização do reuso de sobrenadantes dos lodos de flocculadores e decantadores (PESTANA *et al.*, 2016) e aumento da toxicidade dos lodos gerados na ETA (HO *et al.*, 2012; LI, H. *et al.*, 2018) e;
- a liberação de cianotoxinas (ALCÂNTARA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2014; GREENFIELD *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2016; LI; DREHER; LI, 2016).

O tratamento de água é composto por várias etapas que podem ocasionar lise em cianobactérias (PESTANA *et al.*, 2018). Dentre essas etapas, a coagulação possui grande destaque, relatado em vários trabalhos (CHEN; YEH; TSENG, 2009; HO *et al.*, 2012; LIU, R. *et al.*, 2018; MUCCI *et al.*, 2017; QIAN *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2012). Em linhas gerais, esse processo desestabiliza partículas inorgânicas e orgânicas por intermédio da ação de químicos (coagulantes e pré-oxidantes) acompanhado de intensa agitação em um curto intervalo de tempo, possibilitando a remoção dessas partículas nas etapas de tratamento posteriores (HUSSAIN *et al.*, 2019; KAN; HUANG; PAN, 2002; LIU *et al.*, 2018).

Em águas oriundas de mananciais eutrofizados ou com elevada carga orgânica, o uso da pré-oxidação pode melhorar a eficiência da coagulação (JIAN *et al.*, 2019; LI, H. *et al.*, 2018; LIN, J. L. *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2016). No entanto, esse processo pode deteriorar a estrutura de cianobactérias, destruindo o revestimento orgânico na superfície das células (CHEN; YEH; TSENG, 2009; JIAN *et al.*, 2019; LI, H. *et al.*, 2018; LIN, J. L. *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2016).

Entretanto, estudos apontam que diferentes espécies de cianobactérias reagem de forma distinta aos estresses químicos e físicos do tratamento de água. Lin *et al.* (2009) observaram uma maior suscetibilidade do gênero *Anabaena* à oxidação por cloro em comparação com *Microcystis*. Já Coral *et al.* (2013) observaram que após o tempo de contato de trinta segundos com 2 mg.L⁻¹ de ozônio, as células de *Anabaena flos-aquae* pareceram mais impactadas do que *Microcystis aeruginosa* (*M. aeruginosa*). Lin *et al.* (2018) observaram que a pré-oxidação com NaOCl (sozinho ou associado ao ClO₂) rompeu células de *M. aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* (*C. raciborskii*) em diferentes níveis. De acordo com Zamyadi *et al.* (2012), um CT (concentração x tempo) > 31 mg.min.L⁻¹ foi capaz de comprometer a integridade de mais de 99% das células de *M. aeruginosa*, enquanto aproximadamente 8 mg.min.L⁻¹ já foi o suficiente para impactar de forma similar *Anabaena circinalis* (*Dolichospermum circinale* - *D. circinale*), *C. raciborskii* e *Anabaena issatsckenka*.

Fato análogo ocorre também na coagulação. Enquanto dosagens maiores do que 10 mg.L⁻¹ de cloreto férrico de polialumínio induziu liberações extras de cilindrospermopsina oriundas da lise celular de *C. raciborskii*, *M. aeruginosa* não foi afetada por dosagem de até 30 mg.L⁻¹ do mesmo químico (LI, H. *et al.*, 2018).

PESTANA *et al.* (2018) observaram a diferença de alguns gêneros filamentosos em várias etapas do tratamento em ETA piloto e convencional. Em resumo, os autores apontaram que gêneros de cianobactérias filamentosas com tricomas maiores e com mais do que 30 células (*Planktothrix*, *Geitlerinema* e *Dolichospermum*) são mais susceptíveis aos estresses do

tratamento (perda de integridade celular e/ou redução do tricoma), tais com pré-oxidação e coagulação, do que as com tricomas com menos de 12 células (*Pseudanabaena* e *Planktolyngbya*).

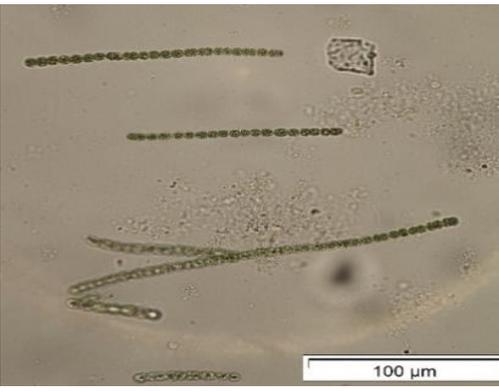
De acordo com Tabela 1, apesar de *C. raciborskii* e *D. circinale* serem filamentosas, essas espécies possuem diferentes características morfológicas. Isso pode explicar, em parte, o comportamento diferenciado na pré-oxidação e na coagulação. Além disso, ressalta-se que *C. raciborskii* e *D. circinale* são comumente encontradas em diversas partes do mundo e em certas condições são capazes de produzir toxinas (microcistinas, saxitoxinas, cilindrospermopsinas e anatoxinas) ou compostos organolépticos, tais como 2-metilisoborneol (MIB) e geosmina, que podem alterar o sabor e odor da água tratada.

À luz desses fatores, a evidente necessidade de pesquisas com *C. raciborskii* e *D. circinale*, contrasta com a pouca informação sobre as condições operacionais ótimas que devem ser praticadas na ETA na presença desses organismos na água bruta. Apesar dos resultados apresentados por PESTANA *et al.* (2018), o comportamento de *C. raciborskii* e *D. circinale* em condição de agitação e recomendada para coagulação e floculação pela American Water Works Association (AWWA) e American Society of Civil Engineers (ASCE) e Ten State Standards e a nacional NBR 12.216/1992, na presença ou não de pré-oxidantes, ainda é pouco conhecido.

Para que seja possível o estudo de *C. raciborskii* e de *D. circinale* nessa condição, faz-se necessário tanto a utilização de uma técnica que permita avaliar a integridade celular dessas espécies como uma metodologia estatística de análise dos dados obtidos. Nesse sentido, no presente trabalho, utilizou-se a eritrosina B ($C_{20}H_{14}Na_2O_5$), um corante biológico que pode ser usado para distinguir células íntegras das não íntegras, visto que além de seu baixo custo, estudos apontam sua eficiência em aplicações similares (CALOMENI; RODGERS, 2015; KOHLHARDT-FLOEHR *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2019). Além disso, como os dados obtidos por essa técnica são categóricos e dicotômicos (células íntegras ou não), foram aplicadas duas abordagens estatísticas:

- (1) abordagem multivariada, utilizando regressão logística para estimar o odds ratio ajustado (\widehat{OR}) (com intervalo de confiança de 95%), e;
- (2) abordagem tradicional, utilizando tabelas de contingência e os teste qui-quadrado, teste exato de Fisher ou McNemar e o odds ratio calculado (OR) (com intervalo de confiança de 95%).

Tabela 1 -Características gerais das cianobactérias *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Dolichospermum circinale*

Característica	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	<i>Dolichospermum circinale</i>
Aspecto		
Tricomas	Filamento na forma de talos, solitários, retos, curvados ou irregularmente enrolados em forma de parafuso, flutuando livremente, estreitando-se para as extremidades (em algumas espécies)	solitários ou em pequenos aglomerados irregulares, apresentam-se retos, ligeiramente curvos ou flexuosos (torcidos)
bainha mucilaginosa	Ausente	Presente, estreita e difluente
Células	Cilíndricas ou forma de barril (D=2-3µm e L=7-11µm)	Esféricas, forma de barril ou ou quase cilíndricas, geralmente isodiamétricas (D=8-13µm, L=7,5-12µm)
Areótopos	Presente, não obrigatoriamente	Presente, obrigatoriamente
Heterocitos	Cônicos, terminais, (D=3-5µm, L=10-13µm)	Mais ou menos esféricos, (D=9-12µm)
Acinetos	Cilíndricos, distantes dos Heterocitos, (D= 4-5µm, L=13-16µm)	Cilíndricos, isolados ou em pares, distantes dos heterocitos (D=14-23µm, L=18-25µm)
Localidades onde foram encontradas	África, Ásia, Austrália, Europa, América do Sul e América do Norte (CALANDRINO; PAERL, 2011; RZYMSKI <i>et al.</i> , 2017); Brasil (BARROS <i>et al.</i> , 2017; LOPES <i>et al.</i> , 2015);	Rússia (CHERNOVA <i>et al.</i> , 2017) Austrália (PEREYRA <i>et al.</i> , 2017) China (LIU, Y. <i>et al.</i> , 2014), Canadá e Estados Unidos (CARMICHAEL; BOYER, 2016); Brasil (BARROS <i>et al.</i> , 2017; LOPES <i>et al.</i> , 2015);
Substâncias produzidas	Cilindrospermopsina, saxitoxina e anatoxina (CALANDRINO; PAERL, 2011; HOFF-RISSETI <i>et al.</i> , 2013; RZYMSKI <i>et al.</i> , 2017; STUCKEN <i>et al.</i> , 2009)	Microcistina; Anatoxina-a (2016); Anatoxina-a(S); Saxitoxina; Cilindrospermopsina; MIB e Geosmina (CARMICHAEL; BOYER, 2016; CHERNOVA <i>et al.</i> , 2017; LI, X.; DREHER; LI, 2016; LIU, Y. <i>et al.</i> , 2014)

Fonte: (GENUÁRIO *et al.*, 2019; KOMÁREK; JOHANSEN, 2015; SANT'ANNA, 2012)

Foi realizado ainda uma comparação entre as duas técnicas, bem com a proposição de alguns métodos de avaliação da qualidade do modelo utilizando o software gratuito RStudio. Até a presente data, não foram encontrados trabalhos que ofereçam um roteiro prático que

descreva tanto a metodologia de avaliação de integridade celular e nem as abordagens estatísticas propostas aqui. Adicionalmente, tão pouco foram relatados em estudos anteriores o impacto do Cl_2 , do KMnO_4 ou das condições hidráulicas praticadas e recomendadas por normas técnicas internacionais e a nacional na etapa de coagulação e floculação sobre a lise de *C. raciborskii* e *D. circinale*.

1.2 Hipóteses do trabalho

De acordo com os temas abordados, as hipóteses avaliadas nesse trabalho foram:

Hipótese 1: Utilizando uma abordagem multivariada com regressão logística, é possível identificar a associação entre as causas (condições experimentais avaliadas ou covariáveis) e os efeitos observados (organismos íntegros ou não) e mensurá-la através do *odds ratio* estimado (com intervalo de confiança a 95%).

Hipótese 2: A abordagem multivariada com regressão logística é mais apropriada para os dados experimentais do que a abordagem tradicional (usado teste qui quadrado, teste exato de Fisher ou McNemar) para a identificação de associação das causas com os efeitos observados do que o odds ratio calculado (com intervalo de confiança a 95%, como medida de associação) para quantificação do nível de associação;

Hipótese 3: As condições operacionais ou recomendações para projetos das unidades de mistura rápida (câmara de mistura rápida) e mistura lenta (floculador) indicadas tanto pela norma técnica nacional quanto pelas internacionais quebram os tricomas e lisam as células de *C. raciborskii* e *D. circinale*.

Hipótese 4: A pré-oxidação potencializa os efeitos deletérios nos tricomas e nas células de *C. raciborskii* e *D. circinale* causados pelas condições hidráulicas da mistura rápida e da lenta recomendados tanto por normas internacionais quanto pela nacional.

1.3 Objetivos do trabalho

1.3.1 *Objetivo geral*

Avaliar os efeitos dos parâmetros operacionais recomendados por normas técnicas (internacionais e nacional) para as etapas de coagulação e floculação em células e tricomas de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Dolichospermum circinale*, tanto na presença quanto na ausência de pré-oxidação com Cl_2 e KMnO_4 .

1.3.2 *Objetivos específicos:*

1 Utilizar a abordagem multivariada (regressão logística e *odds ratio* estimado com intervalo de confiança de 95%) para identificar a associação entre as causas os efeitos observados e mensurá-la;

Comprovar que as condições operacionais ou recomendações para projetos das unidades de mistura rápida e mistura lenta indicadas tanto pela norma técnica nacional quanto pelas internacionais danificam os tricomas e lisam as células de *C. raciborskii* e *D. circinale*;

2 Verificar se ocorre e quantificar a potencialização da pré-oxidação nos efeitos deletérios nos tricomas e nas células de *C. raciborskii* e *D. circinale* causados pelas condições hidráulicas da mistura rápida e da lenta;

3 Avaliar se o KMnO_4 causa mesmos danos aos tricomas e às células de *C. raciborskii* e de *D. circinale* do que o Cl_2 nas etapas de mistura rápida e lenta.

1.4 Estrutura e organização do trabalho

O trabalho foi estruturado em 5 partes:

- A Seção 1: é composta de introdução e justificativa, hipóteses, objetivos gerais e específicos, estrutura do trabalho e bibliografia;
- A Seção 2: Busca-se avaliar técnicas estatísticas para a análise dos dados. Optou-se por estruturar essa seção nos moldes de um artigo científico, submetido à revista DAE, com o título “Análise de dados categóricos de integridade celular de cianobactérias”.
- A Seção 3: trata-se da seção principal, nessa fase os conhecimentos da Seção 2 foram aplicados, o que permitiu cumprir o objetivo geral do trabalho. Como na Seção 2, esta seção foi estruturada nos moldes de um artigo a ser submetido à revista Water Research com o título: “Hydraulic Conditions’ Effects of Coagulation-Flocculation on Dolichospermum circinale and Cylindrospermopsis raciborskii With or Without Preoxidation Using KMnO4 And Cl2: Does The International Standards Increase The Odds of Lyse?”.
- A Seção 4: esta seção é composta das considerações finais e propostas para futuros trabalhos;
- Na última seção encontram-se as referências bibliográficas e os Apêndices com o material suplementar dos dois artigos.

2 ANÁLISES DE DADOS CATEGÓRICOS DE INTEGRIDADE/VIABILIDADE CELULAR DE CIANOBACTÉRIAS

CATEGORICAL DATA ANALYSIS OF CELL INTEGRITY / VIABILITY OF CYANOBACTERIA: TRADITIONAL OR MULTIVARIATE APPROACH?

Allan Clemente de Souza*

RESUMO

Algumas técnicas utilizadas em estudos de integridade/viabilidade celular de cianobactérias fornecem duas respostas: células intactas ou não. Apesar de uma vasta literatura descrever os procedimentos operacionais dessas metodologias, se dispõe de pouca informação das possíveis abordagens estatísticas aplicáveis para a análise e interpretação dos dados dicotômicos obtidos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é apresentar duas metodologias para análise desses dados, mostrando uma sequência detalhada de procedimentos que permitam analisar, com o rigor estatístico necessário, dados categorizados de integridade/viabilidade celular. Para tal, foram utilizados 3600 registros de um banco de dados com os resultados de integridade celular de *Dolichospermum circinale* e *Cylindrospermopsis raciborskii*. Dentre os resultados, a abordagem tradicional (teste exato de Fisher utilizando tabelas de contingência 2 x 2), apesar de ser um procedimento laborioso, se mostrou apropriado para identificar a associação entre causas (condições experimentais) e efeito (integridade celular), respeitando as características específicas de cada espécie. Ainda nessa abordagem, o cálculo da razão de chances (*OR*) permitiu mensurar as associações. Na abordagem multivariada, os procedimentos para regressão logística foram menos trabalhosos, porém os *OR* estimadas requerem uma interpretação diferenciada em relação à abordagem tradicional, pois as estimativas são ajustadas para o efeito de todas as outras variáveis do modelo, fazendo com que os resultados de integridade de uma espécie influenciem nas chances de outra. Os resultados obtidos sugerem que tanto a abordagem tradicional quanto a multivariada fornecessem subsídios estatísticos suficientes para evitar interpretações equivocadas dos dados. Ressalta-se, todavia, que as

* Universidade Federal do Ceará - UFC, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental - DEHA, Seção Laboratorial de Qualidade de água – SELAQUA | allan.clemente@alu.ufc.br

particularidades de cada abordagem apresentadas nesse trabalho devem ser consideradas para a correta escolha de uma das técnicas apresentadas.

Palavras-chave: Teste exato de Fisher. Odds ratio. Regressão logística. Cianobactérias filamentosas. *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Dolichospermum circinale*

ABSTRACT

Some techniques used in cyanobacterial cell integrity / viability studies provide two outcomes: intact cells or not. Although a large literature describes the operational procedures of these methodologies, little information is available on the possible statistical approaches that can be applied to the analysis and interpretation of the dichotomous data obtained. In this context, the aim of this paper is to present two methodologies for the analysis of these data, showing a detailed sequence of procedures that allow analyzing, with the necessary statistical accuracy, categorized cell integrity / viability data. For this, it was used 3600 records of a database with the results of cellular integrity of *Dolichospermum circinale* and *Cylindrospermopsis raciborskii*. Among the results, the traditional approach (Fisher's exact test using 2 by 2 contingency tables), despite being a laborious procedure, proved appropriate to identify the association between causes (experimental conditions) and effect (cellular integrity), respecting the specific characteristics of each species. Still in this approach, the odds ratio (OR) calculation allowed to measure the associations. In the multivariate approach, procedures for logistic regression were less labor intensive, but the estimated OR requires a differentiated interpretation in relation to the traditional approach, since the estimates are adjusted for the effect of all other variables of the model, causing the integrity results of one species influence the chances of another. The results suggest that both traditional and multivariate approaches provide the necessary statistical inputs to avoid misinterpretation of the data. It should be noted, however, that the particularities of each approach presented in this work should be considered for the correct choice of one of the presented techniques.

Keywords: Fisher exact test. Odds ratio. Logistic binomial regression. Filamentous cyanobacteria. *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Dolichospermum circinale*

2.1 Introdução

Apesar dos avanços tecnológicos no tratamento de água, as cianobactérias continuam sendo um dos principais problemas enfrentados pelas empresas de saneamento no

mundo (CEPOI, 2019; CHEN; YEH; TSENG, 2009; HO *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2019; LI, D.; LIU, 2019; LIU, R. *et al.*, 2018; MUCCI *et al.*, 2017; QIAN *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2016). Além disso, a presença desses organismos nos corpos hídricos pode comprometer a qualidade do tratamento de água pela liberação de metabólitos tóxicos e que conferem sabor e odor à água tratada (CAPELLI *et al.*, 2017; CHERNOVA *et al.*, 2017; CHISWELL *et al.*, 1999; DÍEZ-QUIJADA *et al.*, 2019; DREHER *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2014; HO *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2014; KUBÍČKOVÁ *et al.*, 2018; LIU, B. *et al.*, 2017; PANTELIĆ *et al.*, 2013; RZYMSKI *et al.*, 2017; SHAFIK *et al.*, 2003; WILLIS *et al.*, 2016).

Estudos revelam uma disparidade entre os comportamento de diferentes cianobactérias frente aos stress causados nas etapas do tratamento de água, tais como a pré-oxidação (CHEN; YEH; TSENG, 2009; JIAN *et al.*, 2019; LI, H. *et al.*, 2018; LIN, J. L. *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2016), na coagulação (LI, H. *et al.*, 2018; LIN, J. L. *et al.*, 2016; QIAN *et al.*, 2014; ZAMYADI *et al.*, 2015), na filtração (PESTANA *et al.*, 2018) e até nos estoques de lodo (PESTANA *et al.*, 2016; ZAMYADI *et al.*, 2015; ZAMYADI; MACLEOD *et al.*, 2012). Em parte, essas constatações foram possíveis graças a estudos que avaliaram a integridade ou a viabilidade celular.

No que se refere a técnica de estudo de integridade, o SYTOX green é um corante verde que pode permear células de cianobactérias e identificar as células que perderam a integridade da parede celular (DUGAN; SMITH; SANAN, 2018; FAN *et al.*, 2018; LÜRLING *et al.*, 2017). Esse produto é capaz de corar o ácido nucleico de células comprometidas, fazendo com que as células com maior fluorescência verde sejam identificadas como não íntegras. Já Zamyadi *et al.* (2012a) avaliaram a viabilidade celular de *M. aeruginosa*, *C. raciborskii*, *D. Circinale* e *Aphanizomenon issatschenkai* após cloração usando diacetato de fluoresceína (FDA) – coloração por iodeto de propídio (IP). O IP apenas infiltra a membrana das células danificadas, liga-se aos ácidos nucleicos e causa um aumento da fluorescência vermelha ao microscópio.

Markelova; Vladimirova; Kuptsova (2000) constataram em ensaios de integridade que células coradas com eritrosina B eram facilmente discernidas de células não coradas. A eritrosina B (C₂₀H₆I₄Na₂O₅) é um corante biológico que pode ser usado para distinguir células íntegras das não íntegras. Esse corante não adentra células íntegras, mantendo sua aparência natural mesmo em sua presença. Já em células com a integridade comprometida, a eritrosina B penetra e se acumula no citoplasma produzindo uma cor rosa passível de ser observada por microscopia óptica (KOHLEHARDT-FLOEHR *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2019), inclusive em *M. aeruginosa* (CALOMENI; JR, 2015; TSAI, 2015). Além das aplicações envolvendo

integridade, a eritrosina B pode ser usada para facilitar a contagem de organismos, como os da meiofauna (CAPDEVILLE *et al.*, 2018; HERBERT, 1990)

Além do uso de eritrosina B, Calomeni; Jr (2015) avaliaram em *M. aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* e *Pseudokirchneriella subcapitata* outras 5 técnicas de medidas de integridade/viabilidade (densidade celular, coloração vital (vermelho neutro), concentração de clorofila-a, concentração de feofitina-a e respiração por produção de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolium formazan [INT formazan]). Segundo os autores, se um determinado estímulo interrompe a integridade da membrana celular de um organismo, a eritrosina B pode ser útil na coloração das células afetadas por esse estímulo e ainda fornece maior precisão na determinação viabilidade

A maioria das técnicas mencionadas anteriormente para o estudo de integridade celular fornecem como resultados, valores categóricos e dicotômicos (e.g. células íntegras ou não íntegras). Nesses casos, tabelas de contingência 2×2 são comumente usadas para a realização do teste qui-quadrado de Pearson. Nesse teste, a hipótese nula (H_0 : não *existe associação* entre o fator experimentado e o desfecho observado) é confrontada com a alternativa (H_A : *existe associação* entre o fator experimentado e o desfecho observado) com intuito de verificar se a proporção ou probabilidade de organismo íntegros na amostra controle é a mesma do teste, por exemplo. Em resumo, a um dado nível de significância α (geralmente 5%), através do teste qui-quadrado é possível afirmar se as diferenças entre as proporções ou probabilidades no controle e na amostra teste (valores obtidos nas variáveis resposta) foram ocasionadas devidos aos fatores experimentais ensaiados (covariáveis) ou foram casados pela aleatoriedade do sistema (AGRESTI, 2012; GIOLO, 2017; OLEA-POPELKA; ROSEN, 2019; PAGANO; GAUVREAU, 2010).

Desde de seu surgimento em 1900, o teste qui-quadrado desenvolvido por Karl Pearson foi aprimorado. Apesar disso, nos casos em que as observações são dependentes ou pareadas (e.g. estudos em que os mesmos indivíduos são observados em momentos distintos) e que a frequência observada em cada célula da tabela de contingência 2×2 não é pelo menos 5, o teste qui-quadrado é inválido. Nessas situações, as opções mais acertadas seriam o teste de McNemar, para dados dependentes (ou pareados), e o de teste exato de Fisher, caso as observações sejam menores ou iguais a 5 em alguma célula da tabela de contingência 2×2 (AGRESTI, 2012; BARNARD G.A., 1945; FISHER, 1934; GIOLO, 2017; MCNEMAR, 2002; OLEA-POPELKA; ROSEN, 2019; PAGANO; GAUVREAU, 2010; PLACKETT, 1983; YATES, 1934).

Nos casos em que o investigador está interessado em avaliar o impacto de vários fatores no resultado (por exemplo, espécie de cianobactéria, presença e concentração de oxidantes na solução, gradiente de velocidade e tempo de mistura) uma abordagem multivariada usando regressão logística pode ser mais apropriada (AGRESTI, 2012; GIOLO, 2017; OLEA-POPELKA; ROSEN, 2019; PAGANO; GAUVREAU, 2010). Usando essa abordagem, pode-se prever resultados (NDONG *et al.*, 2014; SHENG *et al.*, 2012) e ainda mensurar o nível de associação entre os fatores (covariáveis) e o desfecho (variável resposta) através da razão de chances (*odds ratio*) ajustada (\widehat{OR}) (CRIDER *et al.*, 2018; JAJA-CHIMEDZA *et al.*, 2015; OSBORNE; SHAW; WEBB, 2007).

A abordagem tradicional (teste qui-quadrado, teste exato de Fisher ou teste de McNemar) não quantifica a intensidade da associação, apenas a identifica. Dessa forma, fornecer, por intermédio do \widehat{OR} , a medida de associação entre as covariáveis e a variável resposta representa uma grande vantagem para a abordagem multivariada (regressão logística). Dessa forma, caso o pesquisador necessite quantificar o nível de associação utilizando a abordagem tradicional, faz-se necessário o uso de medidas de associação, tais como: risco relativo, coeficiente de correlação de Pearson, coeficiente de correlação de Spearman e, principalmente, a razão de chances calculada (OR). Esta é função apenas dos dados da tabela de contingência 2 x 2 usada para seu cálculo, deferente da \widehat{OR} que é ajustada ao efeito de todas as variáveis de um modelo. Isso representa uma etapa a mais na análise do dados, o que pode tornar a abordagem tradicional mais laboriosa do que utilizar apenas regressão logística (AGRESTI, 2012; GIOLO, 2017; OLEA-POPELKA; ROSEN, 2019; PAGANO; GAUVREAU, 2010).

A versatilidade da regressão logística foi comentada por Stommel; Field; Caller (2013) nos seus trabalhos de investigação dos aerossóis de cianobactérias como fator de risco para esclerose lateral amiotrófica. Os autores afirmam que o risco associado às várias variáveis de exposição poderia ser estudado por análise de regressão logística, OR e seus respectivos intervalos de confiança de 95%, pois tal abordagem forneceria uma melhor compreensão de como os seres humanos podem ser ameaçados pelas cianotoxinas.

Um modelo de regressão logística binomial foi utilizado por Sheng *et al.* (2012) no Lago Dianchi, China, para identificar a relação de resposta entre as florações de cianobactérias e os fatores ambientais influenciadores (tais como qualidade de água e condições climáticas). Osborne; Shaw e Webb (2007) realizaram um estudo nas proximidades de Bribie Island, Austrália, objetivando investigar a frequência e a gravidade das lesões associadas à

exposição à cianobactéria *Lyngbya majuscula*. Por intermédio de regressão logística e \widehat{OR} os autores conseguiram evidenciar que o aumento de problemas cutâneos e oculares estavam associados com um aumento do nível de exposição à água e que a probabilidade de mulheres relatarem problemas de pele foi 50% maior do que a dos homens. Jaja-Chimedza *et al.* (2015) utilizou o teste exato de Fisher e regressão logística para determinar a relação entre a presença de polimetoxi-1-alcenos (PMA), um metabólito tóxico encontrado em *Cylindrospermopsis raciborskii*, e a teratogenicidade em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*), considerado como modelo de desenvolvimento de vertebrados. Dentre os resultados observados, o teste Exato de Fisher comprovou a associação entre os fatores estudados e o \widehat{OR} mensurou essa associação.

Além dos exemplos anteriores, outros trabalhos utilizaram a abordagem multivariada da regressão logística e \widehat{OR} em outros temas, como qualidade da água, saneamento básico e risco de eutrofização (BAKER; SHOWERS, 2019; HARRISON *et al.*, 2012; WORRALL; GIBSON; BURT, 2008); presença de compostos, organismos ou resíduos potencialmente prejudicial à saúde presentes na água e não retirados pelas estações de tratamento (AUNG *et al.*, 2019; EGOROV *et al.*, 2018; GARCÍA-PÉREZ *et al.*, 2016; TORNEVI *et al.*, 2016) e desenvolvimento de modelos de previsão da probabilidade de cenários (O'DWYER *et al.*, 2018). No entanto, até a presente data não foram encontrados trabalhos que avaliem os dados categóricos e dicotômicos de integridade celular de cianobactérias com as abordagens estatística apresentadas aqui.

Portanto, o objetivo principal desse trabalho é apresentar duas metodologias estatísticas para a análise de dados categóricos, evidenciado suas vantagens e desvantagens. Para tal foram utilizadas duas abordagens: (1) Abordagem tradicional, utilizando teste exato de Fisher e o OR a partir de tabelas de contingência 2 x 2 (com intervalo de confiança de 95%) e; (2) Abordagem multivariada, consistindo do modelo de regressão logística e o \widehat{OR} estimado (com intervalo de confiança de 95%), incluindo metodologias de avaliação da qualidade do modelo.

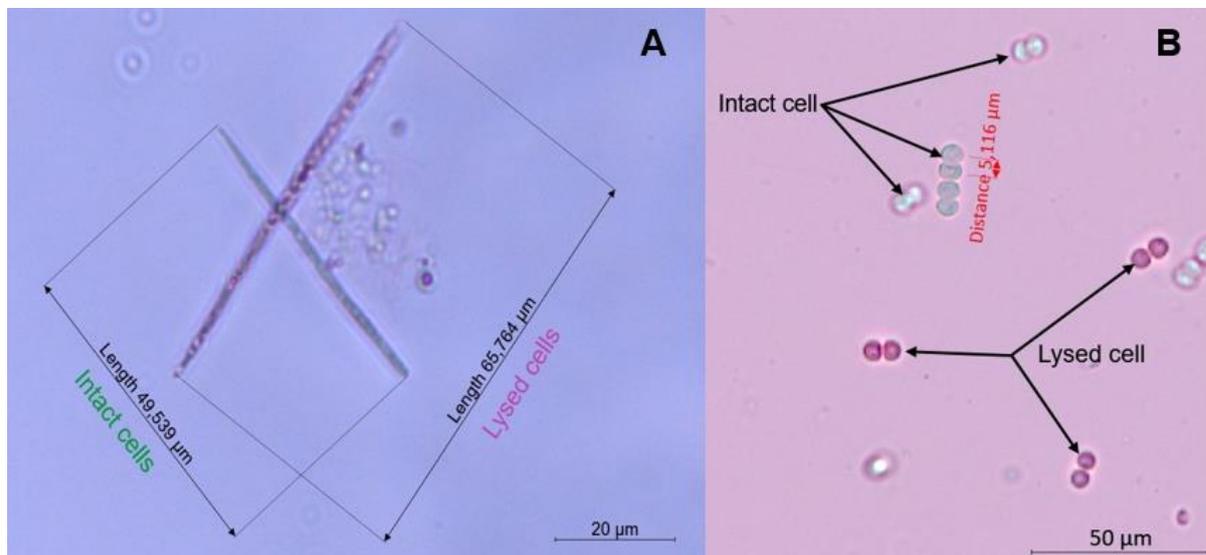
2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Banco de dados

No presente estudo foram utilizados dados provenientes dos experimentos realizados no laboratório SELAQUA (Seção laboratorial de qualidade de Água) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Nesse banco de dados encontram-se os resultados dos

testes de integridade celular (utilizando eritrosina B) das cianobactérias *C. raciborskii* e *D. circinale* submetidas a experimentos de pré-oxidação e agitação rápida e lenta (Figura 1).

Figura 1 - Tricoma de *C. raciborskii* (A) e as células dos tricomas de *D. circinale* (B) intactos (coloração normal) e com a integridade comprometida (coloração rosa característica) na presença da eritrosina b



Fonte: Autor (2019)

Os experimentos simularam em escala de bancada as condições de agitação (gradiente de velocidade) e tempo de mistura normalmente aplicadas em ETAs em larga escala. O objetivo principal dos pesquisadores foi observar os efeitos dos estresses das condições operacionais sobre a integridade de *C. raciborskii* e *D. circinale*, na presença ou não de pré-oxidação utilizando Cl_2 ou KMnO_4 , utilizados para melhorar a etapa de coagulação.

Os pesquisadores definiram quatro parâmetros (covariáveis) para avaliar a integridade celular, são eles: (1) a concentração de oxidante (C_{Ox}) utilizando na pré-oxidação (0, 1, 2, 4 mg/L); (2) a espécie de cianobactéria (*C. raciborskii* e *D. circinale*); (3) o tipo de oxidante utilizado (Cl_2 e KMnO_4) e as condições experimentais (EC_i), que foram subdivididos em 3 níveis:

- EC_0 : Fase inicial do experimento ($t = 0$ s) em que as células não foram expostas a nenhum estresse, ou seja, sem agitação e sem presença de químicos;
- EC_1 : Fase que simula a etapa de coagulação ou mistura rápida. Nessa fase as cepas foram submetidas a um intenso gradiente de velocidade (por volta de 750 s^{-1}) durante um curto intervalo de tempo ($t = 60$ s), tanto na ausência quanto na presença de oxidantes.;
- EC_2 : Fase que simula a etapa de floculação ou mistura lenta. Nessa fase as cepas foram

submetidas a um baixo gradiente de velocidade (aproximadamente 70 s^{-1}) em um elevado de tempo de mistura ($t = 15 \text{ min}$), na presença ou não de oxidantes.

Após cada condição experimental (EC_0 , EC_1 e EC_2), foram avaliados 100 organismos de cada espécie (*C. raciborskii* ou *D. circinale*) em triplicata. Cada organismo foi submetido a diferentes concentrações (0, 1, 2 ou 4 mg/L) de dois oxidantes (Cl_2 ou KMnO_4), totalizando 14.400 resultados de integridade celular [$3(EC_i) \times 300$ (Triplicata) $\times 2$ (Espécies) $\times 4$ (contrações) $\times 2$ (oxidantes)] em 12 experimentos. Os resultados de integridade celular obtidos em cada experimento foram representados pela média da triplicata (Tabela 2). Foram considerados os dados de integridade celular apenas para concentrações de 0 mg/L (Tabela 2).

Tabela 2 – Dados de integridade celular de *C. raciborskii* e *D. circinale* provenientes do banco de dados disponibilizado por SELAQUA . (C_{ox}) representa a concentração de oxidante e (EC_i) representa as condições experimentais avaliadas.

C_{Ox} [mg/L]	Espécie	Oxidante	EC_i (Tempo)	Média de células	
				Íntegras	Não íntegras
0 mg/L	<i>C. raciborskii</i>	Cl_2	EC_0 (0 s)	100	0
			EC_1 (60 s)	99	1
			EC_2 (15 min)	98	2
		KMnO_4	EC_0 (0 s)	100	0
			EC_1 (60 s)	100	0
			EC_2 (15 min)	100	0
	<i>D. circinale</i>	Cl_2	EC_0 (0 s)	71	29
			EC_1 (60 s)	54	46
			EC_2 (15 min)	53	47
		KMnO_4	EC_0 (0 s)	85	15
			EC_1 (60 s)	55	45
			EC_2 (15 min)	62	38

Fonte: Adaptado de (SELAQUA, 2018).

Dessa forma, os efeitos da pré-oxidação não foram avaliados sendo apenas investigado a ação dos estresses hidráulicos do gradiente de velocidade e do tempo de mistura sobre a integridade celular de *C. raciborskii* e *D. circinale* nas duas abordagens apresentadas,

ou seja, abordagem tradicional e abordagem multivariada. Vale ressaltar que o fato de se utilizar apenas os registros do banco de dados referentes aos efeitos dos estresses hidráulicos não limita a utilização dessas abordagens apenas esses fins, é plenamente factível a utilização de todos os dados em uma análise mais generalizada com essas técnicas.

2.2.2 Abordagem tradicional: teste exato de Fisher e o odds ratio calculado

Os valores de integridade celular foram considerados variáveis categóricas dicotômicas (organismos íntegros ou não). De posse da média das triplicatas dos resultados de integridade celular da Tabela 2 foram elaboradas tabelas 2 x 2, denominadas tabelas de contingências. Nessas tabelas foram dispostos os valores de integridade nas colunas (organismos íntegros na coluna “Sim” e os organismos com estrutura comprometidas na coluna “Não”) e nas linhas, duas condições experimentais de um dado cenário de comparação. Foram considerados três cenários de comparação:

1. $EC_1 \times EC_0$: verificação dos efeitos da mistura rápida na integridade celular em relação às condições iniciais;
2. $EC_2 \times EC_0$: verificação dos efeitos combinados das misturas rápida e lenta na integridade celular em relação às condições iniciais;
3. $EC_2 \times EC_1$: verificação dos efeitos da mistura lenta em relação à mistura rápida.

Por meio das tabelas de contingência, as hipóteses de associação entre integridade celular (efeito) e as condições experimentais EC_1 e EC_2 foram testadas nesses três cenários de comparação.

Como algumas células das tabelas de contingência obtidas tiveram frequências inferiores a 5, não foi possível realizar o teste Qui-quadrado de Pearson em todas as comparações. Também se optou por considerar os eventos independentes, fato que inviabilizou o teste McNemar. Dessa forma, foi utilizado o teste exato de Fisher para a comprovação da hipótese de associação ou independência entre as causas e o efeito (AGRESTI, 2012)

Utilizando um nível de significância de 5%, associações significativas são evidenciadas quando o teste exato de Fisher apresenta $p < 0.05$. Em seguida, calculou-se o nível de associação entre causa e efeito através da razão de chances e da razão de chances relativa, OR_{rel} , definida de acordo com as Equações

(1) e (2), respectivamente:

$$OR_{CE_i} = \frac{P(EC_i)}{1 - P(EC_i)} \quad (1)$$

$$OR_{rel} = \frac{OR_{EC_i}}{OR_{C_i}} \quad (2)$$

Em que $P(EC_i)$ e $1 - P(EC_i)$ na Equação (1) representam, respectivamente, a probabilidade de células íntegras e não íntegras observadas numa dada condição experimental i ($i = 0, 1$ ou 2) e OR_{C_i} representa na Equação (2) a razão de chance de um dada condição experimental inicial (EC_1 ou EC_0 , dependendo do caso). Para cada valor de OR_{rel} obtido, foi determinado um intervalo de confiança $IC(OR)$, utilizado a Equação (3):

$$IC(OR) = \exp \left\{ Ln(OD) \pm z_{\frac{\alpha}{2}} \sqrt{V[Ln(OD)]} \right\} \quad (3)$$

onde $Ln(OD)$ é o logaritmo natural da OR e possui distribuição aproximadamente normal com média $Ln(OD)$ e variância assintótica $V[Ln(OD)]$ e $z_{\alpha/2}$ denota o $100(1-\alpha/2)$ percentil da distribuição normal padrão.

A estimativa de $V[Ln(OD)]$ é dada por:

$$V[Ln(OD)] = \sum_{i,j=1}^2 \left(\frac{1}{n_{ij} + \epsilon} \right) \quad (4)$$

Onde n_{ij} é o termo da célula da linha i e coluna j de uma tabela de contingencia 2×2 e ϵ é um termo de correção para casos em que o valor da célula n_{ij} é zero (PAGANO; GAUVREAU, 2010).

Para os casos em que a Equação (4) foi indefinida em alguma dos limites do $IC(OR)$ devido $n_{ij} = 0$, os dados foram transformados atribuindo-se ao termo de correção ϵ os valores de 0,5 (primeira transformação) e 1 (segunda transformação). Nos demais casos, ou seja, $n_{ij} \neq 0$ considerou-se $\epsilon = 0$.

Dessa forma, foi possível afirmar com 95% de confiança que as chances de células íntegras aumentaram ou reduziram nas condições experimentais EC_1 e EC_2 em relação às condições iniciais EC_0 , por meio dos valores de OR_{rel} e seus respectivos intervalos de confiança (IC). O nível de confiança adotado foi de 95% [$IC(95\%)$]. Assim, foi considerado que:

- $OR_{rel} > 1$ e $1 \notin IC(OR_{rel})$: aumento da chance de células íntegras de um cenário em relação a outro;
- $OR_{rel} < 1$ e $1 \notin IC(OR_{rel})$: redução de chances de células íntegras de um cenário em

relação a outro, e;

- $OR_{rel} = 1$ ou $1 \in IC(OR_{rel})$: indicam que as chances são iguais entre os cenários comparados.

Por fim, todas as análises foram realizadas no programa RStudio.

2.2.3 Abordagem multivariada

O modelo logístico utilizado foi:

$$\ln\left[\frac{\hat{p}(X_i)}{1-\hat{p}(X_i)}\right] = \text{logit}[\hat{p}(X_i)] = \ln[OR_i] = \beta_0 + \sum_{k=1}^p \beta_k * X_k \quad (5)$$

Em que $\hat{P}(X_i)$ e $1-\hat{P}(X_i)$ representam, respectivamente, a probabilidade de células íntegras e não íntegras estimada pelo modelo; $\text{logit}[\hat{p}(X_i)]$ representa a função de ligação equivale à $\ln[OR_i]$; OR_i é a razão de chances estimada e β_0 e β_k são respectivamente o intercepto (termo independente) e os coeficientes das covariáveis X_k . A Equação (5) também foi avaliada com as funções de ligação Probit, Clog-log e Cauchy, com a finalidade de se encontrar o melhor ajuste.

Para o ajuste dos modelos logísticos, foram consideradas como covariáveis categóricas a espécie de cianobactéria (X_{Spec}) e as condições experimentais (X_{ExCd_i}). Sendo a covariável condição experimental politômicas com três níveis (EC_0 , EC_1 e EC_2), foram atribuídas as variáveis fictícias $x_{ExCd_{EC_1}}$ e $x_{ExCd_{EC_2}}$ para sua representação. Dessa forma, as variáveis foram definidas:

$$X_{Spec} = \begin{cases} 0 \Rightarrow D. circinale(\text{referência}) \\ 1 \Rightarrow C. raciborskii \end{cases} \quad (6)$$

$$X_{ExCd}(x_{ExCd_{EC_1}}, x_{ExCd_{EC_2}}) = \begin{cases} (0,0) \Rightarrow EC_0(\text{Referência}) \\ (1,0) \Rightarrow EC_1 \\ (0,1) \Rightarrow EC_2 \end{cases} \quad (7)$$

Para o modelo elaborado, foi obtida uma tabela contendo a análise de *deviance* (ANODEV), em que os efeitos da inclusão de cada covariável (X_{Spec} e X_{ExCd_i}) a partir do

modelo nulo (aquele sem nenhuma das covariáveis) são avaliados por meio dos valores da *deviance*, da *deviance* residual e do critério de informação de Akaike (AIC), utilizando o método *Stepwise*.

Dessa forma, foi possível atestar a significância da inclusão de uma determinada variável ao modelo, utilizando os valores da diferença da *deviance* antes e após a inclusão de tal variável (*deviance* residual).

Dessa forma, foi possível atestar a significância da inclusão de uma determinada variável ao modelo, utilizando os valores da diferença da *deviance* antes e após a inclusão de tal variável (*deviance* residual). Também foi considerado o melhor modelo aquele que apresentou o menor AIC.

Além da *deviance*, da *deviance* residual e do AIC, forem obtidos os p-valores de cada covariável por meio da estatística qui-quadrado com o número de graus de liberdade igual ao número de coeficientes associados às variáveis do modelo. Quando $p\text{-valor} > 0.05$, considerou-se que a inclusão da covariável não foi estatisticamente significativa.

Para assegurar a qualidade do ajuste do modelo proposto, os resíduos gerados foram testados, verificando se atenderam simultaneamente as seguintes preposições:

1. Análise gráfica dos resíduos de Pearson e da *deviance*: resíduos aleatoriamente distribuídos não excedendo valores $\pm 3,0$ atestam modelo ajustado (GIOLO, 2017);
2. Gráfico de envelope simulado: resíduos da *deviance* contidos dentro do envelope simulado indicam modelo satisfatório;
3. Estatística qui-quadrado da razão de verossimilhança (Q_L) e a Estatística qui-quadrado de Pearson (Q_P): em que $p\text{-valor} > 0,05$ indicaram modelo ajustado.

A partir dos modelos ajustados foram estimados os OR e seus respectivos intervalos de confiança (IC), utilizando a Equação (8). A interpretação dos valores de OR e dos IC bem como os níveis de confiança adotados são similares ao item anterior. Todas as análises foram realizadas no programa RStudio.

$$IC(O\hat{R}_i) = \exp[\ln O\hat{R}_i \pm 1,96 * EP(O\hat{R})] \quad (8)$$

Em que:

$EP(O\hat{R})$ = erro padrão associado aos $O\hat{R}$ calculado;

$IC(O\hat{R})$ = intervalo de confiança (estimado a 95%);

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Abordagem tradicional

Os resultados de integridade celular da foram Tabela 2 sumarizados em quatro sistemas: S_1 , S_2 , S_3 e S_4 . Em cada um desses sistemas foi realizado o teste exato de Fisher. Para simplificar a apresentação, na Tabela 3 os valores de integridade celular dos organismos que sofreram lise celular (coluna “média de células” em “não íntegros” da Tabela 2) foram suprimidos. Os resultados apontam que a *C. raciborskii* e a *D. circinale* não são igualmente afetadas pelo estresse mecânico do gradiente de velocidade, devido à diferença do número relativo de organismos íntegros em cada condição experimental.

Tabela 3 - Média das triplicatas dos resultados de integridade celular de *C. raciborskii* e *D. circinale* de cada Sistema (S_i) após cada condições experimental e o valor p do teste exato de Fisher. Em negrito os valores significantes ($p < 0.05$)

Sistema (S_i) (Espécie/Oxidante)	Média de tricomas/Cel. (DP)			Valores de p para os cenário comparados		
	EC ₀	EC ₁	EC ₂	CE ₁	CE ₂	CE ₂
				X	X	X
				CE ₀	CE ₀	CE ₁
S_1 (<i>C. raciborskii</i> /Cl ₂)	100	99	98	1.000	0.497	1.000
S_2 (<i>C. raciborskii</i> /KMnO ₄)	100	100	100	1.000	1.000	1.000
S_3 (<i>D. circinale</i> /Cl ₂)	71	54	53	0.019	0.013	1.000
S_4 (<i>D. circinale</i> /KMnO ₄)	85	55	62	<0.001	<0.001	0.389

Fonte: Autor (2019)

Para *C. raciborskii*, em todas as comparações realizadas não se verificou associação entre as diferentes condições experimentais e a integridade celular em S_1 e S_2 ($p > 0.05$, Tabela 3). Essa ausência de associação indica que a proporção (ou probabilidade) de organismos (íntegros ou não) de *C. raciborskii* no início do experimento (EC_0) não difere significativamente da encontrada após a mistura rápida (EC_1) e nem após a mistura lenta (EC_2).

A partir desses resultados, rechaça-se a hipótese de que a *C. raciborskii* tenha sido afetada pelo estresse hidráulico proporcionado pelos gradientes da mistura rápida e lenta aplicados. Isso sugere que diferenças nas quantidades de organismos (ou das proporções de organismos) íntegros ou não da Tabela 3, como as observada em S_1 , foram ocasionadas pela aleatoriedade do sistema e não pela ação dos fatores avaliados (gradiente de velocidade e tempo de mistura). Portanto, pode-se afirmar que as condições hidráulicas dos gradientes da mistura rápida (durante 60 s) seguido da mistura lenta (durante 14 min, após os 60 s da mistura rápida) não foram associadas a lise nos experimentos realizados com a *C. raciborskii*.

No entanto, quando se analisa a espécie *D. circinale*, existem evidências de associação entre a mistura rápida e lenta e a integridade celular dessa espécie ($p < 0,05$, Tabela 3). Dessa forma, existem indícios suficientes para afirmar que as quantidades (ou proporções) de organismos (íntegros ou não) em EC_1 e EC_2 são significativamente diferentes de EC_0 , tanto em S_3 quanto em S_4 . Analisando o cenário $EC_1 \times EC_0$, pode-se concluir que as condições hidráulicas severas de alto gradiente de velocidade podem ter comprometido as células de *D. circinale*, reduzindo o número de organismos íntegros em EC_1 , observado tanto em S_3 , quanto em S_4 , na comparação com CE_0 , mesmo no curto intervalo de tempo de 60 s. Nesse estudo, isso sugere que as condições de mistura rápida estiveram associadas aos eventos de lise celular de *D. circinale*.

Já no cenário $EC_2 \times EC_0$, onde foram avaliados os efeitos das condições hidráulicas da mistura lenta (após a mistura rápida), notou-se que também há uma redução significativa do número de células íntegras em EC_2 , em relação a EC_0 , tanto em S_3 quanto em S_4 . Todavia, esse cenário de comparação por si só não deixa claro se os efeitos de lise em *D. circinale* ocorrem apenas na mistura rápida ou se a mistura lenta também comprometeu significativamente a integridade das células desse organismo.

Assim, de acordo com o cenário de comparação $EC_2 \times EC_1$ observou-se que os números de células íntegras após EC_2 é muito próximo de EC_1 em S_3 e razoavelmente maior em S_4 (Tabela 3). Curiosamente, em primeira análise, esse fato pode ser erroneamente interpretado de três forma distintas: (1) as cepas estabeleceram a integridade celular após a lise (absurdo!); (2) por serem filamentosas e possuírem uma estrutura característica (Figura 1), os estresses hidráulicos podem ter comprometido uma célula específica do tricoma ocasionando um ponto de lise, que, por sua vez, rompe-se filamentos menores com um maior número de células íntegras e (3) erro de análise dos pesquisadores.

No entanto, em fase do resultado da estatística de Fisher para o cenário EC₂ X EC₁ ($p > 0.05$, Tabela 3), existem indícios suficientes para atribuir essas diferenças nos números de organismos íntegros ou não à casualidade, similar ao que se observou em S₁ para *C. raciborskii*. Portanto, os eventos de lise em *D. circinale* estão associados aos impactos do intenso gradiente da mistura rápida (durante 60 s) e não pela ação prolongado do baixo gradiente de velocidade da mistura lenta.

Estimou-se o nível da associação, ou seja, o quanto as chances de células íntegras aumentaram ou diminuíram através da OR_{rel} e seus respectivos intervalos de confiança. Os valores calculados encontram-se na Tabela 4 e foram representados em percentual devido suas magnitudes.

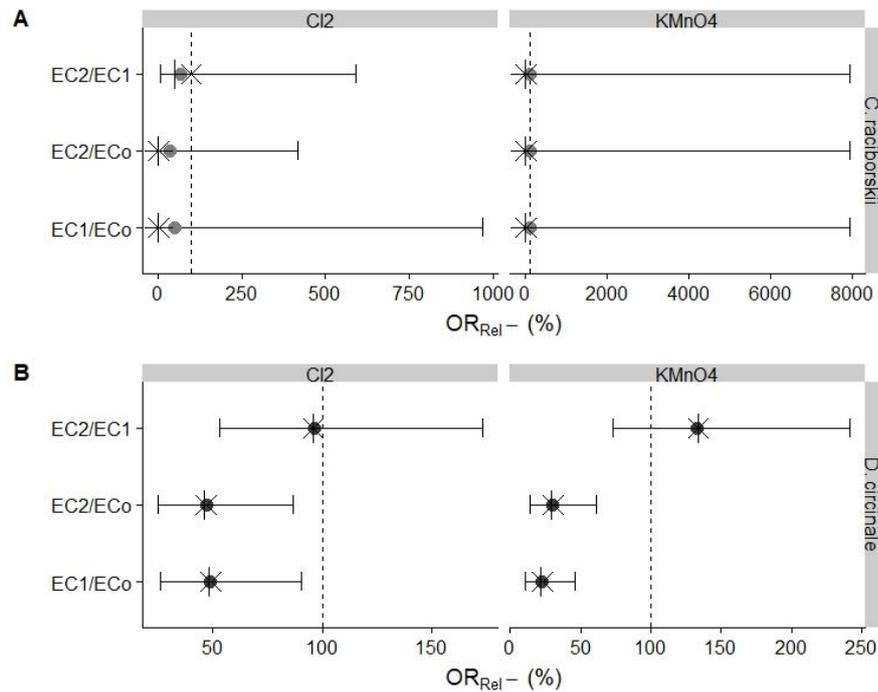
Tabela 4 – Valores de OR_{rel} , limite inferior (L_i) e superior (L_s) dos intervalos de confiança estimado com 95% de certeza [IC(95%)] calculados para os dados sem e com transformação ($\varepsilon=0,5$ e $\varepsilon=1,0$). Os (-) representam indeterminações.

S _i	Exp. Cond.	Dados s/ transformação ($\varepsilon=0$)			Primeira transformação ($\varepsilon=0,5$)			Segunda transformação ($\varepsilon=1,0$)		
		OR_{rel} (%)	IC[95%] (%)		OR_{rel} (%)	IC[95%] (%)		OR_{rel} (%)	IC[95%] (%)	
			L_i	L_s		L_i	L_s		L_i	L_s
S ₁	EC1 x EC0	0.0	0.0	3900.0	0.0	0.0	542.3	49.7	0.8	968.2
	EC2 x EC0	0.0	0.0	531.6	0.0	0.0	531.6	32.8	0.6	416.8
	EC2 x EC1	49.7	0.8	968.4	98.0	6.9	1376.4	66.1	5.4	590.3
S ₂	EC1 x EC0	0.0	0.0	-	0.0	0.0	-	100.0	1.2	7921.0
	EC2 x EC0	0.0	0.0	-	0.0	0.0	-	100.0	1.2	7921.7
	EC2 x EC1	0.0	0.0	-	0.0	0.0	-	100.0	1.3	7921.7
S ₃	EC1 x EC0	48.1	25.6	89.5	49.1	26.2	90.8	48.9	26.2	90.3
	EC2 x EC0	46.2	24.5	85.9	47.1	25.2	86.7	47.1	25.2	86.7
	EC2 x EC1	96.1	53.1	173.9	95.9	53.10	172.9	96.2	53.4	172.9
S ₄	EC1 x EC0	21.7	10.2	44.2	22.8	10.9	45.7	22.8	10.9	45.7
	EC2 x EC0	29.0	13.5	59.5	30.5	14.5	61.9	30.2	14.4	61.1
	EC2 x EC1	133.3	73.1	244.1	133.8	73.6	244.3	132.5	73.1	240.1

Autor (2019)

Analisando OR_{rel} para todos os cenários de comparação em S₁ e S₂ da espécie *C. raciborskii*, observa-se que os intervalos de confiança cruzam a linha pontilhada referente ao valor 100% ($OR_{REL} = 100\% = 1$) na Figura 2A. Portanto, após CE₁ e CE₂, a chance de encontrar células íntegras é igual em comparação à condição inicial CE₀. De forma similar, ao avaliar somente a mistura lenta, as chances de células íntegras em CE₂ são semelhantes às de CE₁.

Figura 2 - Resultados do OR_{rel} e seus respectivos intervalo de confiança a 95% para (A) *D. circinale* e (B) *C. raciborskii*. A reta pontilhada representa o valor 1, a cruz (+) representa OR_{rel} estimado pela primeira transformação, (x) representa pela segunda aproximação e o ponto representa dados não transformados.



Fonte: (Autor, 2019).

Para *D. circinale*, após as condições experimentais CE₁ (mistura rápida) e CE₂ (mistura lenta após rápida), a chance de encontrar células íntegras reduz para mesmos de 50% em comparação à condição inicial CE₀. Assim, em S₃ (experimentos usando *D. circinale* e Cl₂) as chances de células íntegras diminuiram em CE₁ e em CE₂ para apenas 48,9% [IC(95%): 26,23-90,25%] e 47,0% [IC(95%): 25,23-86,72%] das iniciais (CE₀), respectivamente. Já em S₄ (experimentos realizados com KMnO₄ e *D. circinale*) a chance em CE₁ reduziu para 22,8% [IC(95%): 10,93-45,73%] e em CE₂ para 30,2% [IC(95%): 14,41-61,10%] em comparação as condições iniciais de CE₀ (CE₁/CE₀ e CE₂/CE₀ na Figura 2B, respectivamente).

No entanto, ao analisar apenas o efeito da mistura lenta em *D. circinale*, não se pode afirmar que as chances de células íntegras em CE₂ são diferentes das em CE₁, pois o intervalo de confiança cruza a linha pontilhada referente ao valor 100% tanto para os controles dos experimentos S₃ quanto em S₄ (Figura 2B, em CE₂/CE₁).

Os resultados de OR_{rel} obtidos para a etapa de mistura lenta com *D. circinale* (Figura 2B, em CE₂/CE₁) e em todos os cenários de comparação de *C. raciborskii* (Figura 2A) corroboram com os resultados de independência entre causas e efeitos evidenciados pelos valores dos testes exatos de Fisher da Tabela 3. Ressalta-se ainda as transformações realizadas nos dados não alteram a tendência dos valores do OR_{rel} (Figura 2) e ainda permitiram calcular IC para os casos em que alguns dos limites foi indeterminado.

Apesar de serem espécies filamentosas, *C. raciborskii* e *D. circinale* diferem em algumas características morfológicas (GENUÁRIO *et al.*, 2019; KOMÁREK; JOHANSEN, 2015; SANT'ANNA, 2012). Essas diferenças podem justificar os comportamentos diferenciados dessas cepas. Como os tricomas de *D. circinale* apresentavam flexibilidade, a intensa mistura pode ter flexionado os tricomas e a combinação desse efeito com o alto cisalhamento (principalmente durante a mistura rápida) pode ter ocasionado a lise em *D. circinale*, fato evidenciado tanto pelo teste exato de Fisher, que associou integridade as condições experimentais, quanto pelas reduções das chances de células íntegras após a mistura rápida (EC₁) e a mistura lenta (EC₂) apresentado na Figura 2B.

Nas análises de microscopia, os tricomas de *C. raciborskii* não apresentaram tanta flexibilidade quanto os de *D. circinale*. Portanto, as torções e taxas de cisalhamento parece não ter impactado esse organismo de forma significativa, fato evidenciado pelo teste exato de Fisher que constatou independência entre os valores observados de integridade celular dessa espécie e as condições experimentais ensaiadas (Tabela 3) e os valores do OR_{rel} não significantes.

Nesse estudo, tanto os resultados do teste exato de Fisher quanto os OR_{rel} (associados aos seus intervalos de confiança) calculados para *C. raciborskii*, corroboram com algumas observações de outros autores. Por exemplo, H. Li *et al.* (2018) constataram que há um efeito insignificante nas células de *C. raciborskii* sob estresse de agitação mecânica. Pestana *et al.* (2018) analisando cianobactérias filamentosas, observou que *D. circinale* foi mais impactada do que *C. raciborskii* pelos estresses ocasionados em diversas etapas do tratamento de água.

2.3.2 Abordagem multivariada: regressão logística

Diferente da abordagem tradicional, a OR em regressão logística é função dos parâmetros (covariáveis) utilizados para modelar o fenômeno observado. Isso significa que os valores obtidos são ajustados para efeito de todas as variáveis no modelo, fato não observado nas tabelas de contingência 2 x 2. Com isso, duas ressalvas devem ser feitas: (1) deve-se selecionar as variáveis cuidadosamente para evitar resultados enviesados e (2) deve-se levar em conta o contexto geral do modelo (covariáveis e as saídas observadas) para a interpretação dos valores obtidos. Sendo assim, doravante a razão de chances obtida por RL será denominada razão de chances ajustadas e sua representação será \widehat{OR} .

De acordo com a Tabela 2, uma das formas preliminares possível para estruturar o banco de dados para a modelagem (utilizando RStudio) é apresentado na Tabela 5 (BILDER; LOUGHIN, 2015; HOTHORN; EVERITT, 2014). As covariáveis concentração de oxidante (X_{Conc}) e tipo de oxidante (X_{Oxid}) não influenciam no resultado de integridade na abordagem pretendida (análise dos estresses causados apenas pelo gradiente de velocidade durante os tempos de mistura específicos). Esse fato que justifica a desconsideração desses dois parâmetros. Por tanto, na Tabela 6 encontra-se o formato do banco de dados definitivo utilizado nas análises. Ressalta-se que X_{Oxid} e X_{Conc} poderiam ser significativos em outras análises, tais como a apreciação dos efeitos dos estresses químicos causados pela etapa de pré-oxidação.

Tabela 5 - Estrutura preliminar do banco de dados utilizado na modelagem – concentração de oxidante 0 mg.L⁻¹

Espécie cianobactéria (X _{Spec})	Tipo de oxidante (X _{Oxid})	Cond. Exp. (X _{ExCd_i})	Cel. íntegra Y(Sim)	Cel. não íntegra Y(Não)
C. raciborskii	Cl ₂	EC ₀	100	0
C. raciborskii	Cl ₂	EC ₁	99	1
C. raciborskii	Cl ₂	EC ₂	98	2
C. raciborskii	KMnO ₄	EC ₀	100	0
C. raciborskii	KMnO ₄	EC ₁	100	0
C. raciborskii	KMnO ₄	EC ₂	100	0
D. circinale	Cl ₂	EC ₀	71	29
D. circinale	Cl ₂	EC ₁	54	46
D. circinale	Cl ₂	EC ₂	53	47
D. circinale	KMnO ₄	EC ₀	85	15
D. circinale	KMnO ₄	EC ₁	55	45
D. circinale	KMnO ₄	EC ₂	62	38

Fonte: Autor

Analisando os dados da Tabela 6 percebe-se que *C. raciborskii* apresenta pouca variabilidade nos dados em comparação com *D. circinale*. Esses resultados corroboram com H. Li *et al.* (2018) que constataram que há um efeito insignificante nas células de *C. raciborskii* sob estresse de agitação mecânica menores do que 350 rpm, similar ao praticado durante os experimentos deste trabalho (325 rpm). Dessa forma, optou-se por definir *D. circinale* como categoria de referência (quando a Equações(6) for zero) para a covariável X_{Spec} , devido apresentar maior susceptibilidade aos estresses que *C. raciborskii* e para X_{ExCd_i} [quando a Equação (7) for (0,0)], pois esta representa as condições iniciais em $t = 0$ s.

Tabela 6 – Estrutura final do banco de dados. Os asteriscos (*) representam as categorias de referência para da covariável

Espécie cianobactéria (X_{Spec})	Cond. Exp. (X_{ExCd_i})	Cel. íntegra Y(Sim)	Cel. não íntegra Y(Não)
C. raciborskii	EC ₀ *	100	0
C. raciborskii	EC ₁	99	1
C. raciborskii	EC ₂	98	2
C. raciborskii	EC ₀	100	0
C. raciborskii	EC ₁	100	0
C. raciborskii	EC ₂	100	0
D. circinale*	EC ₀	71	29
D. circinale	EC ₁	54	46
D. circinale	EC ₂	53	47
D. circinale	EC ₀	85	15
D. circinale	EC ₁	55	45
D. circinale	EC ₂	62	38

Fonte: Autor

Na Tabela 7 são apresentados os efeitos de X_{Spec} , X_{ExCd_i} e sua interação ($X_{Spec} \cdot X_{ExCd_i}$) com uma sequência de modelos encaixados, a partir do modelo nulo M_1 (definido como aquele que não possui nenhuma variável).). Isso foi feito com o intuito de verificar quais covariáveis produzem redução significativa ($P < 0.05$) dos valores da *deviance* e AIC. Aquelas que produziram tais efeitos integraram o modelo utilizado.

Tabela 7 – Análise da *Deviance* (ANODEV) e AIC obtidas no estudo da integridade celular de *C. raciborskii* e *D. circinale*.

Modelo	Covariável	Deviance	Graus de liberdade residual	Deviance residual	p-valor (Qui-quadrado)	AIC
M ₁	Nulo		11	369,82	-	405,84
M ₂	X_{Spec}	325,93	10	43,89	< 0.001	81,9
M ₃	X_{ExCd}	30,78	8	13,10	< 0.001	55,12
M ₄	$X_{Spec} \cdot X_{ExCd}$	1,45	6	11,66	0,485	57,671

Fonte: Autor (2019)

Dessa forma, o modelo M_2 na Tabela 7 (inserção da variável X_{Spec} ao modelo nulo) apresentou a maior redução significativa da *Deviance*, fato que aponta que a espécie de cianobactéria apresenta a maior relevância para a previsão do grau de associação da integridade celular com as covariáveis. Esse fato está de acordo com as observações de alguns estudos que constataram diferentes alteração na integridade celular de espécies distintas de cianobactérias a

determinados estímulos, tais como pré-oxidação, processos oxidativos avançados, etapas do tratamento de água, dentre outros (BAKHEET *et al.*, 2018; PESTANA *et al.*, 2018; QIAN *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2019). De acordo com Li *et al.* (2018), isso sugere que dependendo de qual das espécies domine o corpo hídrico destinado ao abastecimento, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias apropriadas para o tratamento dessas águas

Essa informação é de extrema valia para nortear a tomada de decisão das companhias de saneamento acerca do cenário de dominância de determinadas espécies em seus reservatórios e definir os valores dos parâmetros operacionais ideais (e.g. gradiente de velocidade e tempo de mistura) nas ETA, tendo em vista que diversos gêneros encontrados nos reservatórios apresentam um elevado potencial de toxicidade como já relatado.

Ainda na Tabela 7, para M_3 a inserção de X_{ExCd_i} ao modelo M_2 acarretou reduções significativas da *Deviance* residual. Isso significa que para os dados analisados, as condições experimentais devem estar associadas aos eventos de lise celular observados nas cepas de *C. raciborskii* e *D. circinale*, similar ao observado por Pestana *et al.* (2018) quando analisaram os efeitos ocasionados pelas etapas de tratamento de em cianobactérias filamentosas.

Para M_4 (Tabela 7) inserção de $X_{Spec} \cdot X_{ExCd}$ (interação das covariáveis X_{Spec} e X_{ExCd}) em M_3 , observa-se um comportamento diferenciado aos demais modelos, pois não se verificou redução significativa da *Deviance* residual ($p > 0,05$). Em M_4 também se constatou um ligeiro aumento do AIC, contrariando as sucessivas reduções até M_3 , nível mais baixo desse critério. Esse fato motivou a desconsideração desse parâmetro no modelo final.

Apesar dos resultados ligeiramente melhores da *deviance* residual e do AIC para as funções de ligação Probit (12,62 e 54,63, respectivamente) e Clog-log (12,36 e 54,37, respectivamente), optou-se pelo Logit, pois esta função de ligação fornece o \widehat{OR} , facilitando a interpretação dos resultados do modelo

Apesar dos resultados ligeiramente melhores da *deviance* residual e do AIC para as funções de ligação Probit (12,62 e 54,63, respectivamente) e Clog-log (12,36 e 54,37, respectivamente), optou-se pelo Logit, pois esta função de ligação fornece o \widehat{OR} , facilitando a interpretação dos resultados do modelo

Portanto, por ter tido a menor deviance residual e AIC, o modelo M_3 , apresentado na Equação (9) foi selecionado para estimar o grau de associação entre as covariáveis e a integridade celular por meio do \widehat{OR} . Ademais, o mesmo também atendeu simultaneamente as condições necessárias para os resíduos de Pearson (Figura 3a), resíduos da Deviance (Figura 3b) e o gráfico de envelope simulado (Figura 3c), além das estatísticas $Q_L = 13,10$ ($p = 0,11$) e

$Q_P = 12,57$ ($P = 0.13$). Os parâmetros do modelo encontram-se na Tabela 8, onde também se pode observar que todos os coeficientes estimados foram significantes ($p < 0,05$), comprovando que os mesmos são estatisticamente diferentes de zero.

$$\ln \left[\frac{\hat{p}(X_i)}{1 - \hat{p}(X_i)} \right] = 1,28 + 4.82 X_{Spec} - 1,10 x_{ExCd_{CE1}} - 0,99 x_{ExCd2} \quad (9)$$

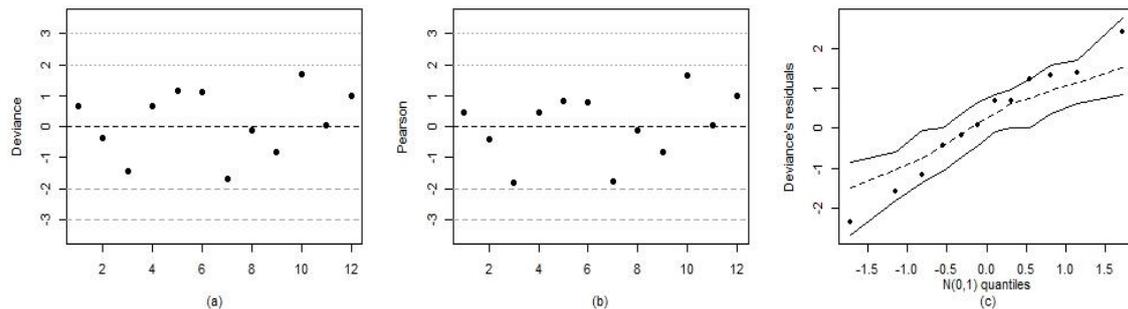
Em que:

$$\ln \left[\frac{\hat{p}(X_i)}{1 - \hat{p}(X_i)} \right] = \text{logit}[\hat{p}(X_i)] = \ln[OR_i] \quad (10)$$

$X_{Spec} = 1$ se espécies de cianobactéria *C. raciborskii* e 0, caso contrário;

$(x_{ExCd_{EC1}}, x_{ExCd_{EC2}}) = (0,0)$ se EC_0 ; $(1,0)$ se EC_1 e $(0,1)$ se EC_2 .

Figura 3 - Análise gráfica dos resíduos do modelo M_3 .



Fonte: O autor (2019)

Tabela 8 - Estimativa dos parâmetros do modelo M_3

Coeficientes	Estimativas	Erro padrão	P-valor
β_0 (Intercepto)	1.28	0.17	<0,0001
β_1	4.82	0.56	<0,0001
β_2	-1.10	0.22	<0,0001
β_3	-0,99	0.22	<0,0001

Fonte: Autor (2019)

Na Equação (9) as chances de células íntegras estimadas por M_3 (\widehat{OR}) são elevadas dependendo da espécie de cianobactéria ($\beta_1 = 4,82$) e reduzidas pela ação das condições experimentais da mistura rápida e lenta ($\beta_2 = -1,10$ e $\beta_3 = -0,99$, respectivamente), sendo o primeiro efeito mais importante do que o último. Verifica-se ainda que os coeficientes estimados corroboram com os resultados obtidos da tabela ANODEV (Tabela 7) enfatizando a maior

relevância da covariável espécie de cianobactéria (X_{Spec}) em relação as condições experimentais (X_{ExCd_i}). Essas constatações podem ser atribuídas ao fato da adoção da espécie *D. circinale* e a condição experimental EC₀ como categorias de referência (Equações (6) e (7), respectivamente).

Portanto, após a descoberta do melhor modelo, foi elaborada uma matriz com 12 linhas (números de linha do banco de dados) e 4 colunas (referente ao número de coeficientes da Tabela 8) com possíveis valores de X_{Spec} e X_{ExCd_i} ($x_{\text{ExCd}_{EC1}}, x_{\text{ExCd}_{EC2}}$) com base no banco de dados (Tabela 6). A primeira coluna da matriz 12 x 4 foi preenchida com 1 pois esta faz referência ao intercepto ou termo independente β_0 . Essa matriz foi multiplicada por outra 4 x 3 contendo nas colunas os coeficientes estimados da Tabela 8, o limite inferior e superior do intervalo de confiança estimado 95% de certeza, respectivamente, conforme Equação (11).

$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 1,28 & 0,95 & 1,62 \\ 4,82 & 3,84 & 6,22 \\ 1,10 & -1,53 & 0,67 \\ 0,99 & -1,42 & 0,56 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \ln[\widehat{\text{OR}}_1] & \ln\widehat{\text{OR}}_1 - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_1) & \ln\widehat{\text{OR}}_1 + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_1) \\ \ln[\widehat{\text{OR}}_2] & \ln\widehat{\text{OR}}_2 - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_2) & \ln\widehat{\text{OR}}_2 + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_2) \\ \ln[\widehat{\text{OR}}_3] & \ln\widehat{\text{OR}}_3 - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_3) & \ln\widehat{\text{OR}}_3 + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_3) \\ \ln[\widehat{\text{OR}}_4] & \ln\widehat{\text{OR}}_4 - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_4) & \ln\widehat{\text{OR}}_4 + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_4) \\ \ln[\widehat{\text{OR}}_5] & \ln\widehat{\text{OR}}_5 - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_5) & \ln\widehat{\text{OR}}_5 + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_5) \\ \ln[\widehat{\text{OR}}_6] & \ln\widehat{\text{OR}}_6 - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_6) & \ln\widehat{\text{OR}}_6 + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_6) \\ \ln[\widehat{\text{OR}}_7] & \ln\widehat{\text{OR}}_7 - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_7) & \ln\widehat{\text{OR}}_7 + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_7) \\ \ln[\widehat{\text{OR}}_8] & \ln\widehat{\text{OR}}_8 - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_8) & \ln\widehat{\text{OR}}_8 + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_8) \\ \ln[\widehat{\text{OR}}_9] & \ln\widehat{\text{OR}}_9 - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_9) & \ln\widehat{\text{OR}}_9 + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_9) \\ \ln[\widehat{\text{OR}}_{10}] & \ln\widehat{\text{OR}}_{10} - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_{10}) & \ln\widehat{\text{OR}}_{10} + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_{10}) \\ \ln[\widehat{\text{OR}}_{11}] & \ln\widehat{\text{OR}}_{11} - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_{11}) & \ln\widehat{\text{OR}}_{11} + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_{11}) \\ \ln[\widehat{\text{OR}}_{12}] & \ln\widehat{\text{OR}}_{12} - 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_{12}) & \ln\widehat{\text{OR}}_{12} + 1,96 * \text{EP}(\widehat{\text{OR}}_{12}) \end{bmatrix} \quad (11)$$

De posse da exponencial dos valores da Equação (11), obtivesse os valores de $\widehat{\text{OR}}$, limite inferior (L_{inf}) e limite superior (L_{sup}) do intervalo de confiança estimado com 95% de certeza do M_3 . Esse valor estão apresentados na Tabela 9.

Nesse estudo de acordo com a Equação (12), em qualquer condição experimental, as chances de organismos íntegros de *C. raciborskii* foram aproximadamente 124 vezes ($\approx \exp[\beta_1]$) a de *D. circinale*. Novamente, isso quer dizer que *C. raciborskii* mostrou-se mais resistente aos efeitos do gradiente de velocidade do que a *D. circinale*, o que provavelmente motivou o baixo número de organismos com a membrana celular comprometida dessa espécie em oposição ao verificado com *D. circinale* (Tabela 9, na coluna Integridade celular). Esse fato está de acordo com as observações de Moisander *et al.* (2002) que demonstraram que *Dolichospermum* sp. são mais suscetíveis ao estresse de cisalhamento do que outros gêneros de cianobactérias, possivelmente devido a sua morfologia, além dos já estudos já mencionados de (LI, H. *et al.*, 2018; PESTANA *et al.*, 2018).

$$\left. \begin{array}{l} \frac{\hat{O}\hat{R}_{C.raciborski|EC_0}}{\hat{O}\hat{R}_{D.circinale|EC_0}} = \frac{\exp[\beta_0 + \beta_1]}{\exp[\beta_0]} \\ \frac{\hat{O}\hat{R}_{C.raciborski|EC_1}}{\hat{O}\hat{R}_{D.circinale|EC_1}} = \frac{\exp[\beta_0 + \beta_1 + \beta_2]}{\exp[\beta_0 + \beta_2]} \\ \frac{\hat{O}\hat{R}_{C.raciborski|EC_2}}{\hat{O}\hat{R}_{D.circinale|EC_2}} = \frac{\exp[\beta_0 + \beta_1 + \beta_3]}{\exp[\beta_0 + \beta_2]} \end{array} \right\} \frac{\hat{O}\hat{R}_{C.raciborski}}{\hat{O}\hat{R}_{D.circinale}} = \exp[\beta_1] \quad (12)$$

Tabela 9 - Valores de $\hat{O}\hat{R}$ e seus respectivos IC a 95%, conforme a Equação (11). Os valores com asteriscos (*) são as categorias de referência que receberam o valor 0 em M3

Espécie cianobactéria (X_{Spec})	Cond. Exp. X_{ExCd_i} ($x_{ExCd_{EC_1}}, x_{ExCd_{EC_2}}$)	Integridade celular (Y)		$\hat{O}\hat{R}$	IC(95%)	
		Sim	Não		Limite Inferior	Limite superior
C. raciborskii	EC ₀ * (0,0)	100	0	442.7	120.7	2542.7
C. raciborskii	EC ₁ (1,0)	99	1	148.6	26.1	1309
C. raciborskii	EC ₂ (0,1)	98	2	164	28.8	1446.6
C. raciborskii	EC ₀ * (0,0)	100	0	442.7	120.7	2542.7
C. raciborskii	EC ₁ (1,0)	100	0	148.6	26.1	1309
C. raciborskii	EC ₂ (0,1)	100	0	164	28.8	1446.6
D. circinale*	EC ₀ * (0,0)	71	29	3.6	2.6	- 5.1
D. circinale*	EC ₁ (1,0)	54	46	1.2	0.6	2.6
D. circinale*	EC ₂ (0,1)	53	47	1.3	0.6	2.9
D. circinale*	EC ₀ * (0,0)	85	15	3.6	2.6	5.1
D. circinale*	EC ₁ (1,0)	55	45	1.2	0.6	2.6
D. circinale*	EC ₂ (0,1)	62	38	1.3	0.6	2.9

Fonte: Auto (2019)

Independente da espécie, pela Equação (13), as chances de células íntegras reduzem em EC₁ e EC₂ para mesmos de 40% ($\approx \exp[\beta_2] \approx \exp[\beta_3]$) das observadas nas condições iniciais EC₀. Esses resultados sugerem que tanto *C. raciborskii* quanto *D. circinale* são impactadas semelhantemente pelas condições experimentais (EC₁ e EC₂), fato que não condiz com os resultados observados de integridade celular da Tabela 9 e nem com as observação sobre de diversos autores acerca da singularidade da resposta de cada espécie de cianobactéria frente a estresses semelhantes (HO *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2019; LI, H. *et al.*, 2018; MOISANDER *et al.*, 2002; PESTANA *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2019).

Para *C. raciborskii*, quando se associa a espécie de cianobactéria às condições experimentais, as chances de célula íntegras também são reduzidas de aproximadamente 443 em EC₀ para 147, em EC₁, e 164, para EC₂, vezes a chance de células lisadas (Tabela 9, na coluna \widehat{OR}). Já para *D. circinale* não existem indícios suficientes para que se possa afirmar que as chances de células íntegras reduziram em comparação a das células lisadas durante as condições EC₁ e EC₂ pois os IC contém o valor 1 (Tabela 9, nas colunas \widehat{OR} e IC(95%). Novamente, esses resultados não condizem com as observações da abordagem tradicional e nem refletem o comportamento normalmente descrito dessas cepas frente aos estresses hidráulicos. Isso pode ser atribuído ao fato do \widehat{OR} ser ajustado a todas as variáveis do modelo, característica particular da regressão logística. Por tanto, comparações específicas para a espécie, como as realizadas pelas tabelas 2 x 2 na abordagem tradicional não devem ser realizadas com o banco de dados da Tabela 6 (AGRESTI, 2012; BILDER; LOUGHIN, 2015; GIOLO, 2017).

$$\left. \begin{array}{l} \frac{\widehat{OR}_{C.raciborski|EC_1}}{\widehat{OR}_{C.raciborski|EC_0}} = \frac{\exp[\beta_0 + \beta_1 + \beta_2]}{\exp[\beta_0 + \beta_1]} \\ \frac{\widehat{OR}_{D.circinale|EC_1}}{\widehat{OR}_{D.circinale|EC_0}} = \frac{\exp[\beta_0 + \beta_3]}{\exp[\beta_0]} \end{array} \right\} \frac{\widehat{OR}_{EC_1}}{\widehat{OR}_{EC_0}} = \exp[\beta_2] \quad (13)$$

$$\left. \begin{array}{l} \frac{\widehat{OR}_{C.raciborski|EC_2}}{\widehat{OR}_{C.raciborski|EC_0}} = \frac{\exp[\beta_0 + \beta_1 + \beta_3]}{\exp[\beta_0 + \beta_1]} \\ \frac{\widehat{OR}_{D.circinale|EC_2}}{\widehat{OR}_{D.circinale|EC_0}} = \frac{\exp[\beta_0 + \beta_3]}{\exp[\beta_0]} \end{array} \right\} \frac{\widehat{OR}_{OR_{EC_2}}}{\widehat{OR}_{OR_{EC_0}}} = \exp[\beta_3]$$

Assim, em M₃ os dados de integridade de *C. raciborskii* são ajustados pelos de *D. circinale* e a recíproca é verdadeira. Dessa forma, necessita-se de cautela para a interpretação

desses obtidos por regressão logística. Dessa para apreciar as características específicas de cada cepa frente aos estresses das condições experimentais, o banco de dados Tabela 6 foi subdividido em duas partes referente ao resultados de integridade celular de *C. raciborskii* (6 primeiras linhas) e *D. circinale* (os registros da 7ª linha em diante).

Para o modelo que utilizou apenas os valores de integridade celular de *C. raciborskii* (M₅), a Tabela 10 evidencia que todos os coeficientes do modelo não foram significativamente ($p > 0,05$). Além disso, não houve grandes redução da *deviance* residual (6,97 no modelo nulo para 4,18) e o AIC aumentou ligeiramente (de 13,55 no modelo nulo para 14,77). Portanto, todas essas informações permitem afirmar que para os experimentos realizados com *C. raciborskii*, não existem evidências que comprovem a associação da integridade dessas cepas com as condições experimentais avaliadas, confirmado o que também foi visto na abordagem tradicional.

Tabela 10 - Estimativa dos parâmetros do modelo M₅ que avaliou os feito das condições experimentais apenas em *C. raciborskii* (categoria de referência adotada foi EC₀)

Coeficientes	Estimativas	Erro padrão	P-valor
β_0 (Intercepto)	24.30	8155.3	0.998
β_2 ($x_{ExCd_{EC1}}$)	-19.01	8155.3	0.998
β_3 ($x_{ExCd_{EC2}}$)	-19.72	8155.3	0.998

Fonte: Autor (2019)

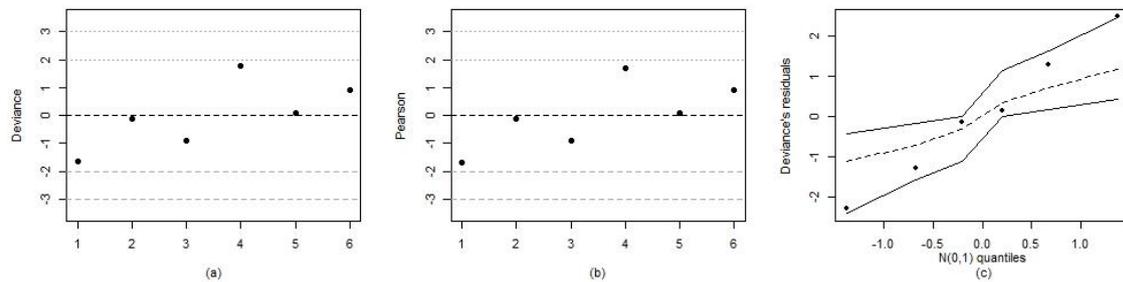
No modelo M₆ foram apreciados apenas os valores de integridade celular de *D. circinale*, obtidos por meio dos valores do banco de dados da Tabela 6. Na Tabela 11 são mostrados os coeficientes de M₆ que foram todos significantes ($p < 0,05$), diferentemente de M₅. Para além disso, observou-se redução da *deviance* residual (36,92 no modelo nulo para 7,47) e do AIC (de 68,35 no modelo nulo para 42,90). Além do mais, as estatísticas QL = 7,74 ($p = 0,06$) e QP = 7,39 ($p = 0,06$) bem como os resíduos de Pearson (Figura 4a), resíduos da *deviance* (Figura 4b) e o gráfico de envelope simulado (Figura 4c) também atenderam simultaneamente as condições necessárias para atestarem a qualidade do modelo M₆.

Tabela 11 - Estimativa dos parâmetros do modelo M_6 que avaliou os feito das condições experimentais apenas em *D. circinale* (categoria de referência adotada foi EC_0)

Coefficientes	Estimativas	Erro padrão	P-valor
β_0 (Intercepto)	1,27	0,17	<0,0001
β_2 ($X_{ExCd_{EC_1}}$)	-1,08	0,22	<0,0001
β_3 ($X_{ExCd_{EC_2}}$)	-0,96	0,22	<0,0001

Fonte: Autor (2019)

Figura 4 - Análise gráfica dos resíduos do modelo M_6 .



Fonte: O autor (2019)

Portanto, de acordo com a Tabela 11, as chances de células íntegras em EC_1 e EC_2 são reduzidas para menos do que 35% ($\approx \exp[\beta_2] \approx \exp[\beta_3]$) das observadas nas condições iniciais EC_0 , similar ao verificado na abordagem tradicional para *D. circinale*. Também de forma análoga, os impactos das mistura lenta (EC_2 em relação a EC_1) não foram significativos, uma vez que a chances estimada na Equação (14) aproximadamente 1.

$$\frac{OR_{D.circinale|EC_2}}{OR_{D.circinale|EC_1}} = \frac{\exp[\beta_0 + \beta_3]}{\exp[\beta_0 + \beta_2]} = \exp[\beta_3 - \beta_2] \approx 1 \quad (14)$$

Portanto, os resultados de M_5 e M_6 seguiram a mesma tendência da abordagem tradicional. Isso significa que esses modelos foram mais apropriados para mensurar o nível de associação entre integridade celular e os estresses hidráulicos das condições experimentais aplicadas de forma individualizada. Salienta-se que os valores desses modelos refletem melhor a realidade pois foram estimados levando-se em consideração o contexto geral dos dados. Isso significa que as diferenças dos resultados de integridade observados em experimentos diferentes (e.g. Cl_2 e $KMnO_4$ na Tabela 5) são sumarizados em uma única resposta, permitindo um apreciação generalizado fenômeno e não uma particular, como na abordagem tradicional.

2.4 Conclusões

Com base no objetivo principal de avaliar metodologias de análise de dados categóricos de integridade/viabilidade celular, evidenciando os principais pontos fortes e fracos, as principais conclusões desse trabalho foram:

- O teste exato de Fisher utilizado na abordagem tradicional mostrou-se uma opção viável para análises de tabelas de contingências 2 x 2 com células menores do que 5. Ademais, através desse teste, é possível confirmar estatisticamente que as diferenças entre os resultados de integridade celular (ou viabilidade ser for o caso) foram ocasionadas pelas condições experimentais ou se foram um mero acaso, o que evita uma interpretação equivocada de algum fenômeno. Todavia, o teste exato de Fisher não mede o nível de associação, fato que exige um procedimento adicional, que é o cálculo do OR e seu IC. Tanto para a realização do teste exato de Fisher quanto para o cálculo do OR e seu respectivo IC as comparações são individualizadas, ou seja, os efeitos particulares de cada indivíduo analisado (e.g. *C. raciborskii* e *D. circinale*) não interferem no resultado dos outros, porém cada experimento pode fornecer um valor diferente para as essas estatísticas o que pode representar um risco em caso de experimentos enviesados.

- Na abordagem multivariada, a interpretação dos dados obtidos com regressão logística deve ser realizada com cautela, pois o contexto geral do modelo (covariáveis e saídas observadas) é utilizado para as estimativas do \widehat{OR} . Esse fato também sugere que as covariáveis que integram o modelo devam ser criteriosamente escolhidas para evitar associação espúrias (similar a exclusão de X_{Conc} e X_{Oxid} do banco de dados preliminar da Tabela 5). Para além disso, a sequência proposta para a análise da qualidade do modelo mostrou-se capaz de identificar modelos bem ajustados (M_3 e M_6) e não ajustado (M_5). Finalmente, \widehat{OR} resumiram melhor o efeito de vários experimentos em comparação com a abordagem tradicional.

- Para os casos em que se deseja comparar espécies com comportamento diferenciado (e.g. *C. raciborskii* e *D. circinale*) expostas às mesmas condições confrontados com os obtidos por modelos individuais de cada espécie (M_5 e M_6) e com os experimentais (e.g. EC_0 , EC_1 e EC_2), os resultados de um modelo geral como M_3 devem ser dados prévios da literatura, afim de que interpretações das respostas obtidas sejam mais assertivas. Caso o pesquisador não tenha informações suficientes a respeito da especificidade de cada espécie, sugere-se a adoção abordagem tradicional, pois resultados alcançados com as técnicas utilizadas nessa abordagem mostraram uma menor possibilidade de interpretações errôneas e descreverem melhor o fenômeno estudado, segundo os relatos de estudos anteriores.

REFERÊNCIAS

- AGRESTI, A. **Categorical Data Analysis**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012. 721 p.
- AUNG, M. T. *et al.* Preterm birth in relation to the bisphenol A replacement, bisphenol S, and other phenols and parabens. **Environmental Research**, [s.l.], v. 169, n. June 2018, p. 131–138, 2019. ISSN: 10960953, DOI: 10.1016/j.envres.2018.10.037
- BAKER, E. B.; SHOWERS, W. J. Hysteresis analysis of nitrate dynamics in the Neuse River, NC. **Science of the Total Environment journal**, [s.l.], v. 652, n. 8, p. 889–899, 2019. ISSN: 0048-9697, DOI: 10.1016/J.SCITOTENV.2018.10.254.
- BAKHEET, B. *et al.* Electrochemical inactivation of *Cylindrospermopsis raciborskii* and removal of the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 344, p. 241–248, 2018. ISSN: 18733336, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.024.
- BILDER, C. R.; LOUGHIN, T. M. **Analysis of categorical data with R**. New York: CRC Press, 2015. 547 p. ISBN: 9781498706766.
- CALOMENI, A. J.; JR, J. H. R. Ecotoxicology and Environmental Safety Evaluation of the utility of six measures for algal (*Microcystis aeruginosa* , *Planktothrix agardhii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) viability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 111, p. 192–198, 2015. ISSN: 0147-6513, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.033.
- CAPDEVILLE, C. *et al.* Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on fauna and vegetation in a mangrove ecosystem. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 129, n. 1, p. 379–391, 2018. ISSN: 18793363, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.02.035.
- CAPELLI, C. *et al.* Biogeography of bloom-forming microcystin producing and non-toxigenic populations of *Dolichospermum lemmermannii* (Cyanobacteria). **Harmful Algae**, [s.l.], v. 67, p. 1–12, 2017. ISSN: 18781470, DOI: 10.1016/j.hal.2017.05.004.
- CEPOI, L. Environmental and Technological Stresses and Their Management in Cyanobacteria. **Cyanobacteria**, [s.l.], p. 217–244, 2019. ISBN: 9780128146675, DOI: 10.1016/B978-0-12-814667-5.00011-8.
- CHEN, J. J.; YEH, H. H.; TSENG, I. C. Effect of ozone and permanganate on algae coagulation removal - Pilot and bench scale tests. **Chemosphere**, [s.l.], v. 74, n. 6, p. 840–846, 2009. ISBN: 0045-6535, ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.10.009.
- CHERNOVA, E. *et al.* *Dolichospermum* and *Aphanizomenon* as neurotoxins producers in some Russian freshwaters. **Toxicon**, [s.l.], v. 130, p. 47–55, 2017. ISSN: 18793150, DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.02.016.

CHISWELL, R. K. *et al.* Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, cylindrospermopsis raciborskii: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. **Environmental Toxicology**, [s.l.], v. 14, n° 1, p. 155–161, 1999. ISBN: 1520-4081, ISSN: 15204081, DOI: 10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<155::AID-TOX20>3.0.CO;2-Z.

CRIDER, Y. *et al.* Can you taste it? Taste detection and acceptability thresholds for chlorine residual in drinking water in Dhaka, Bangladesh. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 613–614, p. 840–846, 2018. ISBN: 00489697 (ISSN), ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.135.

DÍEZ-QUIJADA, L. *et al.* Microcystin-RR: Occurrence, content in water and food and toxicological studies. A review. **Environmental Research**, [s.l.], v. 168, n. April 2018, p. 467–489, 2019. ISSN: 10960953, DOI: 10.1016/j.envres.2018.07.019.

DREHER, T. W. *et al.* Anabaena/Dolichospermum as the source of lethal microcystin levels responsible for a large cattle toxicosis event. **Toxicon**: X, [s.l.], p. 100003, 2018. ISSN: 25901710, DOI: 10.1016/j.toxcx.2018.100003.

DUGAN, N. R.; SMITH, S. J.; SANAN, T. T. Impacts of Potassium Permanganate and Powdered Activated Carbon on Cyanotoxin Release. **Journal - American Water Works Association**, [s.l.], p. 1–12, 2018. ISSN: 0003150X, DOI: 10.1002/awwa.1125.

EGOROV, A. I. *et al.* Application of a salivary immunoassay in a prospective community study of waterborne infections. **Water Research**, [s.l.], v. 142, p. 289–300, 2018. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2018.05.030.

FAN, J. *et al.* The effects of various control and water treatment processes on the membrane integrity and toxin fate of cyanobacteria. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 264, p. 313–322, 2014. ISBN: 03043894 (ISSN), ISSN: 18733336, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.10.059.

_____. Evaluation of potassium ferrate as an alternative disinfectant on cyanobacteria inactivation and associated toxin fate in various waters. **Water Research**, [s.l.], v. 129, p. 199–207, 2018. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2017.11.026.

FISHER, R. A. **Statistical Methods for Research Workers (originally published 1925, 14th ed., 1970)**. Edinburgh: Oliver & Boyd., 1934.

GARCÍA-PÉREZ, J. *et al.* Risk of neuroblastoma and residential proximity to industrial and urban sites: A case-control study. **Environment International**, [s.l.], v. 92–93, p. 269–275, 2016. ISBN: 0160-4120, ISSN: 18736750, DOI: 10.1016/j.envint.2016.04.023.

GENUÁRIO, D. B. *et al.* Cyanobacteria From Brazilian Extreme Environments. **Microbial Diversity in the Genomic Era**, [s.l.], p. 265–284, 2019. ISBN: 9780128148495, DOI: 10.1016/B978-0-12-814849-5.00016-2.

GIOLO, S. R. **Introdução à análise de dados categóricos com aplicações**. São Paulo: Blucher, 2017. 256 p.

HARRISON, M. *et al.* Smart growth and the septic tank: Wastewater treatment and growth management in the Baltimore region. **Land Use Policy**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 483–492, 2012. ISBN: 0264-8377, ISSN: 02648377, DOI: 10.1016/j.landusepol.2011.08.007.

HERBERT, R. A. Methods for Enumerating Microorganisms and Determining Biomass in Natural Environments. **Methods in Microbiology**, [s.l.], v. 22, n. C, p. 1–39, 1990. ISBN: 0-12-521522-3, ISSN: 05809517, DOI: 10.1016/S0580-9517(08)70238-1.

HO, L. *et al.* Fate of cyanobacteria and their metabolites during water treatment sludge management processes. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 424, p. 232–238, 2012. ISBN: 1879-1026 (Electronic)r0048-9697 (Linking), ISSN: 00489697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.02.025.

JAJA-CHIMEDZA, A. *et al.* Identification of teratogenic polymethoxy-1-alkenes from *Cylindrospermopsis raciborskii*, and taxonomically diverse freshwater cyanobacteria and green algae. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 49, p. 156–161, 2015. ISBN: 1568-9883, ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2015.09.010.

JIAN, Z. *et al.* Removal of micropollutants and cyanobacteria from drinking water using KMnO₄ pre-oxidation coupled with bioaugmentation. **Chemosphere**, [s.l.], v. 215, p. 1–7, 2019. ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.013.

JIN, Y. *et al.* Application of N-TiO₂ for visible-light photocatalytic degradation of *Cylindrospermopsis raciborskii* — More difficult than that for photodegradation of *Microcystis aeruginosa*? **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 245, p. 642–650, 2019. ISSN: 02697491, DOI: 10.1016/j.envpol.2018.11.056.

KIM, C. *et al.* Removal of geosmin and 2-methylisoborneol (2-MIB) by membrane system combined with powdered activated carbon (PAC) for drinking water treatment. **Journal of Water Process Engineering**, [s.l.], v. 4, n. C, p. 91–98, 2014. ISSN: 22147144, DOI: 10.1016/j.jwpe.2014.09.006.

KOHLHARDT-FLOEHR, C. *et al.* Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation - Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 101, n. 1, p. 97–102, 2010. ISBN: 1873-2682 (Electronic)r1011-1344 (Linking), ISSN: 10111344, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2010.06.017.

KOMÁREK, J.; JOHANSEN, J. R. Filamentous Cyanobacteria. **Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification**. [s.l.]: [s.n.], 2015. 135-235 p. ISBN: 9780123858771, ISSN: 0029-8549, DOI: 10.1016/B978-0-12-385876-4.00004-9.

KUBÍČKOVÁ, B. *et al.* Effects of cylindrospermopsin on cultured immortalized human airway epithelial cells. **Chemosphere**, [s.l.], 2018. ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.12.157.

LI, D.; LIU, S. Water Quality Early Warnings. **Water Quality Monitoring and Management**. [s.l.]: [s.n.], 2019. p. 199–210. ISBN: 9780128113301, DOI: 10.1016/B978-0-12-811330-1.00006-5.

LI, H. *et al.* Behavior of *Cylindrospermopsis raciborskii* during coagulation and sludge storage – higher potential risk of toxin release than *Microcystis aeruginosa*? **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 347, p. 307–316, 2018. ISSN: 18733336, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.01.009.

LIN, J. L. *et al.* Pretreatment of algae-laden and manganese-containing waters by oxidation-assisted coagulation: Effects of oxidation on algal cell viability and manganese precipitation. **Water Research**, [s.l.], v. 89, p. 261–269, 2016. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2015.11.042.

_____. Algal removal from cyanobacteria-rich waters by preoxidation-assisted coagulation–flotation: Effect of algogenic organic matter release on algal removal and trihalomethane formation. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s.l.], v. 63, p. 147–155, 2018. ISSN: 18787320, DOI: 10.1016/j.jes.2017.02.007.

LIU, B. *et al.* *Microcystis aeruginosa*-laden water treatment using enhanced coagulation by persulfate/Fe(II), ozone and permanganate: Comparison of the simultaneous and successive oxidant dosing strategy. **Water Research**, [s.l.], v. 125, p. 72–80, 2017. ISBN: 1879-2448 (Electronic) 0043-1354 (Linking), ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2017.08.035.

LIU, R. *et al.* Preferential binding between intracellular organic matters and Al13 polymer to enhance coagulation performance. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s.l.], v. 76, p. 1–11, 2018. ISSN: 18787320, DOI: 10.1016/j.jes.2018.05.011.

LÜRLING, M. *et al.* Critical assessment of chitosan as coagulant to remove cyanobacteria. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 66, p. 1–12, 2017. ISSN: 18781470, DOI: 10.1016/j.hal.2017.04.011.

MARKELOVA, A. G; VLADIMIROVA, M.; KUPTSOVA, E. A comparison of cytochemical methods for the rapid evaluation of microalgal viability. **Russian Journal of Plant Phycology**, [s.l.], v. 47, n. 6, p. 815–819, 2000. ISBN: 1021-4437, ISSN: 10214437, DOI: 10.1023/a:1026619514661.

MCNEMAR, Q. Note on the sampling error of the differences between correlated estimators of the odds ratio. **Biometrika**, [s.l.], v. 65, n. 2, p. 191–202, 2002.

MOISANDER, P. H. *et al.* Small-scale shear effects on heterocystous cyanobacteria. **Limnology and Oceanography**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 108–119, 2002. ISBN: 0024-3590, ISSN: 00243590, DOI: 10.4319/lo.2002.47.1.0108.

MUCCI, M. *et al.* Chitosan as coagulant on cyanobacteria in lake restoration management may cause rapid cell lysis. **Water Research**, [s.l.], v. 118, p. 121–130, 2017. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2017.04.020.

NDONG, M. *et al.* Estimating the risk of cyanobacterial occurrence using an index integrating meteorological factors: Application to drinking water production. **Water Research**, [s.l.], v. 56, p. 98–108, 2014. ISBN: 4352642711438, ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2014.02.023.

O'DWYER, J. *et al.* Development of a hierarchical model for predicting microbiological contamination of private groundwater supplies in a geologically heterogeneous region.

Environmental Pollution, [s.l.], v. 237, p. 329–338, 2018. ISSN: 18736424, DOI: 10.1016/j.envpol.2018.02.052.

OLEA-POPELKA, F.; ROSEN, L. E. A Practical Guide for Statistics in Wildlife Studies. **Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy**, v. 9, [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. 21-27 p. DOI: 10.1016/B978-0-323-55228-8.00005-9.

OSBORNE, N. J.; SHAW, G. R.; WEBB, P. M. Health effects of recreational exposure to Moreton Bay, Australia waters during a *Lyngbya majuscula* bloom. **Environment International**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 309–314, 2007. ISBN: 0160-4120, ISSN: 18736750, DOI: 10.1016/j.envint.2006.10.011.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Principios de bioestatística**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 506 p.

PANTELIĆ, D. *et al.* Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. **Chemosphere**, [s.l.], v. 91, n. 4, p. 421–441, 2013. ISBN: 0045-6535, ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.003.

PESTANA, C. J. *et al.* Fate of cyanobacteria in drinking water treatment plant lagoon supernatant and sludge. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 565, p. 1192–1200, 2016. ISBN: 0048-9697, ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.173.

_____. The effect of water treatment unit processes on cyanobacterial trichome integrity. **Science of The Total Environment**, [s.l.], p. 125-139 2018. ISSN: 00489697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.337.

PLACKETT, R. L. Karl Pearson and the Chi-squared Test. **International Statistical Review / Revue Internationale De Statistique**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 59–72, 1983. DOI: 10.2307/1402731.

QIAN, F. *et al.* The effect of pH on the release of metabolites by cyanobacteria in conventional water treatment processes. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 39, p. 253–258, 2014. ISBN: 1568-9883, ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2014.08.006.

RZYMSKI, P. *et al.* Polyphasic toxicological screening of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon gracile* isolated in Poland. **Algal Research**, [s.l.], v. 24, p. 72–80, 2017. ISSN: 22119264, DOI: 10.1016/j.algal.2017.02.011.

SANT'ANNA, C. L. *et al.* Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras. **Instituto de Botânica**, [s.l.], p. 175, 2012. ISBN: 978-85-7523-040-4, DOI: 10.13140/2.1.4417.1208.

SHAFIK, H. M. *et al.* Some special morphological features of *Cylindrospermopsis raciborskii* in batch and continuous cultures. **Hydrobiologia**. [s.l.]: [s.n.], 2003. Disponível em: <[https://link.springer-com.ez11.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1023%2FB%3AHYDR.0000008588.89048.70.pdf](https://link.springer.com.ez11.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1023%2FB%3AHYDR.0000008588.89048.70.pdf)>. Acesso em: 19/out./18.

SHENG, H. *et al.* Analysis on cyanobacteria bloom in Waihai of Lake Dianchi. **Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 0056–0063, 2012. ISBN: 1574-9541, ISSN: 10000933, DOI: 10.5846/stxb201011261680.

SHI, X. *et al.* A comparison of trichloromethane formation from two algae species during two pre-oxidation-coagulation-chlorination processes. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 656, p. 1063–1070, 2019. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.461.

STOMMEL, E. W.; FIELD, N. C.; CALLER, T. A. Aerosolization of cyanobacteria as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. **Medical Hypotheses**, [s.l.], v. 80, n. 2, p. 142–145, 2013. ISBN: 0306-9877, ISSN: 03069877, DOI: 10.1016/j.mehy.2012.11.012.

SUN, F. *et al.* The lysis of *Microcystis aeruginosa* in AlCl₃ coagulation and sedimentation processes. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 193–194, p. 196–202, 2012. ISBN: 1385-8947, ISSN: 13858947, DOI: 10.1016/j.cej.2012.04.043.

TORNEVI, A. *et al.* Efficacy of water treatment processes and endemic gastrointestinal illness - A multi-city study in Sweden. **Water Research**, [s.l.], v. 102, p. 263–270, 2016. ISBN: 0043-1354, ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2016.06.018.

TSAI, K. P. Effects of two copper compounds on *Microcystis aeruginosa* cell density, membrane integrity, and microcystin release. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 120, p. 428–435, 2015. ISBN: 9780717143931, ISSN: 10902414, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.06.024.

WILLIS, A. *et al.* Intraspecific variation in growth, morphology and toxin quotas for the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Toxicon**, [s.l.], v. 119, p. 307–310, 2016. ISBN: 1879-3150 (Electronic)0041-0101 (Linking), ISSN: 18793150, DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.07.005.

WORRALL, F.; GIBSON, H. S.; BURT, T. P. Production vs. solubility in controlling runoff of DOC from peat soils - The use of an event analysis. **Journal of Hydrology**, [s.l.], v. 358, n. 1–2, p. 84–95, 2008. ISBN: 0022-1694, ISSN: 00221694, DOI: 10.1016/j.jhydrol.2008.05.037.

XIE, P. *et al.* A mini review of preoxidation to improve coagulation. *Chemosphere*, [s.l.], v. 155, p. 550–563, 2016. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.003.

YATES, F. Contingency Tables Involving Small Numbers and the χ^2 Test. **Journal of the Royal Statistical Society**, [s.l.], v. 93, n. 1, p. 217–235, 1934.

ZAMYADI, A.; HO, L. *et al.* Fate of toxic cyanobacterial cells and disinfection by-products formation after chlorination. **Water Research**, [s.l.], v. 46, n. 5, p. 1524–1535, 2012. ISBN: 5143404711, ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2011.06.029.

ZAMYADI, A.; MACLEOD, S. L. *et al.* Toxic cyanobacterial breakthrough and accumulation in a drinking water plant: A monitoring and treatment challenge. **Water Research**, [s.l.], v. 46, n. 5, p. 1511–1523, 2012. ISBN: 1879-2448 (Electronic)r0043-1354 (Linking), ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2011.11.012.

ZAMYADI, A. *et al.* Fate of geosmin and 2-methylisoborneol in full-scale water treatment plants. **Water Research**, [s.l.], v. 83, p. 171–183, 2015. ISBN: 1879-2448 (Electronic) 0043-1354 (Linking), ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2015.06.038.

ZHENG, H. *et al.* Cultivation of *Chlorella vulgaris* in manure-free piggery wastewater with high-strength ammonium for nutrients removal and biomass production: Effect of ammonium concentration, carbon/nitrogen ratio and pH. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 273, n. November 2018, p. 203–211, 2019. ISSN: 18732976, DOI: 10.1016/j.biortech.2018.11.019.

3 EFEITOS DAS CONDIÇÕES HIDRÁULICAS DA COAGULAÇÃO-FLOCULAÇÃO EM *Dolichospermum circinale* E *Cylindrospermopsis raciborskii* NA PRESENÇA OU NÃO DE PRÉ-OXIDAÇÃO COM KMnO_4 E Cl_2 : AS RECOMENDAÇÕES DAS NORMAS TÉCNICAS INTERNACIONAIS AUMENTAM AS CHANCE DE LISE?

HYDRAULIC CONDITIONS' EFFECTS OF COAGULATION-FLOCCULATION ON DOLICHOSPERMUM CIRCINALE AND CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII WITH OR WITHOUT PREEOXIDATION USING KMnO_4 AND Cl_2 : DOES THE INTERNATIONAL STANDARDS TECHNIQUES INCREASE THE ODDS OF LYSE?

Allan Clemente de Souza*

RESUMO

Estudos evidenciaram que cianobactérias podem liberar toxinas durante as etapas de tratamento de água, tais como coagulação e floculação, ou na presença de certas concentrações de cloro (Cl_2) ou permanganato de potássio (KMnO_4), oxidantes comumente encontrados na etapa pré-oxidação, principalmente devido a lise celular. Atualmente, tem-se pouca informação dos possíveis efeitos deletérios dessas etapas em espécies filamentosas como *Dolichospermum circinale* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, encontradas em diversos corpos d'água no mundo e potencialmente produtoras de toxinas ou metabólitos secundários. Portanto, o presente estudo avaliou, na presença e ausência de pré-oxidação, os impactos causados pela coagulação e floculação em *D. circinale* e de *C. raciborskii*. Para tal, foram realizados experimentos, em escala de bancada, que simularam os efeitos mecânico das etapas de coagulação (mistura rápida) e floculação (mistura lenta), na presença ou não dos oxidantes Cl_2 ou KMnO_4 e utilizando às recomendações de gradiente de velocidade e tempo de mistura sugerido por normas técnicas internacionais. Métodos estatísticos foram utilizados para verificar e quantificar a associação entre lise celular e as condições experimentais ensaiadas. Dentre os resultados encontrados, observou-se que apenas as condições hidráulicas da mistura rápida (gradiente de velocidade de 750 s^{-1} durante 60 s) reduziram as chances de células íntegras de *D. circinale* para menos de 50%

* Universidade Federal do Ceará - UFC, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental - DEHA, Seção Laboratorial de Qualidade de água – SELAQUA | allan.clemente@alu.ufc.br

em comparação com as condições iniciais. Já na presença de 1 mg.L^{-1} de qualquer um dos dois oxidantes, essas chances caem para menos de 5%. Os resultados evidenciaram que *C. raciborskii* mostrou-se imune aos efeitos das condições hidráulicas da mistura rápida e lenta (gradiente de velocidade de 70 s^{-1} durante 14 min) mesmo na presença de 1 mg.L^{-1} de Cl_2 ou até 4 mg.L^{-1} de KMnO_4 . Contudo, a partir de 2 mg.L^{-1} de Cl_2 , as chances de encontrar células íntegras após a mistura rápida ou lenta reduzem para menos de 6% das condições experimentais iniciais. Os estresses hidráulicos também podem reduzir o comprimento dos tricomas de *D. circinale* tanto na ausência quanto na presença dos oxidantes, fato observado também em *Cylindrospermopsis raciborskii* apenas na presença da etapa de pré-oxidação. Os resultados obtidos apontaram que apenas as condições hidráulicas recomendadas por normas técnicas podem causar lise nas cepas de *D. circinale*, mas não em *C. raciborskii*. Isso enfatiza que tanto projeto quanto operação das estações de tratamento de água devem ser ajustados de acordo com a espécie dominante no manancial, principalmente quando se realiza a etapa de pré-oxidação.

Palavras-chave: Teste exato de Fisher. Odds ratio. Integridade celular. Cianobactérias filamentosas. Estação de tratamento de água. American Water Works Association. American Society of Civil Engineers. Ten State Standards. NBR 12.216/1992

ABSTRACT

Mainly due to cell lysis, studies showed that cyanobacteria might release toxins during water treatment steps such as coagulation and flocculation, or in the presence of certain concentrations of chlorine (Cl_2) or potassium permanganate (KMnO_4), oxidants commonly found in the preoxidation step. Nowadays there is a lack of information about the possible deleterious effects of those steps in filamentous species like *Dolichospermum circinale* and *Cylindrospermopsis raciborskii*, found in different water bodies across the globe and potentially producer of toxin and secondary metabolites. Therefore, the present study evaluated, in the presence, or not, of preoxidation, the impacts caused by coagulation and flocculation in *Dolichospermum circinale* and *Cylindrospermopsis raciborskii*. For this, bench scale experiments were performed to simulate the mechanical effects of the rapid (coagulation) and slow (flocculation) mixing in the presence or absence of the Cl_2 or KMnO_4 and using the velocity gradient and time mixing suggested by international technical standards. Statistical methods were used to verify and quantify the association between cell lysis and the experimental conditions tested. Among the results found, only the hydraulic conditions of the rapid mixing (velocity gradient of 750 s^{-1} for 60 s) were found to reduce the odds of intact *Dolichospermum circinale* cells to less than 50% compared to the initial conditions. In the presence of 1 mg.L^{-1} of either of the two oxidants,

these odds fall to less than 5%. The results showed that *Cylindrospermopsis raciborskii* was immune to the effects of hydraulic conditions of rapid and slow mixing (velocity gradient of 70 s^{-1} for 14 min) even in the presence of $1 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Cl}_2$ or up to 4 mg.L^{-1} of KMnO_4 . However, from 2 mg.L^{-1} of Cl_2 , the odds of finding intact cells after rapid or slow mixing reduce to less than 6% of the initial experimental conditions. The hydraulic parameters (velocity gradient and mixing time) evaluated can also reduce the length of *Dolichospermum circinale* trichomes in both the absence and presence of oxidants, observed as well in *Cylindrospermopsis raciborskii* only in the presence of the preoxidation stage. The results showed that only the hydraulic conditions recommended by technical norms could cause lysis in the strains of *Dolichospermum circinale*, but not in *Cylindrospermopsis raciborskii*. This emphasizes that both project and water treatment plant operation must be adjusted according to the dominant species in the reservoir, especially when the preoxidation step is used.

Keywords: Fisher exact test. Odds ratio. Cell integrity. Filamentous cyanobacteria. Water treatment station. American Water Works Association. American Society of Civil Engineers. Ten State Standards. NBR 12.216 / 1992

3.1 Introdução

A pré-oxidação é uma das etapas auxiliares mais utilizadas nas estações de tratamento de água (ETA). Este processo desperta o interesse dos gestores de sistemas de abastecimento devido a eficácia na melhoria da coagulação, principalmente, em águas oriundas de mananciais eutrofizados ou com elevada carga orgânica dissolvida (RIZZO, 2014). Em linhas gerais, esse processo pode destruir o revestimento orgânico na superfície das partículas em suspensão, chegando a mudar seus respectivos potenciais Zeta. Esse fato é atribuído como o principal responsável pelo aumento da eficiência da etapa de coagulação.

No entanto, como a pré-oxidação degrada a matéria orgânica de alto peso molecular, transformando-a em compostos orgânicos menores, este processo aumenta o risco de formação de precursores dos subprodutos da desinfecção (SPD). Além desse fato, observa-se ainda a possibilidade de danos na membrana celular de algas e cianobactérias, fazendo com que a matéria orgânica intracelular (MOI), contendo metabólitos, seja liberada (CAPELO NETO; NEYCOMBE, 2017; XIE *et al.*, 2016)

Mesmo quando não há ruptura da membrana de cianobactérias, os oxidantes também podem estimular a liberação de toxinas e metabólitos secundários (XIE *et al.*, 2016). Wang *et al.* (2013) observaram que em concentrações até 2 mg.L^{-1} de KMnO_4 , *M. aeruginosa*

foi estimulada a liberar material orgânico extracelular (MOE). Segundo os autores, um aumento da concentração de KMnO_4 até 2 mg.L^{-1} resultou também no aumento da concentração de carbono orgânico dissolvido (usado para quantificar o MOE) não devido à lise, mas ao estímulo exercido pelo oxidante. Adicionalmente, aumentando-se ainda mais a concentração do oxidante (acima de 4 mg.L^{-1}), o material orgânico intracelular (MOI) também é liberado (devido a lise) e este, segundo os autores, é substancialmente mais difícil de ser degradada pelo oxidante do que a MOE.

Assim, os resultados como os de Wang *et al.* (2013) reiteram que o processo de pré-oxidação só é vantajoso quando convenientemente utilizado. Nesse sentido, uma maneira de viabilizar o uso da pré-oxidação é a escolha correta do oxidante e sua dosagem, com base na qualidade da água *in natura*. Diante disso, dentre os oxidantes mais utilizados nessa etapa do tratamento de água, destacam-se o Cl_2 e KMnO_4 (CAPELO NETO; NEYCOMBE, 2017; NACERADSKA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2016).

O cloro é um poderoso oxidante. Contudo, já é bastante conhecido o fato de que o mesmo é capaz de produzir compostos como trihalometanos (THM) e ácidos haloacéticos (AHA), gerando os SPDs potencialmente prejudiciais à saúde (SHI *et al.*, 2019). Isso motiva a busca por oxidantes alternativos para a etapa de pré-oxidação, tais como o KMnO_4 (CAPELO NETO; NEYCOMBE, 2017; XIE *et al.*, 2016).

Além do custo similar ao do Cl_2 , estudos apontam o KMnO_4 como uma opção alternativa promissora ao Cl_2 para etapa de pré-oxidação. Em parte, isso se deve ao fato desse oxidante causar baixo impacto na membrana celular de espécies cianobactérias, como *M. aeruginosa*, em concentrações até 2 mg.L^{-1} (DUGAN; SMITH; SANAN, 2018). Além disso, pode promover melhoria na etapa de coagulação devido a formação de MnO_2 , que pode funcionar como um coagulante formado *in situ*. Ademais, esse oxidante é capaz de contornar problemas com sabor e o odor, remover ferro e manganês, servir como desinfetante e algicida (XIE *et al.*, 2016).

Jian *et al.* (2019) verificaram que a pré-oxidação com KMnO_4 acoplada à bioaugmentação utilizando uma estirpe bacteriana *Pseudomonas* sp. (oxidante KMnO_4) pode representar uma alternativa adequada para o tratamento de água potável contendo micropoluentes (ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfônico), tanto na presença quanto na ausência de células de *M. aeruginosa*. Quando comprado a um tratamento sem pré-oxidação, os resultados de Shi *et al.* (2019) mostraram que a formação de triclorometano (TCM) diminui com o aumento da dosagem de KMnO_4 tanto nas suspensões de *M. aeruginosa* quanto nas de *Cyclotella meneghiniana* após a pré-oxidação com KMnO_4 seguido de coagulação-cloração.

Nas dosagens de 0,5, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de KMnO₄, os autores também observaram que a formação de TCM diminuiu em 0,84%, 25,21% e 37,45%, respectivamente, na suspensão de *M. aeruginosa* e 19,91%, 24,37% e 38,99%, respectivamente, na suspensão de *Cyclotella meneghiniana*. No entanto, apesar do KMnO₄ possui ainda boa estabilidade, facilidade de manuseio e eficácia em uma ampla faixa de pH, estudos descobriram que quando o KMnO₄ oxida cianobactérias ou matéria orgânica na água, microcistinas cancerígenas ou SPD genotípico pode ser gerados (CHANG; BAI; QU, 2016; OU *et al.*, 2012), o que justifica novas pesquisas com esse oxidante na presença de cianobactérias.

Além dos trabalhos apresentados, Bakheet *et al.* (2018); Chen; Yeh; Tseng, (2009); Dzialowski *et al.* (2009); Korth *et al.* (2016); Li *et al.* (2018); Naceradska *et al.* (2017); Wang *et al.* (2013); Xie *et al.* (2016); Zhou *et al.* (2014) também observaram o efeito de diferentes químicos, em variadas concentrações, em diversas espécies de cianobactérias e em condições hidráulicas experimentais distintas. Um resultado em comum encontrado nestas investigações foi que além da dosagem e tipo de oxidante, dois outros fatores influenciam na pré-oxidação: a espécie de cianobactéria (SHI *et al.*, 2019) e as condições de operacionais de tempo de contato/mistura (CT, concentração x tempo) e de gradiente de velocidade.

No que se refere as condições operacionais, dependendo das dosagens na pré-oxidação, a ação do oxidante pode perdurar desde instantes antes da coagulação (fase conhecida de como mistura rápida) até algum tempo depois, chegando, por exemplo, ao final da etapa de floculação (etapa conhecida como mistura lenta). Dessa forma, justifica-se o estudo detalhado de no mínimo dois processos que podem comprometer as células de cianobactérias na pré-oxidação: o efeito do estresse mecânico do elevado gradiente de velocidade (principalmente durante a coagulação) e ação do oxidante em elevados tempos de contato (principalmente na mistura lenta) devido a altas dosagens.

Mesmos não havendo lise ou estimo que promovam a liberação de metabólitos, o rompimento do tricoma de cianobactérias filamentosas como *C. raciborskii* e *D. circinale*, que aumenta a dificuldade de remoção dessas espécies nas unidades de filtração, representa um risco a mais dessas espécies em relação as outras. PESTANA *et al.* (2018) observaram os efeitos dos estresses em diferentes gêneros filamentosos das várias etapas do tratamento em ETA piloto e convencional. Em resumo, os autores apontam que os gêneros de cianobactérias filamentosas *Planktothrix*, *Geitlerinema*, *Dolichospermum* com tricomas maiores (>30 células) são mais susceptíveis aos estresses do tratamento (rompimento do tricoma), dentre eles aqueles causados na pré-oxidação e coagulação, do que os gêneros *Pseudanabaena*, *Planktolyngbya* que apresentaram tricomas menores (<12 células). Além dos estresses físicos, processos oxidativos

avançados também podem reduzir o comprimento dos tricomas de *C. raciborskii*. Jin *et al.* (2019) visualizam a partir de algumas micrografias de autofluorescência de clorofila-a que o comprimento médio do filamento de *C. raciborskii* diminuiu de 300 µm para 100 µm após 12 h de experimento fotocatalítico com N-TiO₂. Os autores atribuíram esse fato ao ataque às células do tricoma pelas espécies oxidantes reativas ($\bullet\text{O}_2^-$ e $\bullet\text{HO}$) que quebram os longos filamentos de *C. raciborskii* em fragmentos curtos. Além disso, Moisander *et al.* (2002) observaram que *Dolichospermum* sp. são mais suscetíveis ao estresse de cisalhamento do que outros gêneros de cianobactérias. Portanto, resultados com estes justificam mais investigações dos efeitos que oxidantes com elevados potenciais redox, tais como KMnO₄ e Cl₂, exercem nos tricomas de cianobactérias filamentosas com *C. raciborskii* e *D. circinale*.

As presenças tanto de *C. raciborskii* quanto de *D. circinale* na água bruta devem ser motivo de preocupação para os gestores das companhias de saneamento no mundo, pois devido a maior sensibilidade aos estresses químicos, em comparação com *Microcystis aeruginosa*, a espécie *C. raciborskii* possui maior risco de liberação de toxina durante a coagulação e o estoque de lodo. *Anabaena circinalis* (atualmente conhecida como *D. circinale*) mostrou-se mais sensível do que *Microcystis aeruginosa*, com base no fato de que essa espécie tende a liberar mais geosmina nas 24 horas após a floculação (LI, H. *et al.*, 2018). Além disso, essas espécies filamentosas são encontradas em diversas partes do mundo (CALANDRINO; PAERL, 2011; CHERNOVA *et al.*, 2017; LI, X.; DREHER; LI, 2016; WILLIS *et al.*, 2018), sendo reconhecidas como produtores de toxinas (BAKHEET *et al.*, 2018; HOFF-RISSETI *et al.*, 2013; LIU, Y. *et al.*, 2014; WILLIS *et al.*, 2016) e no caso de *D. circinale* compostos organoléticos (CHERNOVA *et al.*, 2017; LI, X.; DREHER; LI, 2016).

À luz desses fatores, a necessidade de informações sobre as cianobactérias filamentosas *C. raciborskii* e *D. circinale*, contrasta com a carência de dados sobre as condições operacionais ótimas que devem ser praticadas nas ETA na presença desses organismos na água bruta. Apesar dos resultados apresentados por PESTANA *et al.* (2018) sobre o comportamento de algumas espécies filamentosas (dentre elas *C. raciborskii* e *D. circinale*), diferentemente do que ocorre com *M. aeruginosa*, o comportamento de *C. raciborskii* e *D. circinale* nas condições de mistura e agitação característicos das etapas de coagulação e floculação, na presença ou não de pré-oxidação, não foi ainda estudado a contento. Portanto, frente as inúmeras possibilidades para os parâmetros operacionais passíveis de serem adotados tanto para projetos quanto para operação de ETA, até a presente data, não foram encontrados artigos que verificassem quanto as recomendações para a coagulação e a floculação de normas técnicas internacionais da *American Water Works Association (AWWA)* e *American Society of Civil*

Engineers (ASCE) e *Ten State Standards* e a brasileira NBR 12.216/1992 aumentam as chances de lise ou podem reduzir os tricomas de *C. raciborskii* e *D. circinale*, na presença ou não de pré-oxidantes com KMnO_4 e Cl_2 .

Assim, o objetivo principal desse trabalho é avaliar os efeitos dos parâmetros operacionais recomendados por normas técnicas (internacionais e brasileira) para as etapas de coagulação e floculação em *C. raciborskii* e *D. circinale*, tanto na presença quanto na ausência de pré-oxidação com Cl_2 ou KMnO_4 . Para tanto, foram analisados separadamente os objetivos específicos: (1) verificar os efeitos hidráulicos (gradiente de velocidade e tempo de mistura) na ausência de pré-oxidação sobre os tricomas e células de *C. raciborskii* e *D. circinale*, afim de se avaliar a hipóteses de que existe associação entre eventos de lise ou rompimento do tricomas com as recomendações das normas técnicas para as etapas de mistura rápida (coagulação) e lenta (floculação) e este efeito impacta diferentemente *C. raciborskii* e *D. circinale*; e (2) avaliar os efeitos hidráulicos (gradiente de velocidade e tempo de mistura) na presença de pré-oxidação com KMnO_4 e Cl_2 , com o intuito de testar as hipóteses de que a pré-oxidação potencializa os efeitos de deletérias causas pelas condições hidráulicas recomendadas por normas nos tricomas e células de *C. raciborskii* e *D. circinale* e que os danos causados pelo Cl_2 são mais severos do que os causados por KMnO_4 .

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Diagrama experimental

No presente estudo, foram utilizadas *C. raciborskii* cedida pela professora Sandra Azevedo da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e *D. circinale* disponibilizada pelo laboratório SELAQUA da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os cultivos foram realizados utilizando meio ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964) com pH ajustado para 8, condições não axênicas, porém com contaminação bacteriana imperceptível em uma análise microscópica convencional. As cepas foram mantidas sob intensidade luminosa de aproximadamente $6,75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para luz branca de 470 nm, medida com luxímetro (DIGITAL LUX TESTER YF-1065), temperatura de 24 ± 2 °C, com aeração e período de 12:12 horas (claro/escuro).

Para a obtenção de uma matriz salina similar à do Açude Gavião, principal manancial de abastecimento da região metropolitana de Fortaleza (RMF), foram utilizadas alíquotas de água tratada sem cloro residual obtidas da estação de tratamento de água Gavião, que abastece a RMF. Antes de cada teste, a água possuía as características de turbidez (0,4 UNT,

utilizando o turbidímetro Hach 2100P, EUA) e dureza total (120 mg.L⁻¹ de CaCO₃), bem concentração de cloro residual abaixo do limite de detecção do método titulométrico usando DPD (o que foi considerado como ausência), similar a metodologia realizado por (DUGAN; SMITH; SANAN, 2018). Os métodos de medição de turbidez, dureza total e titulométrico para cloro residual, bem como o grau de pureza exigido para os reagentes utilizados nas análises estava em conformidade com (APHA-AWWA-WEF, 2005).

As culturas de *C. raciborskii* e *D. circinale* foram utilizadas sempre com idade de 21 (\pm 2) dias para posterior diluição a uma concentração dentro do intervalo de 10⁵ a 10⁶ células.mL⁻¹, similar às concentrações de florações observadas em mananciais locais e também utilizadas em trabalhos similares (DUGAN; SMITH; SANAN, 2018; FAN; HO *et al.*, 2013; LIN, J. L. *et al.*, 2018).

A densidade celular das culturas foi medida usando microscópio ótico invertido (ZEISS, Modelo Vert.A1) com uma ampliação de 40 \times e uma câmara Sedgewick Rafter com contagens por faixas ou campos, de acordo com a distribuição de Poisson, obtendo uma distribuição com intervalo de confiança de 95% \pm 20% (APHA-AWWA-WEF, 2005). Para quantificação do número de células por tricoma e determinação do comprimento dos filamentos estudados, foram considerados 30 organismos aleatórios retirados imediatamente após os tempos: 0, 60 e 900 s, referentes aos tempos: inicial, término da mista rápida e termino da mistura lenta (após mista rápida). As medições foram realizadas utilizando microscópio óptico (Olympus Optical do Brasil Ltda, Modelo: Cx-31, Brasil). Os valores de densidade celular foram expressos em células.mL⁻¹ e os de comprimentos em μ m.

As suspensões diluídas foram divididas em quatro jarros de um *Jar test* para simulação da etapa de pré-oxidação durante as misturas rápida e lenta. No início do experimento, no tempo inicial (T = 0 s) Cl₂ ou KMnO₄ era acrescentado em 3 jarros em uma determinada concentração, representando uma triplicata, sendo o quarto jarro mantido sem oxidante e considerado como controle. Esse mesmo experimento foi realizado para as três concentrações diferentes (C₁ = 1 mg.L⁻¹, C₂ = 2 mg.L⁻¹ ou C₃ = 4 mg.L⁻¹), dois oxidantes e para as duas espécies (*C. raciborskii* e *D. circinale*), totalizando 12, conforme a Tabela 12.

Nos instantes 0, 60 e 900 s (condição inicial, final da mistura rápida e da mistura lenta, respectivamente), foram realizadas coletas nos quatro jarros. Como nesses intervalos os tempos de mista, condições de mistura (gradientes de velocidade) e tempos de contato variam, para facilitar as análises e interpretações dos dados, foram adotadas as terminologias: CE₀, CE₁ ou CE₂, em referência as condições experimentais daquele instante. Essas condições foram resumidas na Tabela 13. Assim, após cada condição experimental foram avaliados os

parâmetros físico-químicos, o residual de oxidante e a integridade celular, assim como a determinação do comprimento do tricoma e, quando foi o caso, também os residuais dos oxidantes Cl₂ e KMnO₄ pelo método titulométrico (seção 4-64) e espectrofotométrico (seção 4-163), respectivamente, de acordo com (APHA-AWWA-WEF, 2005). Os resultados foram coletados em triplicata e os resultados expressos pela média e desvio padrão.

Tabela 12 - Relação dos experimentos realizados

Experimento	Concentração (mg.L ⁻¹)	Espécie	Oxidante
E1	1	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂
E2			KMnO ₄
E3		<i>D. circinale</i>	Cl
E4			KMnO ₄
E5	2	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂
E6			KMnO ₄
E7		<i>D. circinale</i>	Cl ₂
E8			KMnO ₄
E9	4	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂
E10			KMnO ₄
E11		<i>D. circinale</i>	Cl ₂
E12			KMnO ₄

Fonte: Autor (2019)

Os parâmetros físico químicos medidos formam: pH (InoLab Multi Lezvel, WTW, Alemanha), UV₂₅₄ e UV₄₅₅ (ambos com espectrofotômetro Genesys, 10 S-UV-VIS, USA). As UV₂₅₄ e UV₄₅₅ foram utilizadas como indicativos da fração da matéria orgânica e cor verdadeira, respectivamente. Os valores de UV₄₅₅ foram convertidos em unidade de cor, UC (1 UC = 1 mg PtCo.L⁻¹), através da Equação (15). Todos os procedimento para medição dos parâmetros físico-químicos, bem como o grau de pureza exigido para os reagentes utilizados nas análises estava em conformidade com (APHA-AWWA-WEF, 2005):

$$UC(UV_{455}) = 3,760.1 * UV_{455} - 133.6 \quad (15)$$

Tabela 13 - Condições experimentais avaliadas. *GR* e *GL* são os gradientes de mistura rápida de lenta, T_{Mix} o tempo de mistura, T_{C} o tempo de contato com o oxidante nas concentrações C_1 , C_2 e C_3 .

Condição Experimental (CE _i)	Gradiente de velocidade	T_{Mix} (s)	T_{C} (s)	Descrição
CE ₁	0	0	0	Início do experimento
CE ₂	GR	60	60	Simulação da mistura rápida
CE ₃	GL	840	900	Simulação da mistura lenta, após a mistura rápida

Fonte: Autor (2019)

Para avaliar os efeitos do gradiente de velocidade nos tempos de mistura específicos da mistura rápida e lenta sobre as células de *C. raciborskii* e *D. circinale* sem a ação do oxidante, os jarros controle dos experimentos realizados com mesma espécie e oxidante foi considerando como uma triplicata. Denominou-se a média dessa triplicata como Sistemas Controle (SC_i). Foram então considerado quatro SC_i, conforme a Tabela 14. Os SC_i também foram utilizados para as comparações com os oxidantes, conforme relatado posteriormente.

Tabela 14 - Definição dos Sistemas Controles (SC_i)

Experimentos de referência	Espécie	Oxidantes	Concentração	Sistema Controle
E1, E5 e E9	CR	Cl ₂	C1, C2 e C3	SC ₁
E2, E6 e E10		KMnO ₄	C1, C2 e C3	SC ₂
E3, E7 e E11	DC	Cl ₂	C1, C2 e C3	SC ₃
E4, E8, E12		KMnO ₄	C1, C2 e C3	SC ₄

Fonte: Autor (2019)

As simulações da etapa de mistura rápida realizadas em *jartest* tiveram gradiente de velocidade dentro da faixa de 700 a 800 s⁻¹ e para a mistura lenta na faixa de 50 a 90 s⁻¹, próximos aos valores mínimos recomendados por normas técnicas internacionais tais como (AWWA e ASCE, 2012) e (Ten State Standards, 2012), segundo Vadasarukkai e Gagnon (2015), e brasileira (ABNT, 1992). O tempo de mistura foi de 1 min, para a mistura rápida, e 840 s (14 mim), para a lenta. Valores também de acordo com as normas citadas.

3.2.2 *Análises estatísticas e integridade celular*

Para confirmar a hipótese de que as condições de mistura foram iguais em todos os 12 experimentos realizados, tomou-se 5 valores de gradiente de velocidade ao longo do tempo de mistura rápida nos instantes: 10, 20, 30, 40, 50 e 60 s. De forma similar, na mistura lenta foram anotados 12 pontos nos instantes de 2 a 15 min, contados a partir do início da mistura rápida.

De posse desses valores de gradiente de velocidade e com a finalidade de comprovar ou não a hipótese de igualdade, realizou-se comparações múltiplas através do teste bicaudal não paramétrico da soma de postos de Wilcoxon para amostras independentes. Cada teste foi ajustado pelo método de Bonferroni. Ao nível de significância de 5%, a hipótese de igualdade das condições de mistura nos experimentos foi aceita quando $P > 0.05$.

A integridade da membrana das células de *D. circinale* e dos tricomas de *C. raciborskii* foi avaliada por meio de um método de coloração celular utilizando a eritrosina B (Dinâmica Química Contemporânea). A eritrosina B ($C_{20}H_6I_4Na_2O_5$) é um corante biológico que pode ser usado para distinguir células íntegras da danificadas (CALOMENI; RODGERS, 2015). Nos organismos com integridade celular preservada, a eritrosina B não adentra a célula, mantendo sua aparência natural mesmo na presença do corante. Já em células com a integridade comprometida, o corante penetra e se acumula no citoplasma produzindo uma cor rosa passível de ser observada por microscopia óptica (Markelova, Vladimirova e Kuptsova, 2000; Calomeni e Rodgers, 2015).

Imediatamente após cada CE_i (Tabela 13) um volume de 1 ml das suspensões de *C. raciborskii* e *D. circinale* foi coletado e transferido para um tubo de ensaio e adicionado 1 ml de uma solução aquosa contendo 5 g de eritrosina B em 100 mL de água destilada. Após rápida homogeneização, a solução resultante foi abrigada da luz por 15 minutos, tempo de ação do corante e posteriormente preparou-se uma lâmina desta solução para exames utilizando microscopia óptica, conforme (MARKELOVA, A. G.; VLADIMIROVA; KUPTSOVA, 2000).

Para aumentar o poder dos testes estatísticos e garantir amostras grandes o suficiente para assumir distribuição qui-quadrado, foram avaliados aleatoriamente 100 organismos em triplicata. Portanto, para cada espécie, avaliou-se 900 organismos referentes a cada condição experimental (Tabela 2), tanto nos 4 SC_i (Tabela 14) quando nos 12 experimentos na presença de pré-oxidação relacionados na Tabela 12, totalizando 14.400 resultados de integridade celular ao longo de todo o estudo.

A integridade celular foi considerada uma variável categóricas dicotômicas (organismos íntegros ou não). Devido as diferenças morfológicas entre *C. raciborskii* e *D. circinale*, para *C. raciborskii* considerou-se como não íntegro os tricomas corados pela eritrosina b (Figura 4A) e para *D. circinale* considerou-se com não íntegras as células coradas (Figura 4B).

De posse da média das triplicatas foram elaboradas tabelas de contingências (2 x 2), onde foram dispostos os valores de integridade nas colunas (organismos íntegros na coluna “Sim” e os organismos com estrutura comprometidas na coluna “Não”) e nas linhas, duas condições experimentais de um dado cenário de comparação. Essas tabelas foram utilizadas para testar hipóteses específicas. Foram considerados três cenários de comparação e suas respectivas hipóteses específicas (Tabela 15).

Tabela 15 – Cenários de comparação e suas respectivas hipóteses H₁, H₂ e H₃ testadas

	Hipóteses	Cenário de comparação	Descrição	Condição para Aceitação
H ₁	H ₁ : $\pi_1 = \pi_0$ “a proporção* de organismos íntegros ou não após a mistura rápida (π_1) e igual a das condições iniciais (π_2)”	CE ₁ x CE ₀	Verificar os efeitos da mistura rápida na integridade celular em relação às condições iniciais, permitindo saber se as reduções nas quantidades de organismos íntegros nesta etapa foram significativas.	P > 0.05
H ₂	H ₂ : $\pi_2 = \pi_0$ “a proporção* de organismos íntegros ou não após a mistura rápida seguida de lenta (π_2) e igual a das condições iniciais (π_0)”	CE ₂ x CE ₀	verificar os efeitos da mistura lenta combinados aos da mistura rápida na integridade celular em relação às condições iniciais, evidenciando se as diferenças nas quantidades de organismos íntegros foram significativa nessas etapas, não permitindo saber qual fase foi relevante, se apenas mistura rápida ou apenas mistura lenta ou ambas.	
H ₃	H ₂ : $\pi_2 = \pi_1$ “a proporção* de organismos íntegros ou não após a mistura lenta (π_2) e igual após a mistura rápida (π_1)”	CE ₂ x CE ₁	verificar os efeitos apenas da mistura lenta em relação à mistura rápida, evidenciando se a quantidade de organismos íntegros na após a mistura lenta é significativamente diferente da mistura rápida.	

Fonte: Autor (2019)

(*) proporção ou probabilidade ou quantidade de organismo em 100

Por meio das tabelas de contingência 2 x 2, as hipóteses de associação (H_1 , H_2 e H_3) entre integridade celular (efeito) e as condições experimentais da Tabela 13 na presença ou não dos oxidantes (causas) foram testadas. Como algumas células das tabelas de contingência obtidas tiveram frequências inferiores a 5, não foi possível realizar o teste Qui-quadrado de Pearson, optando-se então pela utilização do teste exato de Fisher para a comprovação da hipótese de associação ou independência entre as causas e o efeito (AGRESTI, 2012; BARNARD G.A., 1945; FISHER, 1934; GIOLO, 2017; MCNEMAR, 2002; OLEA-POPELKA; ROSEN, 2019; PAGANO; GAUVREAU, 2010; PLACKETT, 1983; YATES, 1934)

Dessa forma, ao nível de significância de 5%, foram evidenciadas associações significativas quando o teste exato de Fisher apresentou $p < 0.05$. Em seguida, calculou-se o nível de associação entre causa e efeito através da razão de chances OR_{CE} (*odds ratio*) e da razão de chances relativa, OR_{rel} , definida de acordo com as Equação (16) e Equação (17), respectivamente :

$$OR_{CE_i} = \frac{P(CE_i)}{1 - P(CE_i)} \quad (16)$$

$$OR_{rel} = \frac{OR_{CE_i}}{OR_{C_i}} \quad (17)$$

Em que $P(CE_i)$ e $1 - P(CE_i)$ na Equação (16) representam, respectivamente, a proporção (ou probabilidade) de células íntegras e não íntegras observadas numa dada condição experimental i ($i = 0, 1$ ou 2) e OR_{C_i} representa na Equação (17) a razão de chance de um dada condição experimental inicial (CE_1 ou CE_0 , dependendo do caso).

Para cada valor de OR_{CE_i} ou OR_{rel} obtido, foi determinado um intervalo de confiança $IC(OR)$, utilizado a Equação (18):

$$IC(OR) = \exp \left\{ Ln(OD) \pm z_{\frac{\alpha}{2}} \sqrt{V[Ln(OD)]} \right\} \quad (18)$$

Em que $Ln(OD)$ é o logaritmo natural da OR e possui distribuição aproximadamente normal com média $Ln(OD)$ e variância assintótica $V[Ln(OD)]$ e $z_{\alpha/2}$ denota o 100(1- α /2) percentil da distribuição normal padrão. A estimativa de $V[Ln(OD)]$ é dada por:

$$V[Ln(OD)] = \sum_{i,j=1}^2 \left(\frac{1}{n_{ij} + \epsilon} \right) \quad (19)$$

Em que n_{ij} é o termo da célula da linha i e coluna j de uma tabela de contingência 2×2 e ϵ é um termo de correção para casos em que o valor da célula n_{ij} é zero (PAGANO; GAUVREAU, 2010). Nesses casos, os dados foram transformados atribuindo-se ao termo de correção ϵ os valores de 0,5 (primeira transformação) e 1 (segunda transformação). Nos demais casos, ou seja, $n_{ij} \neq 0$ considerou-se $\epsilon = 0$. O nível de confiança adotado foi de 95% [IC(95%)]. Assim, foi considerado que:

- $OR_{rel} > 1$ e $1 \notin IC(OR_{rel})$: aumento da chance de células íntegras de um cenário em relação a outro;
- $OR_{rel} < 1$ e $1 \notin IC(OR_{rel})$: redução de chances de células íntegras de um cenário em relação a outro.
- $OR_{rel} = 1$ ou $1 \in IC(OR_{rel})$: indicam que as chances são iguais entre os cenários comparados.
- Os valores dos testes exatos de Fisher, OR e intervalos de confiança com e sem transformações dos dados encontram-se no APÊNDICE A

3.3 Resultados

3.3.1 Efeitos dos estresses causados pela mistura rápida e lenta na ausência de pré-oxidação

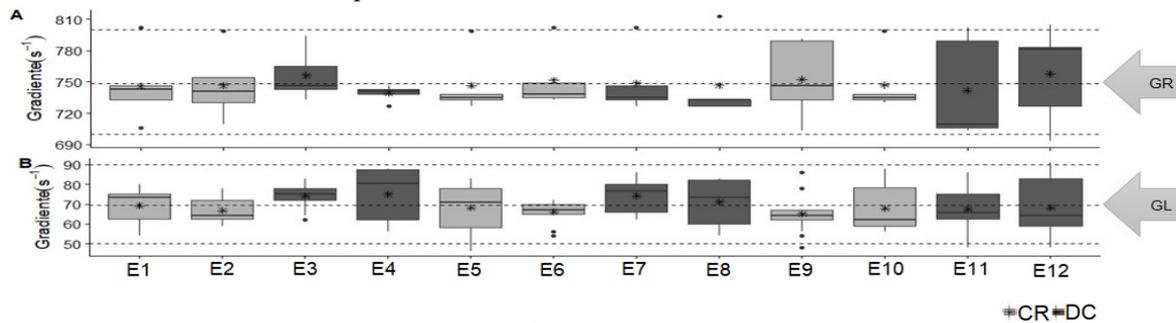
Os objetivos dessa etapa do estudo foram avaliar as hipóteses: (1) as condições hidráulicas praticadas durante a coagulação (mistura rápida) e floculação (mistura lenta) impactam os tricomas e/ou células de *C. raciborskii* e *D. circinale*; (2) condições hidráulicas similares (estresses causados pelo gradiente de velocidade e tempo de mistura) promovem efeitos diferentes em *C. raciborskii* e *D. circinale*.

Nesse contexto, na análise da Figura 5, verifica-se que a média de cada experimento (asteriscos em cada boxplot) não se distanciou significativamente da média geral (indicada pela linha pontilhada e as setas GR e GL) dos 12 experimentos tanto na mistura rápida (Figura 5A) quanto na mistura lenta (Figura 5B). Além disso, segundo a estatística de Wilcoxon, em todos os 12 experimentos as diferenças não foram significativas nem na mistura rápida e nem na mistura lenta ($p > 0,05$, APÊNDICE B).

Assim, os valores médios estimados de *GR* e *GL* foram $748.3 \pm 31.1 \text{ s}^{-1}$ (aproximadamente 750 s^{-1} ou 325 rpm) e $69.4 \pm 10.4 \text{ s}^{-1}$ (aproximadamente 70 s^{-1} ou 70 rpm), o que permite afirmar que os valores estimados de *GR* e *GL* e praticados em todos os experimentos estão alinhados com normas técnicas brasileira NBR 12.216/ 92 (ABNT, 1992) e

internacionais tais como (AWWA e ASCE, 2012) e (Ten State Standards, 2012), segundo (VADASARUKKAI; GAGNON, 2015), no que tange a valores de gradiente de velocidade para esses etapas.

Figura 5 - Gradiente de velocidade médios *GR* e *GL* que definem as condição de mistura rápida (A) e na mistura lenta (B). Os asteriscos representam a média dos valores obtidos em cada experimento. Os pontos representam *outliers*. As três retas horizontais representam os valores extremos e média geral dos 12 experimentos indicada pela seta. O eixo x consta os 12 experimentos avaliados. (CR) e (DC) representam os experimentos realizados com *C. raciborskii* e *D. circinale*, respectivamente

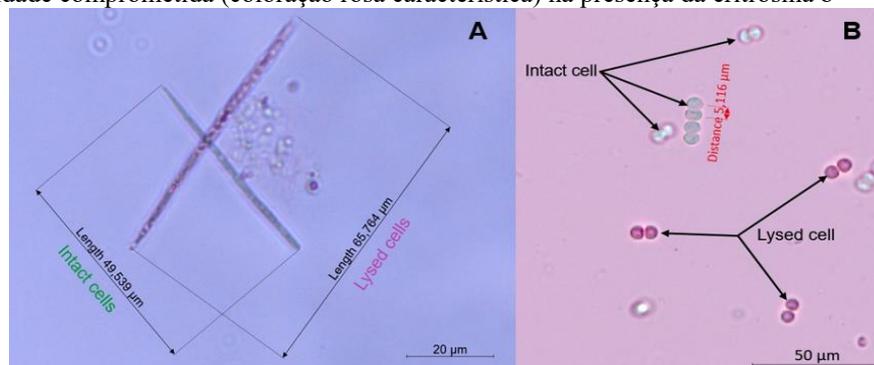


Fonte: Autor (2019)

3.3.1.1 Efeito da mista rápida e lenta sobre a integridade celular

De acordo com Calomeni and Rodgers (2015), a eritrosina B é capaz detectar células comprometidas com precisão, inclusive de cianobactérias filamentosas (*Planktothrix agardhii*). Dessa forma, conforme pode ser visto na Figura através desse método também foi possível identificar células íntegras (coloração normal) ou não (coloração rosa característica) de *C. raciborskii* e *D. circinale*. Portanto, a eritrosina b foi utilizada para todas as análises de integridade celular, tanto nos experimentos realizados na ausência quanto na presença de oxidantes (tema abordado nos próximos itens).

Figura 6 - Tricoma de *C. raciborskii* (A) e as células dos tricomas de *D. circinale* (B) intactos (coloração normal) e com a integridade comprometida (coloração rosa característica) na presença da eritrosina b



Fonte: Autor (2019)

Também de acordo com a na Figura 6, comprovam-se as diferenças entre as morfologias de *C. raciborskii* e *D. circinale* que motivaram a adoção da avaliação da coloração

do tricomas para *C. raciborskii* (Figura 6A) e das células par *D. circinale* (Figura 6B), nas análises de integridade celular.

Com o objetivo de avaliar a ação do gradiente de velocidade na ausência de oxidantes e utilizando a eritrosina b, os resultados de integridade obtidos nos jarros controle e sumarizados em SC_1 , SC_2 , SC_3 e SC_4 são apresentados na Tabela 16. Esses resultados apontam que a *C. raciborskii* e a *D. circinale* não são igualmente afetadas pelo estresse mecânico do gradiente de velocidade, devido a variação dos números de organismos íntegros em cada condição experimental.

Para *C. raciborskii*, em todas as comparações realizadas não se verificou associação entre as diferentes condições experimentais e a integridade celular em SC_1 e SC_2 ($p > 0.05$, Tabela 16). Essa ausência de associação indica que a proporção (ou probabilidade) de organismos (íntegros ou não) de *C. raciborskii* no início do experimento (CE_0) não difere significativamente da encontrada após a mistura rápida (CE_1) e nem após a mistura lenta (CE_2), sugerindo que as diferenças nas quantidades de organismos (íntegros ou não) da Tabela 16, como as observada em SC_1 , foram ocasionadas pela aleatoriedade do sistema e não pela ação dos fatores avaliados (gradiente GR e GL durante seus respectivos tempo de mistura).

Tabela 16 – Média e desvio (DP) padrão das triplicatas dos tricomas de *C. raciborskii* e células de *D. circinale* íntegros de cada SC_i após cada condições experimental que testaram H_1 , H_2 e H_3 com seu respectivo valor p do teste exato de Fisher. Em negrito os valores significantes ($p < 0.05$)

Experimentos cujo os controles originaram as triplicatas (Espécie/Oxidante)	Sistema Controle (SC_i)	Média de tricomas/Cel. (DP)			Cenário comparados		
		CE_0	CE_1	CE_2	CE_1	CE_2	CE_2
					X	X	X
					CE_0	CE_0	CE_1
					Hipótese testadas		
					H_1	H_2	H_3
E1, E5 e E9 (<i>C. raciborskii</i> / Cl_2)	SC_1	100 (0.00)	99 (1.15)	98 (2.00)	1.000	0.497	1.000
E2, E6 e E10 (<i>C. raciborskii</i> /KMnO ₄)	SC_2	100 (0.00)	100 (0.00)	100 (0.00)	1.000	1.000	1.000
E3, E7 e E11 (<i>D. circinale</i> / Cl_2)	SC_3	71 (10.69)	54 (28.99)	53 (16.86)	0.019	0.013	1.000
E4, E8, E12 (<i>D. circinale</i> /KMnO ₄)	SC_4	85 (1.52)	55 (0.70)	62 (25.65)	<0.001	<0.001	0.389

Fonte: Autor (2019)

Assim, as hipóteses H_1 , H_2 e H_3 (Tabela 15) são aceitas, permitido afirmar que as condições hidráulicas dos gradientes GR para a mistura rápida (durante 60 s) seguido de GL para a mistura de lenta (durante 14 min), valores próximos dos limites inferiores de gradiente de velocidade recomendados por normas técnicas, não foram associadas a possíveis eventos de lise nos experimentos realizados com a espécie *C. raciborskii*.

No entanto, quando se analisa a espécie *D. circinale*, existem evidências de associação entre a mistura rápida e lenta e a integridade celular dessa espécie ($p < 0,05$, Tabela 16). Dessa forma, existem indícios suficientes para afirmar que as proporções (ou probabilidades) de organismos (íntegros ou não) em CE_1 e CE_2 são significativamente diferentes de CE_0 , tanto em SC_3 quanto em SC_4 .

Dessa forma, no cenário de comparação $CE_1 \times CE_0$ que testa H_1 , observou-se que as severas condições hidráulicas (GR durante 60 s) podem ter comprometido as células de *D. circinale*, reduzindo o número de organismos íntegros em CE_1 , observado tanto em SC_3 , quanto em SC_4 , na comparação com CE_0 . Isso sugere que as condições de mistura rápida (GR durante 60 s) estão associadas com os eventos de lise de *D. circinale*, motivo pelo qual H_1 é rejeitada.

Já no cenário $CE_2 \times CE_0$ que testa H_2 , onde foram avaliados os efeitos das condições hidráulicas da mistura lenta (GL durante 14 min) após a mistura rápida, notou-se que também há uma redução significativa do número de células íntegras em CE_2 , em relação a CE_0 , tanto em SC_3 quanto em SC_4 , pelo qual rejeita-se também H_2 . A rejeição de H_2 e de H_1 não deixa claro se os efeitos de lise em *D. circinale* ocorrem apenas na mistura rápida ou se a mistura lenta também comprometeu significativamente a integridade das células desse organismo.

Assim, de acordo com o cenário de comparação $CE_2 \times CE_1$ que testa H_3 , observou-se que os números de células íntegras após CE_2 é muito próximo de CE_1 em SC_3 e razoavelmente maior em SC_4 (Tabela 16). Isso implica que mais uma vez eventos aleatórios causaram essas diferenças, não havendo indícios suficientes para se associar as alterações de integridade celular e as condições experimentais ocorridas nesse cenário de comparação, motivo pelo qual aceita-se H_3 ($p > 0.05$, Tabela 16).

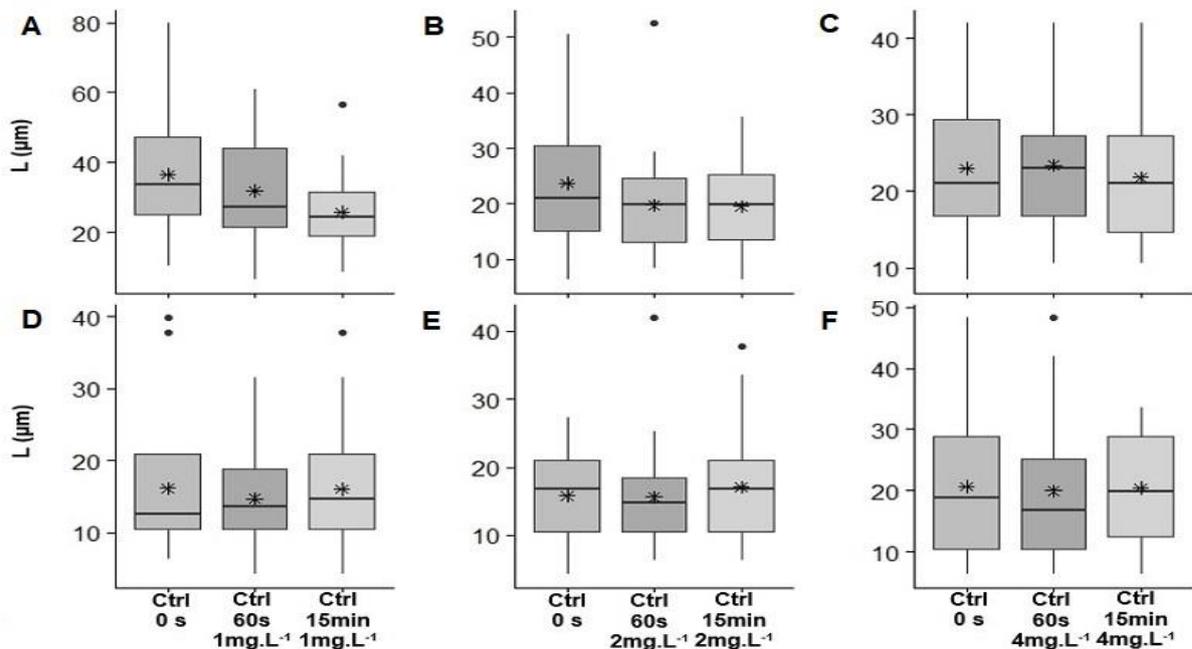
Portanto, rejeita-se H_1 e H_2 devido aos impactos de GR (durante 60 s) e não pela ação de GL (durante 14 min) no cenário $CE_2 \times CE_0$. Assim, é possível afirmar que as condições hidráulicas do gradiente GR para a mistura rápida (durante 60 s) foram associadas aos possíveis eventos de lise em *D. circinale* ocorridos durante essa etapa e na próxima, referente a mistura

lenta, sugerindo que valores de gradiente de velocidade mesmo próximos ao limite inferior das normas técnicas para a mistura rápida acarretaram em eventos de lise dessa espécie, enquanto as recomendações de gradiente para a mistura lenta não.

3.3.1.2 Impacto da mistura rápida e lenta nos tricomas

Outro efeito observado na espécie *D. circinale* foi a redução significativa do comprimento dos tricomas, conforme apresentado na Figura 7. No entanto, esse fato foi observado apenas no experimento (E3) em que os organismos apresentaram tricomas com comprimento médio em torno de 40 μm (10 células/tricoma).

Figura 7 – Efeito da redução do comprimento (L) do tricoma de *D. circinale* devido aos efeitos da mistura rápida (GR durante 60 s) e mistura lenta (GL durante 14 min). Os asteriscos representam as médias e os pontos outliers.

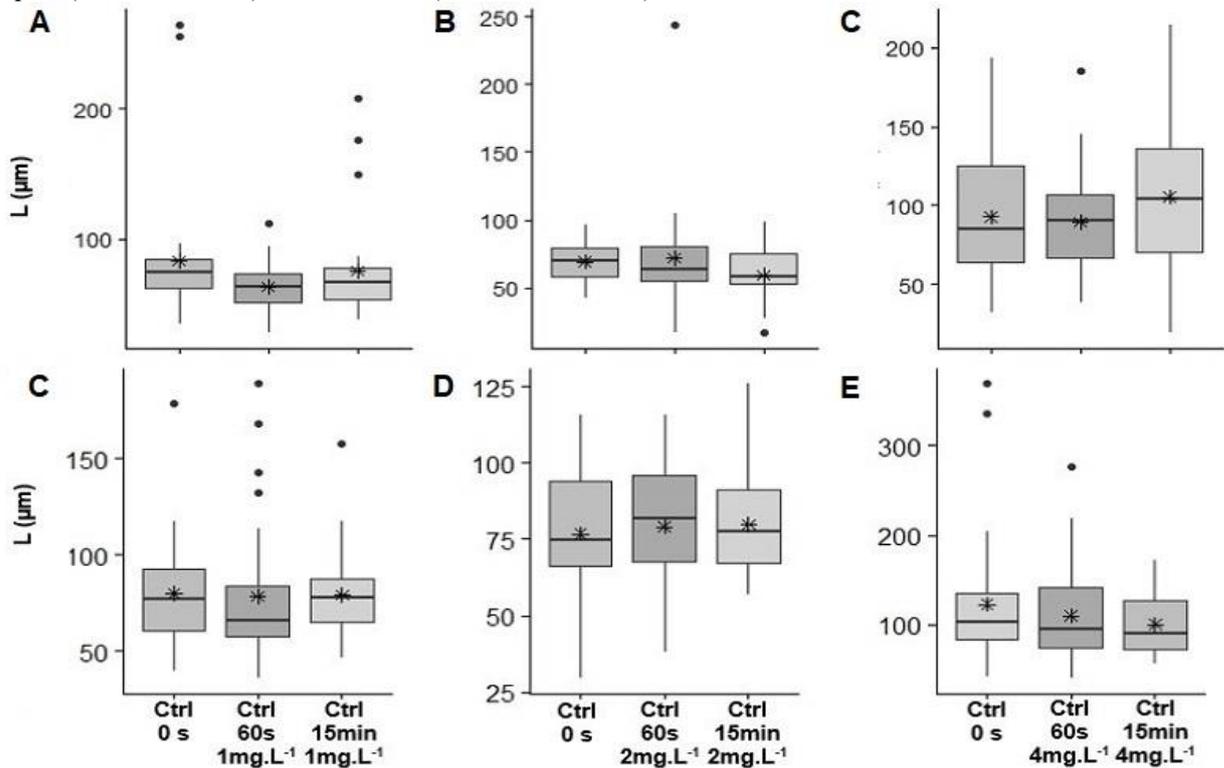


Fonte: Autor (2019)

Apenas na Figura 7A as diferenças entre os comprimentos dos tricomas de *D. circinale* foram significantes ($p < 0,05$), enquanto as demais (Figura 7B, Figura 7C, Figura 7D, Figura 7E e Figura 7F) não ($p > 0,05$, Tabela 17). Isso sugere que organismos maiores foram mais susceptíveis ao efeito da redução do tricoma e que para tamanho médio de até 25 μm (5 células/tricoma) os efeitos dos estresses hidráulicos não foram mais importantes. Ainda conforme a Figura 7A, observou-se que as diferenças entre os comprimentos após a mistura rápida (GR em 60 s) e após a lenta (GL em 14 min) não foram significantes, sugerindo que os efeitos de redução ocorreram logo na mistura rápida.

Essa fato não foi observado em *C. raciborskii* (Figura 8), que não apresentou diferenças significativas entre os tamanhos dos tricomas ($p>0,05$, Tabela 17), tanto nos controles dos experimentos com Cl_2 (Figura 8A, Figura 8B, Figura 8C) quanto nos realizados com KMnO_4 (Figura 8D, Figura 8E, Figura 8F), mesmo essa espécie apresentando, em médias, tricomas maiores do que *D. circinale*.

Figura 8 - Efeito da redução do comprimento (L) do tricoma de *C. raciborskii* devido aos efeitos da mistura rápida (GR durante 60 s) e mistura lenta (GL durante 14 min)



Fonte: Autor (2019).

Assim como ocorrido com a integridade celular, pode-se afirmar que a mistura rápida usando GR durante 60 s afetou significativamente o comprimento do tricoma da *D. circinale*, mas não os de *C. raciborskii*. Adicionalmente, apesar do maior tempo de exposição (14 min), a mistura lenta usado GL não alterou significativamente nenhuma das duas espécies.

Tabela 17 - Teste de Wilcoxon para avaliação de redução significativas do comprimento dos tricomas mediante as condições de mistura rápida e lenta. Em negritos os valores significantes ($p < 0,05$)

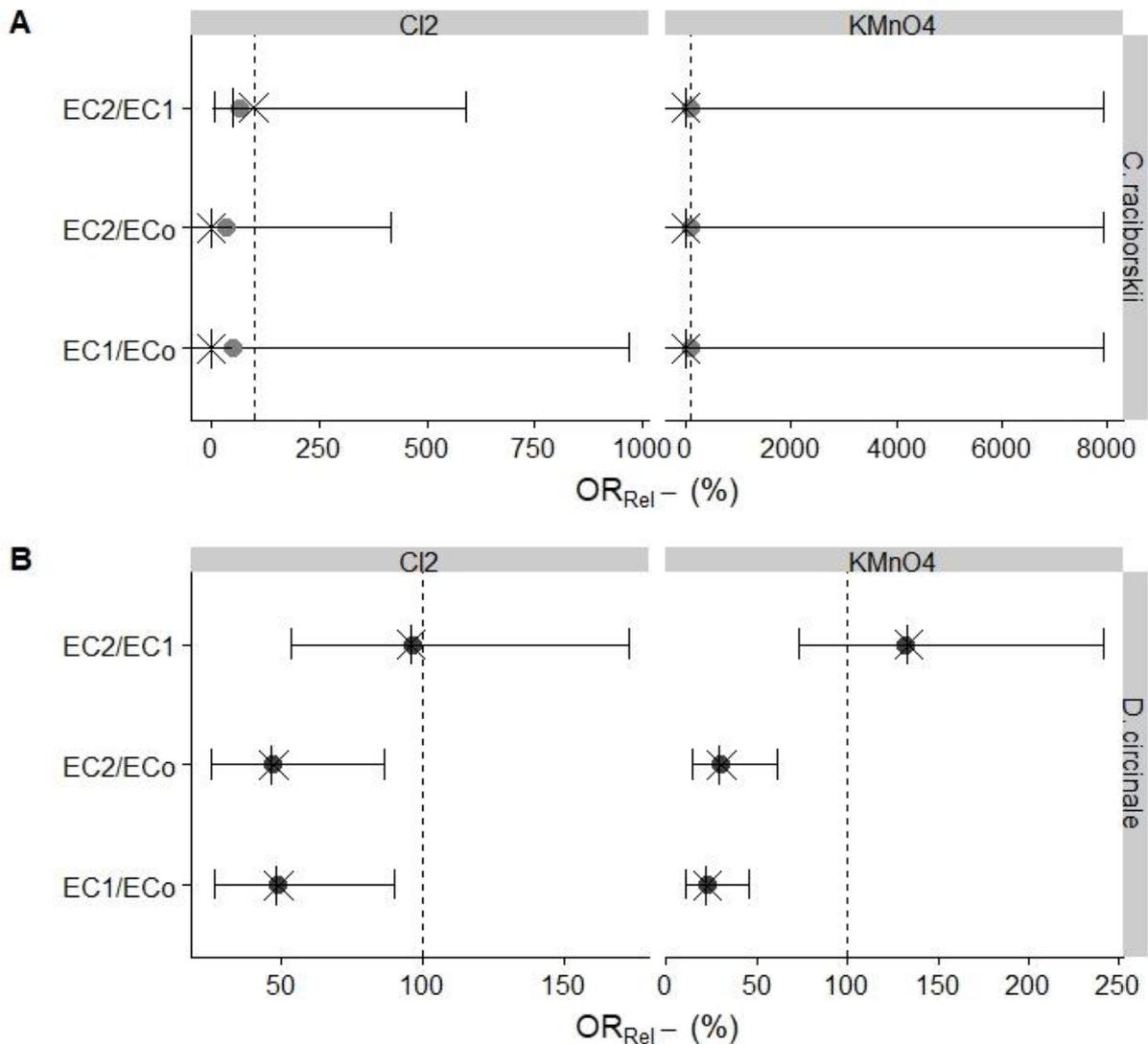
Experimento	Conc. (mg.L ⁻¹)	Espécie	Oxidante	Cenários comparados		
				CE ₁ x CE ₀	CE ₂ x CE ₀	CE ₂ x CE ₁
E1	1	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂	0.066	0.341	0.341
E2			KMnO ₄	0.880	0.555	1.000
E3		<i>D. circinale</i>	Cl ₂	0.829	0.045	0.539
E4			KMnO ₄	1.000	1.000	1.000
E5	2	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂	1.000	0.365	0.112
E6			KMnO ₄	1.000	1.000	1.000
E7		<i>D. circinale</i>	Cl ₂	0.351	0.560	1.000
E8			KMnO ₄	1.000	1.000	1.000
E9	4	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂	1.000	0.783	1.000
E10			KMnO ₄	1.000	1.000	0.684
E11		<i>D. circinale</i>	Cl ₂	1.000	1.000	1.000
E12			KMnO ₄	1.000	1.000	1.000

Fonte: Autor (2019)

3.3.1.3 Medida da associação entre os efeitos hidráulicos na ausência de pré-oxidação

Comprovada a associação com o teste de Fisher (Tabela 16), estimou-se o nível dessa associação, ou seja, o quanto as chances de células íntegras aumentaram ou diminuíram através da OR_{rel} (Figura 9). Analisando OR_{rel} para todos os cenários de comparação da espécie *C. raciborskii*, observa-se que os intervalos de confiança cruzam a linha pontilhada referente ao valor 100% ($OR_{REL} = 100\% = 1$) na Figura 9A. Portanto, após CE₁ e CE₂, a chance de encontrar células íntegras é igual em comparação à condição inicial CE₀. De forma similar, ao avaliar somente a mistura lenta, as chances de células íntegras em CE₂ são semelhantes às de CE₁.

Figura 9 - Resultados do OR_{rel} e seus respectivos intervalo de confiança a 95% para (A) *D. circinale* e (B) *C. raciborskii*. A reta pontilhada representa o valor 1, a cruz (+) representa OR_{rel} estimado pela primeira transformação, (x) representa pela segunda aproximação e o ponto representa dados não transformados.



Fonte: (Autor, 2019).

Para *D. circinale*, após as condições experimentais CE_1 (mistura rápida) e CE_2 (mistura lenta após rápida), a chance de encontrar células íntegras reduz para mesmos de 50% em comparação à condição inicial CE_0 . Assim, em E4, E8, E12 (controle dos experimentos usando *D. circinale* e $KMnO_4$) a chance em CE_1 reduziu para aproximadamente 23% e em CE_2 para 30% em comparação as condições iniciais de CE_0 - APÊNDICE A (CE_1/CE_0 e CE_2/CE_0 na Figura 9, respectivamente). Já em E3, E7 e E11 (controle dos experimentos usando *D. circinale* e Cl_2) as chances de células íntegras diminuíram em CE_1 e em CE_2 para apenas 49% e 47% (APÊNDICE A) das iniciais (CE_0), respectivamente.

No entanto, ao analisar apenas o efeito da mistura lenta em *D. circinale*, não se pode afirmar que as chances de células íntegras em CE_2 são diferentes das em CE_1 , pois o

intervalo de confiança cruza a linha pontilhada referente ao valor 100% tanto para os controles dos experimentos E4, E8 e E12 realizados com KMnO_4 quanto para os controles dos experimentos E3, E7 e E11 que usaram Cl_2 (Figura 9B, em CE_2/CE_1).

Os resultados de OR_{rel} obtidos para a etapa de mistura lenta com *D. circinale* (Figura 9B, em CE_2/CE_1) e em todos os cenários de comparação de *C. raciborskii* (Figura 9A) corroboram com os resultados de independência entre causas e efeitos evidenciados pelos valores dos testes exatos de Fisher da Tabela 16.

3.3.2 Efeitos dos estresses causados pela mistura rápida e lenta na presença da etapa de pré-oxidação

Uma vez avaliados os impactos da ação do estresse hidráulicos, nessa fase do estudo determinou-se como a presença dos oxidantes influenciam o nível de associação entre as condições experimentais e a integridade celular das espécies *C. raciborskii* e *D. circinale*, objetivando testar as hipóteses de que a pré-oxidação potencializa os possíveis danos ocorridos nos tricomas e/ou células desses organismos e que os efeitos deletérios do Cl_2 são ainda mais severos do que os provocados pelo KMnO_4 .

3.3.2.1 Efeito dos estresses causados pela mistura rápida e lenta sobre a integridade celular na presença de pré-oxidação

De acordo com a Tabela 18, diferente do experimento E1 realizado como 1 mg.L^{-1} ($p > 0,05$, Tabela 18), os experimentos E5 e E9 mostram que a integridade *C. raciborskii* quando expostas as condições hidráulicas na presença de Cl_2 , a partir da concentração 2 mg.L^{-1} , foram afetadas em todos os cenários de comparação ($p < 0,05$, Tabela 18). Dessa forma, para esses experimentos rejeitou-se as H_1 , H_2 e H_3 (Tabela 3), o que indica a existência de associação entre integridade celular e as condições experimentais realizadas tanto na rápida quanto na mistura lenta nos ensaios realizados com essa espécie. Esse fato contrasta com o observado nos controles sobre ação exclusiva do gradiente de velocidade e na presença de até 1 mg.L^{-1} desse oxidante.

Tabela 18 – Média e desvio padrão (DP) das triplicatas dos tricomas de *C. raciborskii* e células de *D. circinale* na presença de pré-oxidação após cada condições experimental que testaram H₁, H₂ e H₃ com seu respectivo valor p do teste exato de Fisher. Em negrito os valores significantes (p<0.05)

Experimento	Conc. (mg.L ⁻¹)	Espécie	Oxidante	Nº cel. (DP)			Cenários comparados		
				CE ₀	CE ₁	CE ₂	CE ₁	CE ₂	CE ₂
							x	x	x
							CE ₀	CE ₀	CE ₁
							Hipóteses testadas		
							H ₁	H ₂	H ₃
E1	1	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂	100 (1.00)	98 (0.88)	98 (1.15)	1.000	1.000	1.000
E2			KMnO ₄	100 (0.00)	100 (0.00)	100 (0.00)	1.000	1.000	1.000
E3		<i>D. circinale</i>	Cl ₂	71 (10.69)	9 (1.76)	1 (0.88)	<0.001	<0.001	0.018
E4			KMnO ₄	85 (1,52)	13 (6.55)	24 (7.15)	<0.001	<0.001	0.068
E5	2	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂	100 (1.00)	86 (1.76)	32 (1.20)	<0.001	<0.001	<0.001
E6			KMnO ₄	100 (0.00)	100 (0.33)	100 (0.33)	1.000	1.000	1.000
E7		<i>D. circinale</i>	Cl ₂	71 (10.69)	6 (3.46)	0 (0.00)	<0.001	<0.001	0.018
E8			KMnO ₄	85 (1,52)	20 (11.59)	15 (10.50)	<0.001	<0.001	0.457
E9	4	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂	100 (0.00)	50 (5.86)	22 (2.08)	<0.001	<0.001	<0.001
E10			KMnO ₄	100 (0.00)	97 (0.67)	98 (1.20)	0.245	0.497	1.00
E11		<i>D. circinale</i>	Cl ₂	71 (10.69)	0 (0.00)	0 (0.00)	<0.001	<0.001	1.000
E12			KMnO ₄	85 (1,52)	15 (8.08)	1 (2.30)	<0.001	<0.001	<0.001

Fonte: Autor (2019)

Já em E2, E6 e E10 a aplicação do KMnO₄ nas dosagens 1, 2 e 4 mg.L⁻¹, respectivamente, não afetou significativamente a integridade celular da *C. raciborskii* em nenhuma das condições operacionais testadas (p>0,05, Tabela 18), fato pelo qual se aceitou todas as hipóteses H₁, H₂ e H₃ (Tabela 15). Portanto, verificou-se que o número de células íntegras na condição experimental inicial (CE₀) não é significativamente diferente dos resultados encontrados em CE₁ e CE₂, ou seja, não houveram impactos significativos na integridade celular com a aplicação do KMnO₄ na mistura rápida nem na mistura lenta.

Com a aplicação de Cl₂ nas suspensões contendo *D. circinale* nos experimentos E3, E7 e E11, observou-se também que, em todas as dosagens aplicadas a integridade celular está associada aos cenários de comparação (p>0,05; Tabela 18) o que permitiu rejeitar as hipóteses H₁, H₂ e H₃ (Tabela 15). Isso implica que o número de organismos íntegros em CE₀ é

significativamente diferente de CE₁ e CE₂. Desse modo, pode-se afirmar que houveram impactos significativos na integridade celular na mistura rápida e no decorrer da mistura lenta na presença de KMnO₄ para essa espécie.

Nos experimentos E4 e E8 utilizando a *D. circinale*, com a aplicação do oxidante KMnO₄ nas concentrações 1 e 2 mg.L⁻¹, H₁ e H₂ foram rejeitadas, pois verificou-se evidências de associação entre a integridade celular e condições experimentais nos cenários CE₁ x CE₀ e CE₂ x CE₀, (p<0,05, Tabela 18). Em contrapartida, não houveram indícios de diferenças significativas (p>0,05, Tabela 18) no cenário de comparação CE₂ x CE₁. Assim, pode-se afirmar que os efeitos deletérios ocorreram apenas durante a mistura rápida.

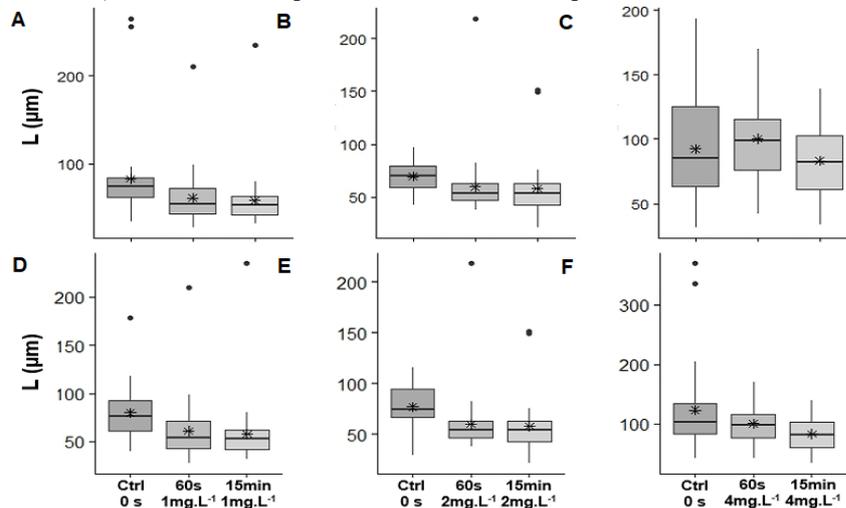
Já no experimento E12, a concentração 4 mg.L⁻¹ de KMnO₄ promoveu diferenças significativas (p<0,05, Tabela 18) entre CE₁, CE₂ e a condição CE₀. Isto implica que, diferente do observado nas concentrações de 1 e 2 mg.L⁻¹, os efeitos sobre a integridade celular de *D. circinale* foram causados durante a mistura rápida e perduraram ao longo da mistura lenta.

3.3.2.2 Efeitos da mistura rápida e da mistura lenta na redução dos tricomas na presença de pré-oxidação

Além de comprometer a integridade dos tricomas de *C. raciborskii*, as condições hidráulicas associadas ao uso de pré-oxidação com Cl₂ (Figura 10A a Figura 10C) foi capaz de reduzir significativamente o comprimento dos tricomas dessa espécie (p<0,05, Tabela 19) em todas as dosagem. Do mesmo modo, usando KMnO₄ na pré-oxidação (Figura 10D a Figura 10F) também foram observadas reduções significativas (p<0,05, Tabela 19).

Para *C. raciborskii*, o tempo de contato foi importante para que houvessem reduções significativas no experimento E9 e E10, onde verificou-se tricomas maiores (Figura 10C, para Cl₂, e Figura 10F, para o KMnO₄). Isso porque só foi verificado redução após a mistura lenta (CE₂). Nos experimentos E1, E2, E5 e E6, as reduções ocorrem na mistura rápida, pois não foram observadas diferenças significativas (p>0,05, Tabela 19) entre os comprimentos dos tricomas após a mistura rápida (CE₁) e após a lenta (CE₂), conforme pode ser visto nas Figura 10A, Figura 10B, Figura 10D e Figura 10E, respectivamente. Esse comportamento pode ser atribuído a diferenças entre os tamanhos das cepas em cada experimento.

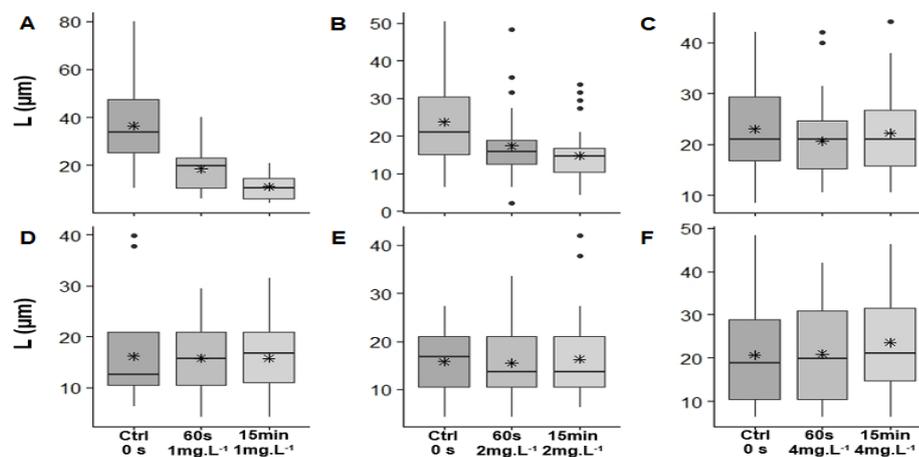
Figura 10 - Efeito da redução do tricoma de *C. raciborskii* aos efeitos da mistura rápida (GR durante 60 s) e mistura lenta (GL durante 14 min). Os asteriscos representam as médias e os pontos outliers.



Fonte: Autor (2019)

Na Figura 11, as condições hidráulicas na presença de pré-oxidação com Cl_2 parece também impactar de forma significativa o comprimento dos tricomas de *D. circinale* ($p < 0,05$, Tabela 19), fato verificado nas concentrações de 1 e 2 mg.L^{-1} nos experimentos E3 e E4, respectivamente (Figura 11A e Figura 11B). Todavia, quando os organismos apresentam comprimento reduzido, como os observados nos experimentos E4, E8, E11 e E12, mesmo nas mais altas concentrações dos oxidantes aplicados no estudo (4 mg.L^{-1}), não se verificou reduções significativas ($p > 0,05$, Tabela 19), conforme pode ser visto nas Figura 11C a Figura 11F.

Figura 11 - Efeito da redução do tricoma de *D. circinale* devido aos efeitos da mistura rápida (GR durante 60 s) e mistura lenta (GL durante 14 min). Os asteriscos representam as médias e os pontos outliers.



Fonte: Autor (2019)

Tabela 19 - Teste de Wilcoxon para avaliação de redução significativas do comprimento dos tricomas na presença de oxidantes. Em negritos os valores significantes ($p < 0,05$)

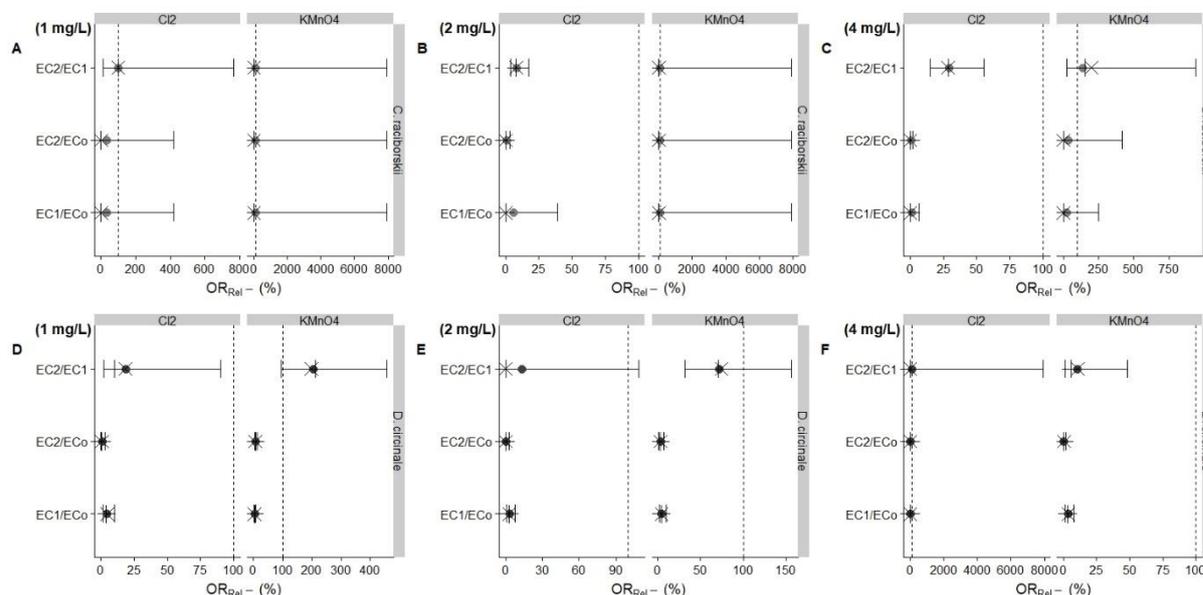
Experimento	Conc. (mg.L ⁻¹)	Espécie	Oxidante	Cenários comparados		
				CE ₁ x CE ₀	CE ₂ x CE ₀	CE ₂ x CE ₁
E1	1	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂	<0.001	<0.001	1.000
E2			KMnO ₄	<0.001	<0.001	1.000
E3	1	<i>D. circinale</i>	Cl ₂	<0.001	<0.001	<0.001
E4			KMnO ₄	1.000	1.000	1.000
E5	2	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂	<0.001	<0.001	1.000
E6			KMnO ₄	<0.001	<0.001	1.000
E7	2	<i>D. circinale</i>	Cl ₂	0.017	0.061	<0.001
E8			KMnO ₄	1.000	1.000	1.000
E9	4	<i>C. raciborskii</i>	Cl ₂	1.000	0.049	0.155
E10			KMnO ₄	1.000	0.023	0.155
E11	4	<i>D. circinale</i>	Cl ₂	1.000	1.000	0.965
E12			KMnO ₄	1.000	1.000	0.923

Fonte: Autor (2019)

3.3.2.3 Medida da associação dos estresses causados pela mistura rápida e lenta na presença de pré-oxidação

Na Figura 12, através do OR_{rel} , são mostrados os resultados que quantificam o nível de associação entre os eventos de lise e as condições hidráulicas da mistura rápida e lenta na presença de pré-oxidação em todos os cenários de comparações estudados. Observou-se que para pré-oxidação utilizando qualquer uma das concentrações de KMnO₄ (Figura 12A a Figura 12C) ou em 1 mg.L⁻¹ de Cl₂ (Figura 12A) as chances de tricomas de *C. raciborskii* íntegros são iguais em todos os cenários de comparação, pois o intervalo de confiança possui o valor 1 (100%). Isso sugere que as cepas de *C. raciborskii* utilizadas nos experimentos não são impactadas por essas condições.

Figura 12 - Resultados dos OR_{rel} para os 12 experimentos. Retas pontilhadas representam o valor 1, a cruz (+) representa o odds estimado pela primeira transformação, (x) pela segunda transformação e o ponto cinza dados não transformados. As retas horizontais representam os intervalos de confiança estimados com 95% de certeza.



Fonte: Autor (2019)

Ainda para *C. raciborskii*, na pré-oxidação com dosagens de 2 e 4 mg.L⁻¹ de Cl₂ os valores de OR_{rel} foram pequenos (Figura 12B e Figura 12C, respectivamente). Com isso, pode-se afirmar que após as condições experimentais da mistura rápida (CE₁) e da mistura lenta após a rápida (CE₂), a chance de encontrar células íntegras de *C. raciborskii* em comparação à condição inicial CE₀, foram reduzidas respectivamente para aproximadamente 6 e 0,5%, usando 2 mg.L⁻¹, e por volta de 1 e 0,3 %, usando 4 mg.L⁻¹ (APÊNDICE A).

Adicionalmente, quando avaliado os efeitos apenas da mistura lenta (valores referentes a CE₂/CE₁ na Figura 12), observou-se que a chance de encontrar células íntegras de *C. raciborskii* em CE₂ é entorno de 8 e 29% a de CE₁, quando foi utilizado 2 e 4 mg.L⁻¹, respectivamente. Isso sugere que a combinação “baixo gradiente de velocidade e tempo de contato prolongado”, característicos da mistura lenta (CE₂), reduziu mais as chances de células íntegras do que o intenso gradiente de velocidade e o curto tempos de contatos (CE₁).

Por outro lado, os ensaios de pré-oxidação nas suspensões de *D. circinale* usando Cl₂ com concentrações de 1 (Figura 12D), 2 (Figura 12E) e 4 mg.L⁻¹(Figura 12F) reduziu as chances de células íntegras após CE₁ para aproximadamente 5, 3 e 0,4% ,respectivamente, e em CE₂ para valores próximos de 0,9; 0,4 e 0,4 % respectivamente (APÊNDICE A), ambos em comparação com o estado inicial CE₀(valores referentes a CE₁/CE₀ e CE₂/CE₀ na Figura 12,

respectivamente). Esse fato indica que a cultura de *D. circinale* utilizada mostrou-se mais susceptível a ação do cloro do que *C. raciborskii*.

As Figura 12D , Figura 12E e Figura 12F mostraram que para as cepas de *D. circinale* utilizadas nos experimentos, em relação à condição inicial CE_0 , a pré-oxidação com o $KMnO_4$ nas concentrações de 1, 2 e 4 $mg.L^{-1}$ reduziu as chances de células íntegras para aproximadamente 3, 5 e 3,6 % (APÊNDICE A), respectivamente, após CE_1 e para cerca de 6, 4 e 0,4 % , respectivamente, após CE_2 (valores referentes a CE_1/CE_0 e CE_2/CE_0 na Figura 12, respectivamente). Assim como visto para o Cl_2 , esses resultados apontam que todas as concentrações ensaiadas de $KMnO_4$ promoveram eventos de lise celular significativos nas cepas dessa espécie.

O efeito da pré-oxidação após a mistura lenta (valores referentes a CE_2/CE_1 na Figura 12) só foram significantes nos experimentos com 1 $mg.L^{-1}$ de Cl_2 e 4 $mg.L^{-1}$ de $KMnO_4$. Isso significa que em relação a chance de células íntegras após a mistura rápida (CE_1), as chances de células íntegras depois da mistura lenta (CE_2) reduziram para aproximadamente 18% e 11%, respectivamente. Isso pode ser atribuído ao grande impacto causado nas células por pré-oxidação utilizando concentrações maiores do 1 $mg.L^{-1}$ de Cl_2 e em 4 $mg.L^{-1}$ de $KMnO_4$ logo na mistura rápida, fato que reduziu drasticamente o número de células íntegras logo nesta primeira condição experimental (CE_1). Assim, o longo tempo de contato não reduzir mais as chances de organismos íntegros, pois estas já estão baixíssimas ou, em último caso, zeraram.

3.3.3 Efeitos da mistura rápida e lenta na presença ou não de pré-oxidação em parâmetros físico-químicos

Nessa etapa do estudo foram avaliados os efeitos no pH, UV_{254} e UV_{455} (indicativo de cor verdadeira) das condições hidráulicas tanto na ausência ($C_0 = 0$) quanta na presença de pré-oxidação com as dosagem $C_1 = 1mg.L^{-1}$, $C_2 = 2 mg.L^{-1}$, $C_3 = 4 mg.L^{-1}$ de Cl_2 e $KMnO_4$. Também foram avaliados o residual de oxidante na condição inicial (CE_0), após a mistura rápida (CE_1) e após a mistura lenta (CE_2).

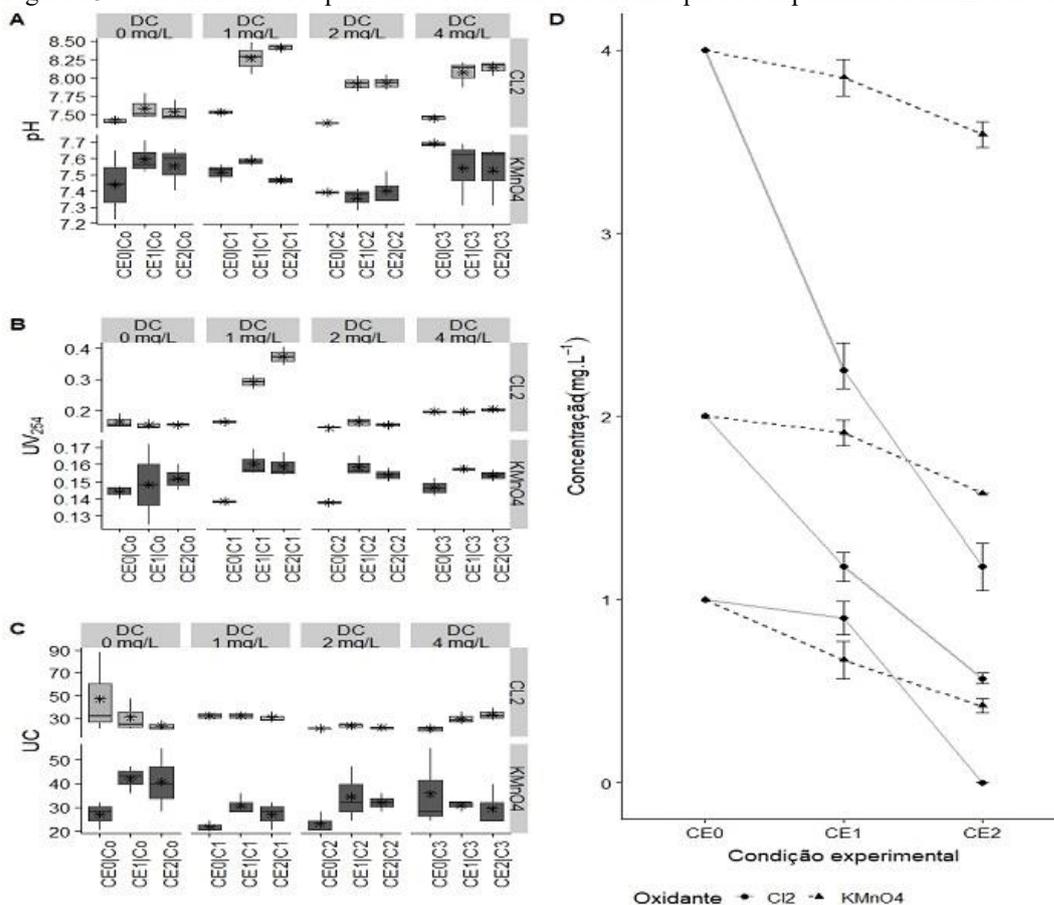
Na Figura 13A encontram-se os resultados para *D. circinale*, onde pode-se observar que houveram leves aumentos dos valores de pH nos experimentos utilizando Cl_2 , tendência não observada para o $KMnO_4$, possivelmente devido ao hipoclorito, proveniente do tipo de derivado clorado utilizado.

Na Figura 13B que se refere ao parâmetro UV_{254} , medida indireta de matéria orgânica, para os ensaios de pré-oxidação onde foram aplicados concentrações de 1 $mg.L^{-1}$

observa-se uma tendência de aumento dos valores em relação ao tempo inicial (CE_0) durante a mistura rápida (CE_1) e lenta (CE_2) tanto para o Cl_2 quanto para o $KMnO_4$.

Com a redução das chances de células integras em CE_1 e CE_2 para mesmos de 50% das observadas nas condições iniciais CE_0 , verificou-se um aumento dos eventos de lise celular que resultaram no acréscimo de matéria orgânica que responde ao UV_{254} . Essa MOI foi liberada e devido as diferenças das características da cinética do $KMnO_4$ e do Cl_2 (tema melhor abordado no próximo tópico), percebe-se um patamar de estabilização para o $KMnO_4$. Já para o Cl_2 , há uma tendência de aumento ao longo do tempo de contato, o que provavelmente resultou no consumo total desse oxidante (Figura 13D).

Figura 13 – Parâmetro físico-químicos e o residual de oxidante para os experimentos realizados com *D. circinale*.



Fonte: Autor (2019)

Ainda na Figura 13B para 2 e 4 $mg.L^{-1}$, não se observou tendência de aumento nos valores de UV_{254} ao longo de CE_1 e CE_2 para o Cl_2 em relação a CE_0 , pois por ainda haver residual desse oxidante (Figura 13D), esse consome rapidamente a matéria orgânica liberada. Em contraste, verificou-se que a cinética característica do $KMnO_4$ possivelmente ocasionou um

pico em CE₁ e queda dos valores em CE₂ similar aos observado por (LI, L. *et al.*, 2014; NACERADSKA *et al.*, 2017).

Na Figura 13C os valores de cor verdadeira, obtidos através da UV₄₅₅, mostram uma tendência de estabilização para o Cl₂ em quanto para o KMnO₄ um leve aumento em CE₁, sinalizando um tendência de queda nos valores em CE₂ para a concentração de 4 mg.L⁻¹. Mostrando que o Cl₂ foi mais eficiente em remover cor do que o KMnO₄ nas condições ensaiadas.

Para os controles (C₀ nas Figura 13A - Figura 13C) os valores de pH, UV₂₅₄ e cor verdadeira (UV₄₅₅) nos ensaios que utilizaram KMnO₄ apresentaram uma tendência de elevação de CE₁ para CE₂ em relação a CE₀, possivelmente a graças aos eventos de lises. Já para os experimentos realizados com o Cl₂, os valores mantiveram-se estáveis, porém em patamares mais elevados dos que foram observados com o KMnO₄. Esses eventos possivelmente ocorrem devido à redução das chances de células íntegras (Figura 2) observadas nos controles dos experimentos realizados com Cl₂ e KMnO₄ sob a ação das condições hidráulicas da mistura rápida e lenta sem pré-oxidação.

Para o residual de oxidante mostrado na Figura 13D observa-se que o Cl₂ apresentou maior demanda do que o KMnO₄, em todas as concentrações, evidenciando as diferenças entre as cinéticas dos dois oxidantes conforme apresentado por alguns estudos (CHO *et al.*, 2004; LI, L. *et al.*, 2014, 2018).

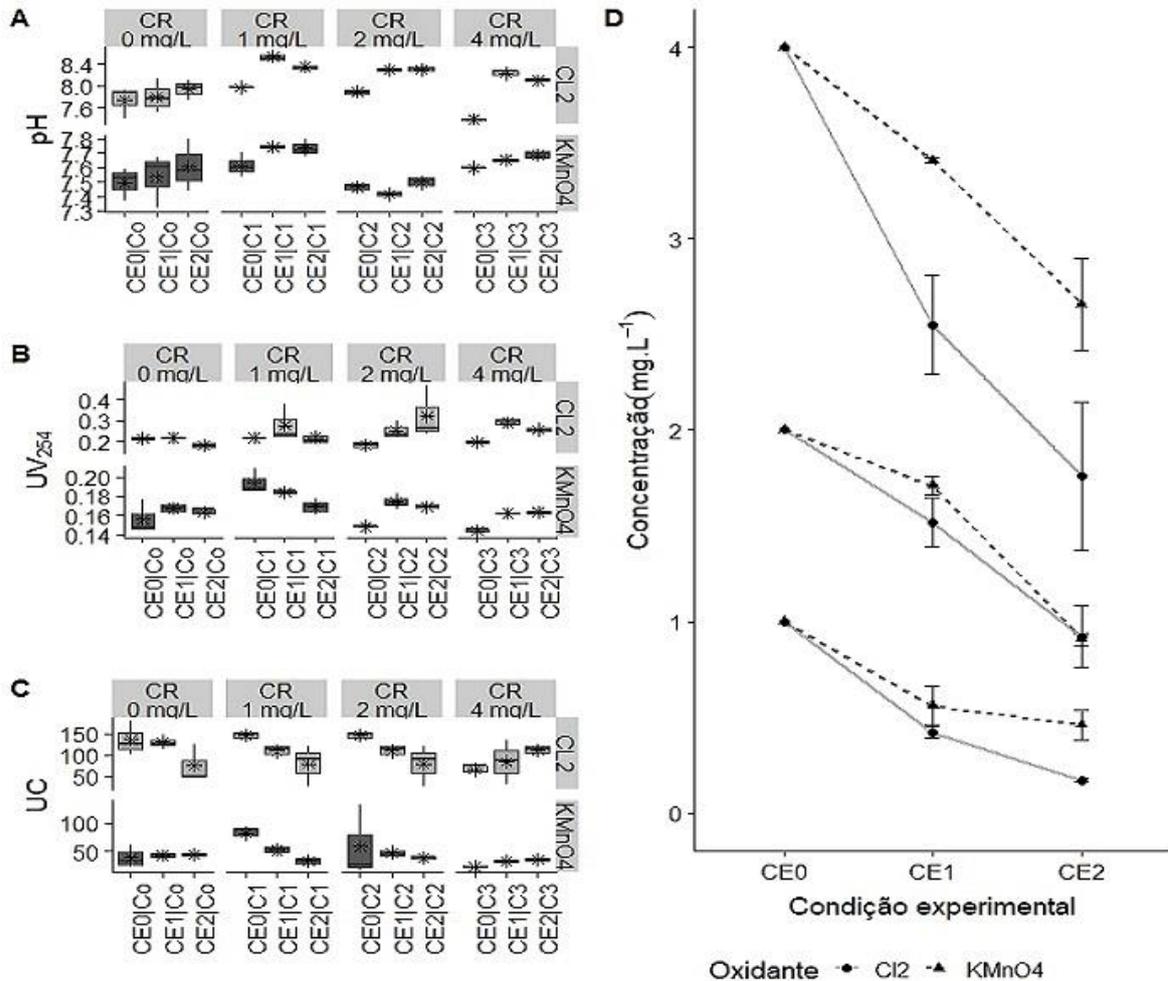
Na Figura 14A são mostrados os resultados dos valores de pH encontrados nos ensaios de pré-oxidação das suspensões de *C. raciborskii*. Observou-se que houveram aumentos dos valores de pH nos experimentos utilizando Cl₂, similar ao ocorrido com *D. circinale*. Novamente os experimentos realizados com KMnO₄ não evidenciaram modificações substanciais nos valores de pH, corroborando com os resultados observados com *D. circinale*.

No que se refere ao parâmetro UV₂₅₄, o comportamento de *C. raciborskii* foi diferente do observado em *D. circinale*. A Figura 14B mostra que nos ensaios de pré-oxidação onde foram aplicados concentrações de 1 mg.L⁻¹ de Cl₂ observou-se uma estabilização dos valores durante as três etapas CE₀, CE₁ e CE₂, possivelmente devido ao fato das chances de células íntegras serem iguais nesses cenários (todos os IC cruzam a linha pontilhada referente ao valor 1 na Figura 12D), não houveram eventos de lise e o oxidante manteve as concentrações de matéria orgânica que responde ao UV₂₅₄ constante.

Todavia, em 2 e 4 mg.L⁻¹ verificou-se uma tendência de elevação dos valores de UV₂₅₄ (Figura 14B). Como nessas concentrações as chances de células íntegras em CE₁ e CE₂ diminuíram para mesmos de 6% das condições iniciais CE₀ (Figura 12E e Figura 12F), eventos

de lise ocorreram. Portanto, em 2 mg.L^{-1} observou-se uma elevação contínua ao longo de CE_1 e CE_2 . Já para 4 mg.L^{-1} , devido à alta concentração, notou-se depois de um pico em CE_1 uma leve tendência de redução em CE_2 .

Figura 14 - Parâmetro físico-químicos e o residual de oxidante para os experimentos realizados com *C. raciborskii*



Fonte: Autor (2019)

Em comparação com a condição inicial (CE_0), para o KMnO_4 verificou-se uma diminuição do parâmetro UV_{254} ao longo de CE_1 e CE_2 para 1 mg.L^{-1} e para as demais concentrações (2 e 4 mg.L^{-1}) um patamar ligeiramente superior em CE_1 e CE_2 (Figura 14B).

Isso pode ser atribuído ao fato de que as chances de células íntegras em CE_1 e CE_2 após a pré-oxidação com o KMnO_4 não mudaram em relação às condições iniciais CE_0 (todos os IC cruzam a linha pontilhada referente ao valor 1 nas Figura 12D-Figura 12F), motivo que indica a não existência eventos de lise significativos, a MOE liberada em 1 mg.L^{-1} por *C. raciborskii* foi rapidamente consumida pelo KMnO_4 . De forma similar, em 2 e 4 mg.L^{-1} o nível

de MOE estimulada foi maior e o oxidante estabilizou os valores de UV_{254} em um novo patamar ligeiramente maior do que o inicial.

Na Figura 14C, o comportamento de *C. raciborskii* apresentou diferenças quando comparadas a *D. circinale* para os valores de cor verdadeira. Foi observado uma tendência redução tanto para o Cl_2 quanto para $KMnO_4$ nas concentrações de 1 e 2 $mg.L^{-1}$ ao longo de CE_1 e CE_2 . Em contrapartida, para a concentração de 4 $mg.L^{-1}$ observou-se estabilização dos valores durante as três etapas (CE_0 , CE_1 e CE_2) para um $KMnO_4$ e para Cl_2 , uma leve alta em CE_2 . Esses efeitos podem ser atribuídos aos possíveis eventos de lise causados pela redução das chances de células integras para nos experimentos de pré-oxidação com o Cl_2 .

Para os controles (C_0 nas Figura 14A-Figura 14C) os valores mantiveram-se estáveis nos experimentos com o Cl_2 e $KMnO_4$, corroborando com o fato das condições hidráulicas não alterarem as chances de células integras de *C. raciborskii* (Figura 9).

Para a demanda de oxidante mostrada na Figura 14D, observou-se que o Cl_2 teve concentrações mais elevadas consumidas do que o $KMnO_4$, semelhante aos que ocorreu com *D. circinale*, porém nos experimentos com *C. raciborskii* os residuais finais (após CE_2) de Cl_2 foram maiores do que os observados em *D. circinale* e os de $KMnO_4$ foram menores, possivelmente como as chances não foram reduzida, os eventos de lise não foram significantes e o estímulo e liberação de MOE em *C. raciborskii* consumiu o $KMnO_4$. Já para *D. circinale*, como as chances foram reduzidas, os eventos de lise liberam mais MOI e esse requer um maior tempo de contato para serem degradados, conforme também observado por (WANG *et al.*, 2013).

3.4 Discussão

3.4.1 Efeitos da mistura rápida e lenta

Uma vez que as condições hidráulicas tanto da mistura rápida quando da mistura lenta não apresentaram diferenças significativas nos 12 experimentos ($p > 0.05$), as alterações observadas entre cada condição experimental não foram causadas por possíveis condições anormais de mistura durante os jarrest, mas sim pelos vários fatores experimentais ensaios em cada cenário de comparação.

Em primeira análise, alguns estudos mostram que utilizar um elevado gradiente de velocidade na mistura rápida aumenta o desempenho da coagulação, reduzindo o consumo de químicos (BYUN *et al.*, 2005), aumentando a remoção de turbidez e melhorando a filtrabilidade

(LIN, J. L.; PAN; HUANG, 2013). A exemplo disso, uma suspensão de caulinita em água de torneira foi estudada por Ebie and Azuma (2002), os quais observaram uma melhora ascendente na coagulação com o incremento do valor de gradiente de velocidade na faixa de 450-1000 s⁻¹.

No entanto, a exposição por elevados períodos a uma intensa mistura pode comprometer a estrutura do micro floco formado na coagulação. Esse fato pode ser atribuído ao alto cisalhamento de gradientes de velocidade intensos (JARVIS *et al.*, 2005; WATANABE, 2017). Isso pode comprometer o desempenho da coagulação conforme evidenciados nos experimentos de Lin, Pan and Huang (2013). Utilizando amostras de água superficial coletadas da ETA de Fengyuan (Taiwan), os autores relatam que o aumento da remoção da turbidez e a filtrabilidade não foi significativa com o aumento do gradiente de velocidade (na faixa de 100-800 s⁻¹) em amostras de elevada turbidez (200 UNT). Os autores atribuíram esse resultado ao fato de que em sistemas como os de elevada turbidez, o número de colisões e aglutinação de partículas já é alto o suficiente por si só, o que torna o efeito do elevado gradiente de velocidade mais prejudicial do que benéfico para a integridade dos flocos pré-existentes e para a formação de novos. A partir dessas constatações, é plausível conjectura efeito similar em suspensões de cianobactérias.

Portanto, similar ao que ocorre nos flocos, as condições intensas de mistura de GR durante a etapa de mistura rápida podem ter causado tensão de cisalhamento suficiente para comprometer a estrutura do tricoma de *D. circinale*, gerando pontos de ruptura, e ocasionando possíveis eventos de lise celular, fato não observado em *C. raciborskii*. Esses resultados corroboram com H. Li *et al.* (2018) que em estudos constataram que há um efeito insignificante nas células de *C. raciborskii* sob estresse de agitação mecânica menores do que 350 rpm.

Apesar de serem espécies filamentosas, *C. raciborskii* e *D. circinale* diferem em algumas características morfológicas. A cultura de *D. circinale* utilizada nos experimentos apresentava tricoma com células esféricas (diâmetro: $5.40 \pm 0.20 \mu\text{m}$), quase sempre isodiamétricas. Já a cultura de *C. raciborskii*, apresentava células cilíndricas (comprimento: $2,80 \pm 1.00 \mu\text{m}$) ou em forma de barril. Os filamentos de *D. circinale* flutuam como tricomas solitários e apresentam-se retos, ligeiramente curvos ou flexuosos (torcidos), aparentando um aspecto flexível. No entanto, os tricomas de *C. raciborskii* apresentam-se na forma de talo, não aparentando flexibilidade, os filamentos eram solitários, retos e flutuavam livremente, estreitando-se para as extremidades em algumas tricomas.

Esses características morfológicas condizem com (GENUÁRIO *et al.*, 2019; KOMÁREK; JOHANSEN, 2015; SANT'ANNA, 2012) e podem justificar os comportamentos

diferenciados entre *C. raciborskii* e *D. circinale*. Como os tricomas de *D. circinale* apresentavam flexibilidade, a intensa mistura pode ter flexionado os tricomas e a combinação desse efeito com o alto cisalhamento pode ter ocasionado a lise e a redução do tricoma de *D. circinale*. Para *C. raciborskii*, como o tricoma não era tão flexível quanto os de *D. circinale*, as torções e taxas de cisalhamento parece não ter impactado esse organismo de forma significativa. Portanto, em relação aos estresses causados apenas pelas condições hidráulicas de GR na mistura rápida, *D. circinale* mostrou-se mais vulnerável (lise celular e redução de tricoma) do que *C. raciborskii*.

Adicionalmente, acredita-se que esse processo ocorre de forma contínua até que o tricoma atinja um tamanho mínimo em que os efeitos do gradiente não são mais importantes se as condições hidráulicas não forem cessadas, similar ao que acontece com o floco quando atinge o seu tamanho máximo no estado estacionário para um determinado gradiente e sua respectiva taxa de cisalhamento (JARVIS *et al.*, 2005; WATANABE, 2017) e também como observado por Pestana *et al.* (2018) em estudos realizados com cianobactérias dos gêneros (*Pseudanabaena*, *Planktolyngbya* com menos de 10-12 células por tricoma) com tricomas curtos que apresentaram menor sensibilidade aos estresses físicos das etapas do tratamento de água.

Alguns autores (Li *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018) relatam os efeitos da pré-oxidação sobre a *C. raciborskii* em condições de mistura rápida de 300 a 350 rpm e mistura lenta de 30 a 90 rpm. Em consonância ao encontrado neste estudo, os autores relataram que a *C. raciborskii* não apresentou alterações em sua estrutura, além de demonstrar resiliência aos estresses desses ensaios.

Pestana *et al.* (2018) avaliaram os danos ocorridos nos tricomas de várias espécies filamentosas, dentre elas *C. raciborskii* e *D. circinale*, ao longo das operações unitárias de ETA em escala real e piloto. Dentre os resultados observados pelos autores, *C. raciborskii* foi mesmo susceptível aos estresses físicos (25% de redução do tricoma) do que *D. circinale* (63-73% de redução do tricoma), fato similar ao observado neste experimento.

Outro fator relevante para a coagulação que influencia na estrutura dos flocos é o tempo da mistura rápida (JARVIS *et al.*, 2005; LIN, J. L.; PAN; HUANG, 2013; RAMPHAL; MUZI SIBIYA, 2014; WATANABE, 2017). O efeito negativo do tempo de mistura rápida prolongado foi visto por Ramphal and Muzi Sibiya (2014). Em seus experimentos, os autores observaram que um tempo além de 15 s (gradiente de velocidade 116 s^{-1} , pH 8 e $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Al^{3+}) resultou em um aumento de turbidez residual e da cor nas suspensões analisadas.

Dessa forma, tempos de mistura prolongados podem também comprometer a estrutura dos tricomas, assim como nos flocos. Portanto, os 60 s de exposição às taxas de cisalhamento de GR foram mais prejudiciais à *D. circinale* do que à *C. raciborskii*, devido provavelmente as diferenças morfológicas das espécies.

Além dos trabalhos citados anteriormente, Moisaner *et al.* (2002) demonstraram que *Dolichospermum* sp. são mais suscetíveis ao estresse de cisalhamento do que outros gêneros filamentosos de cianobactérias, possivelmente devido a sua morfologia.

Portanto, esses resultados sinalizam que assim como a combinação de “elevados gradientes gradiente e curtos intervalos de tempo” podem melhorar a coagulação, preservando a estrutura do floco, essa combinação também poderia acarretar em um menor efeito deletério em suspensões de cianobactérias. Todavia, estudos mostram que quanto menor o tempo de mistura mais deve ser intenso o gradiente.

Lin, Pan and Huang (2013) concluíram que alta intensidade de mistura rápida (gradiente de velocidade $> 5000 \text{ s}^{-1}$, obtido por um misturador flash instantâneo (MFI) em um curto tempo de mistura pode formar grandes flocos, facilitando a remoção de partículas e matéria orgânica dissolvida, mesmo em suspensões com elevada turbidez, fato também observado por Byun *et al.* (2005) utilizando o mesmo equipamento.

Portanto para tratar águas com elevada concentração de cianobactérias, deve-se buscar um valor ótimo entre gradiente e tempo de mistura, principalmente quando *D. circinale* estiver presente em concentrações iguais ou superiores a 10^5 células/mL. Além disso, o valor de GR e do tempo da mistura rápida adotado nos experimentos estão próximos aos limites inferiores das diretrizes de projeto de ETA recomendadas por normas internacionais, tais como (AWWA e ASCE, 2012) e (Ten State Standards, 2012) que, segundo (VADASARUKKAI; GAGNON, 2015), recomendam mistura rápida durante a coagulação com gradiente de velocidade de 600 a 1000 s^{-1} em 10 a 60 s e gradiente de no mínimo 750 s^{-1} em até 30 s, respectivamente.

Dessa forma, a adoção desses valores para projetos e/ou operação das estações podem acarretar no surgimento de infortúnios relacionados à presença cianobactérias, principalmente *D. circinale*, devido tanto à redução do tricoma, que pode impactar no desempenho da filtração (PESTANA *et al.*, 2018); como aos eventos de lise que podem comprometer a coagulação, devido ao liberação de MOI.

Dentre outras adversidades, essas substâncias liberadas podem comprometer o tratamento em vários aspectos: (1) funcionando como dispersante (XIE *et al.*, 2016); (2) aumento no consumo de químicos como coagulantes, que além que impactar nos custos podem

ainda agravar os eventos de lise (LÜRLING *et al.*, 2017; MUCCI *et al.*, 2017; RIZZO, 2014; SRINIVASAN; SORIAL, 2011; ZHOU; SHAO; GAO; ZHU *et al.*, 2014); (3) problemas com compostos organolépticos (sabor e odor) e (4) aumento da concentração de cianotoxinas (DREHER *et al.*, 2018; LIU, Y. *et al.*, 2014; PEREYRA *et al.*, 2017). Assim, dependendo de qual das espécies domine o corpo hídrico destinado ao abastecimento humano, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias apropriadas para o tratamento dessas águas (Li *et al.*, 2018).

Destaca-se ainda que com o uso de coagulação aprimorada foi possível reduzir o valor gradiente de 750 s^{-1} para 300 s^{-1} conforme os resultados de Vadasarukkai and Gagnon (2015). Os autores ainda observaram que o consumo de energia foi de 500 kW-h para menos de 100 kW-h, sem sacrificar a qualidade da água em termos de turbidez e remoção de matéria orgânica dissolvida, o que representaria uma valiosa economia de energia e custos, sem afetar negativamente o desempenho da coagulação.

O ajuste das condições operacionais da mistura lenta também pode ser utilizado como alternativa para superar os possíveis infortúnios causados pela redução dos gradientes e tempo da mistura rápida. Possivelmente, a baixa taxa de cisalhamento do gradiente GL não ocasionou danos aos tricomas e nem resultaram em um incremento de lise tanto para *D. circinale* quanto para *C. raciborskii*, mesmo em no tempo de 14 mim, conforme observado no presente estudo.

Assim, de acordo com o visto nos ensaios com *D. circinale*, os resultados sugerem que os possíveis eventos de lise e redução do tricoma ocorreram somente na mistura rápida, considerada a etapa crítica para esses eventos. Dessa forma, na mistura lenta pode-se ter uma maior flexibilidade dos ajustes dos parâmetros operacionais afim de se otimizar o processo de formação de flocos, que melhora o processo de clarificação nas etapas subsequentes. Uma das maneiras de viabilizar essa flexibilização é atender as recomendações da norma NBR 12.216 que sugerem uma compartimentalização das unidades de floculação. Desse forma é possível aplicar gradientes de velocidade descendente ($70 - 10 \text{ s}^{-1}$) afim de reduzir os problemas com as tensão de cisalhamento (ABNT, 1992).

Mohammed and Shakir (2018) observaram que gradiente de velocidade $54,5 - 78,5 \text{ s}^{-1}$ em 20 mim (equivalente a um $GT = 65280 - 94200$, parâmetro utilizado pela *American Water Works Association* que corresponde ao produto do valor do gradiente de velocidade e a duração da mistura), foi a mais favorável para a floculação de água produzida em campo petrolífero (410,3 UNT; pH = 7; Condutividade Elétrica = $94900 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$; Sólido Total Dissolvido = $85410 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e Sólido Total Suspenso = $333,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) usado PAC, o que,

segundo os autores, está de acordo com o limite padrão ($10-75 \text{ s}^{-1}$) normalmente utilizados para os gradiente de velocidade da mistura lenta.

No entanto, Zhang *et al.*(2013) observaram que o valor ótimo de GT para mistura lenta de uma suspensão de caulinita utilizando PAC em coagulação com neutralização de carga (GT = 13500, gradiente de velocidade de 15 s^{-1} e no tempo de 15 mim) foram maiores do que durante a de varredura (GT = 4500, gradiente de velocidade de 15 s^{-1} no tempo de 5 mim) e ambos foram menores do que o intervalo recomendado pela American Water Works Association ($24000 \leq \text{GT} \leq 84000$), do que as observações de (MOHAMMED; SHAKIR, 2018) e do que o valor de 58800 (GL= 70 s^{-1} em 14 min) praticado nesse estudo nas suspenções de *C. raciborskii* e *D. circinale*.

Por tanto, de ante das complexidades particulares das suspensões de cianobactérias (lise e redução de tricomas) e na falta de ensaios de tratabilidade específicos; $\text{GT} < 58.800$ pode ser um bom parâmetro inicial de operação e projeto das unidades de mistura lenta, uma vez nessas condições as cepas utilizadas nos experimentos não foram significativamente impactadas (lise e redução do tricoma), mesmo sendo mais susceptíveis aos estresses hidráulicos do que as encontradas em condições naturais, devido as condições cultivos (alta disponibilidade de nutrientes, baixa competição e seleção natural, dentre outros aspecto).

3.4.2 Efeitos da pré-oxidação

Os resultados mostraram que a pré-oxidação potencializou os danos em *D. circinale* e *C. raciborskii* (rompendo a celular e/ou reduzindo tricomas) causadas pelas etapas de misturas usando GR (durante 60 s) e GL (durante 14 min). Quanto a integridade celular, observou-se que *C. raciborskii* parece ser imune aos efeitos do KMnO_4 em todas as concentrações testadas ($C_1 = 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $C_2 = 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $C_3 = 4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), enquanto para Cl_2 , a partir de $C_2 = 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, os eventos de lise foram significantes (Tabela 18) bem como os de redução dos tricomas (Tabela 19).

Conforme Shi *et al.* (2019) foi observado que os danos causados pelo Cl_2 sobre células *M. aeruginosa* e *Cyclotella meneghiniana* foram maiores do que os causados por KMnO_4 em dosagem maiores do que $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, fato semelhante para ambas as espécies avaliadas neste estudo (Tabela 18).

Assim como na ausência de pré-oxidação, novamente *C. raciborskii* mostrou-se mais resistente do que *D. circinale* aos estresses químicos causados pela etapa de pré-oxidação durante a mistura rápida e lenta. Esse fato pode ser atribuído possivelmente as diferenças

morfológicas já comentadas entre essas espécies. Como apenas os estresses promovidos durante a mistura rápida e a lenta já favorecem eventos de lise celular em *D. circinale*, a presença dos oxidantes parece intensificar os danos nas células desses organismos, fato que motivou a drástica redução de chances de células integras (< 6% em relação às condições iniciais) após as etapas de mistura na presença de pré-oxidação.

A multicelularidade observada nos tricomas de *D. circinale* requer conexão e comunicação entre células. Esta por sua vez é feita por junções septais, conhecida anteriormente como microplasmodesmata, que apresenta características diferentes para uniões do tipo célula vegetativa-célula vegetativa ou heterocisto-célula vegetativa (CHAILAKHYAN *et al.*, 1982; DAVIDSON *et al.*, 2016; STEBEGG; SCHMETTERER; ROMPEL, 2019). Atualmente, tanto a composição precisa das junções septais quanto suas possíveis interações com o peptidoglicano (um envelope observado em células do tipo Gram-negativo que compõe a membrana externa de cianobactérias) e as proteínas relacionadas ao peptidoglicano, bem como sua resistência os estresses do cisalhamento causado pelas condições adversas do tratamento de água ou sua interação como oxidantes permanecem pouco exploradas (FLORES *et al.*, 2016).

Mesmo assim, Lin *et al.* (2009) constatam através de imagens obtidas por um microscópio eletrônico de varredura (MEV) que dosagens de 1 mg.L⁻¹ de Cl₂ em curtos períodos de contato (1 min) foram suficientes para quebrar as junções septais das células vegetativas o tricoma de *D. circinale* (*Anabaena circinalis*), tornado os tricomas mais curto.

Para além das questões morfológicas, os resultados observados também apontaram que mesmo cepas iguais em condições mistura semelhantes, os oxidantes interagiram de forma diferente com os organismos estudados. Apesar do potencial redox ligeiramente maior ($\text{MnO}_4^- + 4\text{H}^+ + 3\text{e}^- \rightleftharpoons \text{MnO}_2(\text{s}) + 2\text{H}_2\text{O}$, $E^0 = +1,695 \text{ V}$) em relação ao Cl₂ ($\text{HClO} + \text{H}^+ + 3\text{e}^- \rightleftharpoons \frac{1}{2} \text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O}$, $E^0 = +1,63 \text{ V}$) (SKOOG *et al.*, 2005), o KMnO₄ parece não afetar a integridade de *C. raciborskii* de forma significativa como o Cl₂, a partir de 2 mg.L⁻¹, pois mesmo após a pré-oxidação com até 4 mg.L⁻¹ desse oxidante, a chances de células íntegras nos experimentos foram iguais às condições iniciais de acordo com a Figura 12. Isso pode ser devido aos diferentes mecanismos de ação de inativação celular e oxidação de compostos observados entre esses oxidantes, conforme Lin *et al.* (2016) observaram.

Segundo os mesmos autores, as diferenças observadas entre NaOCl, ClO₂ e KMnO₄ podem ser explicadas pelos diferentes mecanismos de oxidação com os três produtos químicos utilizados. Enquanto dosagem a partir 1 mg.L⁻¹ de NaOCl e ClO₂ já reduziram drasticamente a viabilidade celular de *Pediastrum simplex* (alga) e *Cyclotella sp.* (diatomáceas) em ensaios de

pré-oxidação realizados em jarrest (200 rpm durante 60 s), dosagem de até 2 mg.L⁻¹ causam pequenas alterações na viabilidade celular utilizando o KMnO₄.

Já em experimentos realizados por Fan, Ho, *et al.* (2013) em *M. aeruginosa* com aplicação de diferentes oxidantes, dentre eles Cl₂ e KMnO₄, os autores verificaram que em tempos de contato variando de 0,5 a 5 min o Cl₂ apresentou uma elevada capacidade de comprometer a integridade celular (≥88% de células danificadas) no primeiro minuto. Todavia, houveram baixos eventos de lise em *M. aeruginosa* usando doses de KMnO₄ de 1 e 3 mg L⁻¹ e tempo de contato menor do que 1 h, mas a porcentagem de células intactas diminuiu para 74% quando se usou 5 mg L⁻¹ de KMnO₄ após 6 h de tratamento.

Fan *et al.* (2014) verificou que doses de 5 e 10 mg L⁻¹ de KMnO₄ causaram a perda na integridade da membrana em 26 e 100% das células, respectivamente, em 6 horas. No entanto, a proporção de células intactas permaneceu constante para 1 e 3 mg L⁻¹ de tratamentos KMnO₄ no mesmo período.

Tanto para o Cl₂ quanto para o KMnO₄, os resultados observados nesse estudo nas suspensões de *C. raciborskii* corroboram com os trabalhos citados anteriormente. No entanto, para a espécie *D. circinale* o KMnO₄ já impactou significativamente as cepas utilizadas logo no primeiro minuto (Tabela 18). Isso pode ser atribuído ao fato que o gênero *Dolichospermum* sp. pode desenvolver mucilagem (KOMÁREK; JOHANSEN, 2015; SANT'ANNA, 2012), o que não foi observado nos organismos utilizadas nesse estudo.

Portanto, a falta dessa proteção extra pode ter contribuído para as severas reduções das chances de células íntegras em *D. circinale* (Figura 12), similar ao visto por (FAN *et al.*, 2016) utilizando *M. aeruginosa* coloniais. Além desses fatores, tem-se ainda o fato da ação do gradiente GR comentado anteriormente aliado ao baixo concentração de matéria orgânica natural na água utilizada para a diluição das suspensões utilizadas, poderiam ainda ter intensificado os efeitos de lise, uma vez que água natural geralmente contém uma matriz complexa de matéria orgânica natural, que é o fator mais importante no consumo de oxidantes como o Cl₂ (Ho *et al.*, 2006).

A ação oxidativa do KMnO₄ pode ser representada por um modelo de cinética de "segunda ordem em dois estágios", usando um modelo de atraso de Chick-Watson ("*Delayed Chick-Watson Model*"), composto por duas etapas, onde se observa que a fase de atraso ocorre no período inicial, conforme Cho *et al.* (2004). Portanto, para a inativação celular e oxidação de compostos pode-se considerar a atuação de três mecanismos distintos: fase rápida-fase lenta-fase moderada

Inicialmente na fase rápida, onde são degradados MOE dissolvida ou a mucilagem, conforme os resultados obtidos por Wang *et al.* (2013) que observaram que até 2 mg·L⁻¹ de KMnO₄ a MOE de *M. aeruginosa* produzindo pelo estímulo desse oxidante era facilmente degradada e Li *et al.* (2014) que constataram uma rápida degradação (T<10 min) da mucilagem de *M. aeruginosa* nos primeiros instantes da pré-oxidação com o KMnO₄.

Na fase lenta, representado por um patamar, uma vez degrada a MOE dissolvida ou a mucilagem, o KMnO₄ encontra a parede celular e, diferentemente de espécies como o cloro que pode facilmente penetrar a célula, este induz a secreção de mais MOE. Essa por sua vez recobre a superfície da célula, resultando no aumento da adsorção MnO₂ sobre a superfície celular, que pode reduzir o dano às células (CHEN; YEH; TSENG, 2009; FAN; DALY *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013). Esse processo ocorre até que o oxidante seja completamente consumido ou, em caso de dosagem suficientemente grandes, comprometa a integridade celular, após o devido tempo de contato necessário.

Naceradska *et al.* (2017) averiguaram que em após 10 min de pré-oxidação com o KMnO₄ (0,2-3,2 mg·L⁻¹), suspensões de *M. aeruginosa* mantiveram os valores de UV₂₅₄, residual de oxidante, residual de carbono orgânico dissolvido e UV₆₂₀ (indicativo de ficocianina) em um patamar estável, após uma fase de variação dos valores desses parâmetros (o que poderia ser relativa a primeira fase rápida do mecanismo do KMnO₄). Os autores complementam que nessas concentrações eventos de lise provavelmente não ocorreram. Ma *et al.* (2012) também relataram que os níveis de KMnO₄ diminuíram significativamente nos primeiros 10 min, seguido de uma baixa variação após esse tempo, também ensaios de pré-oxidação de *M. aeruginosa* com concentrações de KMnO₄ de 1-3 mg·L⁻¹.

No presente trabalho observou-se uma tendência similar de variação do UV₂₅₄ nos experimentos com *D. circinale* (Figura 13) e nos experimentos com *CR* (Figura 14), mais evidente em concentrações maiores. No entanto, Fan *et al.* (2013) observou que altas concentrações de KMnO₄ (> 3 mg·L⁻¹) podem requer maiores tempos de contato para oxidar tanto toxinas totais (microcistinas) quando grandes quantidades de Mn presentes na água, devido a ocorrência de eventos de lise.

Por fim, na terceira fase (fase moderadamente rápida) ocorre quando o KMnO₄ consegue comprometer a célula. Essa fase é diferente para a oxidação e a inativação celular. Para oxidação, essa última fase pode não ser tão rápida quanto para a inviabilização celular, pois uma vez havendo a lise, a MOI é liberada e um volume maior de compostos mais complexos para a oxidação pode tornar o processo mais lento, similar aos resultados de Wang *et al.* (2013) quando observaram que a MOI era mais difícil de ser degradada do que a MOE,

(FAN; DALY *et al.*, 2013) que também verificaram dificuldades em oxidar microcistinas após a lise. O primeiro e segundo mecanismos ocorrem no patamar inicial lento do modelo proposto por Chick-Watson, enquanto o terceiro mecanismo pode ocorrer na segunda parte (CHO *et al.*, 2004; LI, L. *et al.*, 2014, 2018).

Diferentemente do KMnO_4 , o Cl_2 possui um mecanismo mais eficiente para causar danos às células de cianobactérias (LIN, J. L. *et al.*, 2016). Esse fato corrobora com as constatações de Li *et al.* (2018). Os autores evidenciaram em seus experimentos que as taxas de reação da cloração foram cerca de cinco vezes mais rápidas do que as da exposição ao KMnO_4 , mesmo na presença da mucilagem, um protetor não tão eficiente, visto que tanto KMnO_4 quanto Cl_2 conseguem degradá-la similar à MOE (FAN; DALY *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2013). Isso pode ser atribuído à natureza negativa característica da superfície celular das cianobactérias que normalmente se observa nas condições convencionais do tratamento de água (XIE *et al.*, 2016).

Essa configuração garante que espécies neutras e micromoleculares como o HClO , produzida pelo Cl_2 , possam permear a célula com pouco impedimento. Então, este HClO permeado pode danificar a membrana ou o sistema enzimático, diminuindo assim a viabilidade celular (OU *et al.*, 2011; ZHOU; SHAO; GAO; LI *et al.*, 2014). Dessa forma, esse mecanismo observado com Cl_2 pode explicar o aumento significativo de lise observado em *C. raciborskii*, a partir de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ desse oxidante o que não foi observado mesmo com $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KMnO_4 .

Para *D. circinale*, os efeitos foram muito mais severos do que para *C. raciborskii*, visto que a menor dosagem já reduziu para menos de 6 % as chances de células integras em após a mistura rápida ou lenta, usando GR (durante 60 s) e GL (durante 14 min). Assim como o observado na seção anterior, esse gênero parece ser mais susceptível aos estresses químicos provocados pela pré-oxidação.

Em estudos realizados por Fan *et al.*, 2013 com suspensão de *M. aeruginosa* foram testadas as concentrações 3, 4 e $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloro. Entre os resultados obtidos, tem-se que o cloro apresenta forte capacidade de prejudicar a integridade celular desta espécie em que houve relatos de comprometendo de mais de 88% das células no primeiro minuto. No presente estudo, observou-se redução de 68 e 78 % das células íntegras para as dosagens de 2 e $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Este fato permite afirmar que o cloro apresenta um elevado potencial de dano celular em diversas espécies de cianobactérias.

Assim, pressupõe que em escala real a aplicação de dosagens abaixo de $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KMnO_4 e $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cl_2 podem não propiciar liberação da MOA devido a lise celular. Com isso, espera-se uma redução de formação de subprodutos tais com THM ou ácidos

haloacéticos, bastante relatados na literatura (CAPELO NETO; NEYCOMBE, 2017; DALY; HO; BROOKES, 2007; QI *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2013, 2016; YANG; GUO; LEE, 2013).

Outro efeito potencializado pela ação dos oxidantes foi a redução do tricoma, conforme observado por (PESTANA *et al.*, 2018). Para *C. raciborskii* observou-se reduções significativa do comprimento do tricoma tanto na pré-oxidação usando KMnO_4 (onde não houveram eventos de lise significativos -Tabela 19) quanto usando Cl_2 ,em todas as concentrações. Todavia, ressalta-se que o tempo de contato elevado foi importante para redução de tricomas maiores Figura 7C e Figura 7D). Para *D. circinale*, verificou-se tendência similar ao observado para *C. raciborskii* apenas para tricomas maiores (tamanho médio 45 μm). O fato das cepas utilizadas apresentarem comprimento reduzido (tamanho médio 25 μm), as quebras dos tricomas não foram significantes mesma com pré-oxidação (Figura 11)

Jin *et al.* (2019) observou que taxa de degradação *C. raciborskii* foi notavelmente menor que a da MA sob as mesmas condições fotocatalíticas produtoras de $\bullet\text{OH}$, espécie oxidante mais potente do que o KMnO_4 e Cl_2 , visto que as células perderam suas integridade mais tarde e as concentrações de cilindrospermopsina precisaram de mais tempo para serem removidos.

Portanto, em superdosagens os oxidantes podem perdurar além da mistura lenta, chegando a etapas mais críticas de cisalhamento, tais como a filtração (PESTANA *et al.*, 2018). Isso pode representar aumentar o risco de mais eventos de lise nessas etapas subsequentes, o que pode elevar a liberação de MOI na água (potencialmente mais difícil de se degradar), potenciais precursores de SPD e contendo maior concentração de toxinas e composto organolépticos.

Com isso, dependendo da dosagem aplicada, a ação do oxidante pode continuar nas etapas subsequentes da ETA, descaracterizando o objetivo principal dessa tecnologia de auxiliar apenas a coagulação (DUGAN; SMITH; SANAN, 2018; XIE *et al.*, 2016). Esse fato implica na redução dos tricomas ou magnificação da chance de ocorrer lise celular.

3.5 Conclusão

- As recomendações para a mistura rápida sugeridas pelas normas americanas (ASCE, 1996; AWWA ,1998) e brasileira (NBR 12.216/1992) foram associadas aos eventos de lise celular e reduções de tricoma de *D. circinale*, mesmo utilizando valores de gradiente de velocidade próximos aos limites mínimos sugeridos (750 s^{-1}). Ressalta-se que os 60

s de mistura utilizados nos experimentos e proposto pelas normas americanas, podem ter intensificado os danosos dessas condições severas de mistura. Mesmo diante dessas circunstâncias, as cepas de *C. raciborskii* utilizadas não foram impactadas da mesma forma que as de *D. circinale*, mostrando-se imunes aos estresses hidráulicos ensaiados.

- Assumindo que cepas cultivadas provavelmente são mais susceptíveis aos estresses ensaiados do que os organismos encontrados *in natura*, quando *D. circinale* e *C. raciborskii* estiverem presentes na água bruta, os resultados obtidos apontam que os valores próximos aos limites máximos da NBR, AWWA e ASCE para a etapa de floculação (70 s^{-1} em 14 min) podem ser utilizados (na ausência de dados experimentais específicos) seguramente e possivelmente não ocasionarão infortúnios devido a liberação de metabólitos potencialmente tóxicos desses organismos, em consequência da lise.
- Na ausência de pré-oxidação, a maioria dos danos observados nos tricomas e na integridade celular dos organismos estudados ocorreram na etapa de mistura rápida. A luz das recomendações da NBR 12.216/1992, que recomenda curtos intervalos de tempo de mistura (até 5 s) gradientes mais elevados ($700\text{-}1100 \text{ s}^{-1}$), sugere-se um estudo detalhado da etapa de coagulação, a fim de se encontrar tanto um valor de gradiente e um tempo ótimo de mistura que permita a desestabilização destes organismos sem comprometê-los, principalmente na presença de *D. circinale*.
- A partir dos resultados obtidos nesse experimento, observou-se uma considerável fragilidade de *D. circinale* também em relação a etapa de pré-oxidação. Esse fato deve trazer um alerta para as companhias de saneamento. Pois ao observarem mananciais dominados por cepas tóxicas desse microrganismo, deve-se considerar a suspensão dessa operação ou, pelo menos, uma redução da dosagem administrada ($<1\text{mg/L}$).
- Há indícios que organismos com tricomas de menores do que $25 \mu\text{m}$ (5 células/tricoma) apresentam menores reduções de seus comprimentos quando expostos as condições de elevados gradientes de velocidade, fato também observado na presença dos oxidantes avaliados neste estudo.
- Ao se optar pela realização de pré-oxidação utilizando Cl_2 , recomenda-se, por precaução, ensaios prévios de tratabilidade visando observar os efeitos desse agente químico na integridade celular das cianobactérias presentes na água bruta, pois esse oxidante foi capaz de reduzir o comprimento do tricoma e comprometer a integridade celular de *C. raciborskii* (a partir de 2mg.L^{-1}) e *D. circinale* (a partir de 1mg.L^{-1}) significativamente.

Na impossibilidade de realização desses ensaios e na ausência de *D. circinale*, recomenda-se que se realize dosagens máxima de até 1 mg.L⁻¹ de Cl₂ na etapa de pré-oxidação, pois apesar da redução do tricoma, essa dosagem não exerceu redução significativa em *C. raciborskii*.

- Segundo as observações com o KMnO₄, esse pré-oxidante aparentemente não proporciona danos à integridade celular de *C. raciborskii*, apesar de reduzir significativamente o comprimento do tricoma dessa espécie. Assim, na ausência de *D. circinale*, a administração desse químico em dosagem inferior a 4 mg.L⁻¹ pode ser considerada em casos de dominância de cepas tóxicas desse organismo em água destinadas ao consumo humano.
- Adicionalmente, as cepas de *C. raciborskii* mostraram-se mais resistente do que as de *D. circinale* aos estresses das condições hidráulicas ensaiadas, na presença ou não dos pré-oxidantes utilizados. Dessa forma, uma vez que estudos apontam *D. circinale* como produtora de cianotoxinas e compostos organolépticos, alguns que a literatura não atribui à *C. raciborskii*, recomenda-se a utilização desse organismo como limitador das condições operacionais da pré-oxidação, coagulação e floculação da ETA.
- Recomenda-se que os projetos de ETA sejam flexíveis o bastante para que os operadores possam ajustar as condições operacionais (gradiente de velocidade e tempo de mistura) de acordo com as espécies de cianobactérias dominantes.

REFERÊNCIAS

- AGRESTI, A. **Categorical Data Analysis**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012. 721 p.
- APHA-AWWA-WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. In: APHA (Org.). 21th ed. New York: [s.n.], 2005.
- BAKHEET, B. *et al.* Electrochemical inactivation of *Cylindrospermopsis raciborskii* and removal of the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 344, p. 241–248, 2018. ISSN: 18733336, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.024.
- BYUN, S. *et al.* Improvement of coagulation efficiency using instantaneous flash mixer (IFM) for water treatment. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 268, n. 1–3, p. 104–110, 2005. ISSN: 09277757, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2005.06.027.
- CALANDRINO, E. S.; PAERL, H. W. Determining the potential for the proliferation of the harmful cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Currituck Sound, North Carolina. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 11, p. 1–9, 2011. ISBN: 15689883, ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2011.04.003.
- CALOMENI, A. J.; RODGERS, J. H. Evaluation of the utility of six measures for algal (*Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) viability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 111, p. 192–198, 2015. ISBN: 0147-6513, ISSN: 10902414, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.033.
- CAPELO NETO, J.; NEYCOMBE, G. Oxidação de cianobactérias e seus metabólitos em sistemas de tratamento de água: o estado da arte. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [s.l.], v. 22, n. 5, p. 829–840, 2017. ISSN: 1413-4152, DOI: 10.1590/s1413-41522017148174.
- CHAILAKHYAN, L. M. *et al.* Intercellular power transmission along trichomes of cyanobacteria. **BBA-Bioenergetics**, [s.l.], v. 679, n. 1, p. 60–67, 1982. ISSN: 00052728, DOI: 10.1016/0005-2728(82)90255-9.
- CHANG, Y.; BAI, Y.; QU, J. Does KMnO₄ preoxidation reduce the genotoxicity of disinfection by-products? **Chemosphere**, [s.l.], v. 163, p. 73–80, 2016. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.018.
- CHEN, J. J.; YEH, H. H.; TSENG, I. C. Effect of ozone and permanganate on algae coagulation removal - Pilot and bench scale tests. **Chemosphere**, [s.l.], v. 74, n. 6, p. 840–846, 2009. ISBN: 0045-6535, ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.10.009.
- CHERNOVA, E. *et al.* *Dolichospermum* and *Aphanizomenon* as neurotoxins producers in some Russian freshwaters. **Toxicon**, [s.l.], v. 130, p. 47–55, 2017. ISSN: 18793150, DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.02.016.
- CHO, M. *et al.* Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. **Water Research**, [s.l.], v. 38, n. 4, p. 1069–1077, 2004. ISBN: 0043-1354 (Print)r0043-1354 (Linking), ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2003.10.029.

DALY, R. I.; HO, L.; BROOKES, J. D. Effect of chlorination on *Microcystis aeruginosa* cell integrity and subsequent microcystin release and degradation. **Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 41, n. 12, p. 4447–4453, 2007. ISBN: 0013-936X (Print), ISSN: 0013936X, DOI: 10.1021/es070318s.

DAVIDSON, K. *et al.* Forecasting the risk of harmful algal blooms. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 53, p. 1–7, 2016. ISBN: 1878-1470 (Electronic) 1568-9883 (Linking), ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2015.11.005.

DREHER, T. W. *et al.* Anabaena/Dolichospermum as the source of lethal microcystin levels responsible for a large cattle toxicosis event. **Toxicon: X**, [s.l.], p. 100003, 2018. ISSN: 25901710, DOI: 10.1016/j.toxcx.2018.100003.

DUGAN, N. R.; SMITH, S. J.; SANAN, T. T. Impacts of Potassium Permanganate and Powdered Activated Carbon on Cyanotoxin Release. **Journal - American Water Works Association**, [s.l.], p. 1–12, 2018. ISSN: 0003150X, DOI: 10.1002/awwa.1125.

DZIALOWSKI, A. R. *et al.* Development of predictive models for geosmin-related taste and odor in Kansas, USA, drinking water reservoirs. **Water Research**, [s.l.], v. 43, n. 11, p. 2829–2840, 2009. ISBN: 0043-1354, ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2009.04.001.

EBIE, K.; AZUMA, Y. Reducing turbidity and coagulant residue in treated water through optimization of rapid mix conditions. **Water Science and Technology: Water Supply**, [s.l.], v. 2, n. 5–6, p. 103–110, 2002. ISSN: 16069749.

FAN, J.; HO, L. *et al.* Evaluating the effectiveness of copper sulphate , chlorine , potassium permanganate , hydrogen peroxide and ozone on cyanobacterial cell integrity. **Water Research** [s.l.], v. 7, 2013. DOI: 10.1016/j.watres.2013.05.057.

FAN, J.; DALY, R. *et al.* Impact of potassium permanganate on cyanobacterial cell integrity and toxin release and degradation. **Chemosphere**, [s.l.], v. 92, n. 5, p. 529–534, 2013. ISBN: 00456535 (ISSN), ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.03.022.

FAN, J. *et al.* The effects of various control and water treatment processes on the membrane integrity and toxin fate of cyanobacteria. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 264, p. 313–322, 2014. ISBN: 03043894 (ISSN), ISSN: 18733336, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.10.059.

_____. Impact of chlorine on the cell integrity and toxin release and degradation of colonial *Microcystis*. **Water Research**, [s.l.], v. 102, p. 394–404, 2016. ISBN: 0043-1354, ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2016.06.053.

FISHER, R. A. **Statistical Methods for Research Workers (originally published 1925, 14th ed., 1970)**. Edinburgh: Oliver & Boyd., 1934.

FLORES, E. *et al.* Septal Junctions in Filamentous Heterocyst-Forming Cyanobacteria. **Trends in Microbiology**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 79–82, 2016. ISBN: 1878-4380 (Electronic)r0966-842X (Linking), ISSN: 18784380, DOI: 10.1016/j.tim.2015.11.011.

GENUÁRIO, D. B. *et al.* Cyanobacteria From Brazilian Extreme Environments. **Microbial Diversity in the Genomic Era**, [s.l.], p. 265–284, 2019. ISBN: 9780128148495, DOI: 10.1016/B978-0-12-814849-5.00016-2.

GILOLO, S. R. **Introdução à análise de dados categóricos com aplicações**. São Paulo: Blucher, 2017. 256 p.

GORHAM, P. R. *et al.* Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **SIL Proceedings, 1922-2010**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 796–804, 1964. ISBN: 1531-8249, ISSN: 0368-0770, DOI: 10.1080/03680770.1962.11895606.

HO, L. *et al.* Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues. **Water Research**, [s.l.], v. 40, n. 6, p. 1200–1209, 2006. ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2006.01.030.

HOFF-RISSETI, C. *et al.* Cylindrospermopsin and Saxitoxin Synthetase Genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains from Brazilian Freshwater. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 8, n. 8, p. 35–39, 2013. ISBN: 1932-6203, ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0074238.

JARVIS, P. *et al.* A review of floc strength and breakage. **Water Research**, [s.l.], v. 39, n. 14, p. 3121–3137, 2005. ISBN: 0043-1354 (Print)r0043-1354 (Linking), ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2005.05.022.

JIAN, Z. *et al.* Removal of micropollutants and cyanobacteria from drinking water using KMnO₄ pre-oxidation coupled with bioaugmentation. **Chemosphere**, [s.l.], v. 215, p. 1–7, 2019. ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.013.

JIN, Y. *et al.* Application of N-TiO₂ for visible-light photocatalytic degradation of *Cylindrospermopsis raciborskii* — More difficult than that for photodegradation of *Microcystis aeruginosa*? **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 245, p. 642–650, 2019. ISSN: 02697491, DOI: 10.1016/j.envpol.2018.11.056.

KOMÁREK, J.; JOHANSEN, J. R. Filamentous Cyanobacteria. **Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification**. [s.l.]: [s.n.], 2015. 135-235 p. ISBN: 9780123858771, ISSN: 0029-8549, DOI: 10.1016/B978-0-12-385876-4.00004-9.

LI, H. *et al.* Behavior of *Cylindrospermopsis raciborskii* during coagulation and sludge storage – higher potential risk of toxin release than *Microcystis aeruginosa*? **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 347, p. 307–316, 2018. ISSN: 18733336, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.01.009.

LI, L. *et al.* Kinetics of cell inactivation, toxin release, and degradation during permanganation of *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 48, n. 5, p. 2885–2892, 2014. ISBN: 1520-5851 (Electronic)r0013-936X (Linking), ISSN: 15205851, DOI: 10.1021/es405014g.

_____. Kinetics and mechanism of *Pseudoanabaena* cell inactivation, 2-MIB release and degradation under exposure of ozone, chlorine and permanganate. **Water Research**, [s.l.], v. 147, p. 422–428, 2018. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2018.10.023.

LI, X.; DREHER, T. W.; LI, R. An overview of diversity, occurrence, genetics and toxin production of bloom-forming *Dolichospermum* (*Anabaena*) species. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 54, p. 54–68, 2016. ISBN: 1568-9883, ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2015.10.015.

LIN, J. L. *et al.* Pretreatment of algae-laden and manganese-containing waters by oxidation-assisted coagulation: Effects of oxidation on algal cell viability and manganese precipitation.

Water Research, [s.l.], v. 89, p. 261–269, 2016. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2015.11.042.

_____. Algal removal from cyanobacteria-rich waters by preoxidation-assisted coagulation–flotation: Effect of algogenic organic matter release on algal removal and trihalomethane formation. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s.l.], v. 63, p. 147–155, 2018. ISSN: 18787320, DOI: 10.1016/j.jes.2017.02.007.

LIN, J. L.; PAN, J. R.; HUANG, C. Enhanced particle destabilization and aggregation by flash-mixing coagulation for drinking water treatment. **Separation and Purification Technology**, [s.l.], v. 115, p. 145–151, 2013. ISBN: 1383-5866, ISSN: 13835866, DOI: 10.1016/j.seppur.2013.05.013.

LIN, T. F. *et al.* Effect of chlorination on the cell integrity of two noxious cyanobacteria and their releases of odorants. **Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA**, [s.l.], v. 58, n. 8, p. 539–551, 2009. ISBN: 0003-7214, ISSN: 00037214, DOI: 10.2166/aqua.2009.117.

LIU, Y. *et al.* Genetic analysis on Dolichospermum (Cyanobacteria; sensu Anabaena) populations based on the culture-independent clone libraries revealed the dominant genotypes existing in Lake Taihu, China. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 31, p. 76–81, 2014. ISBN: 1568-9883, ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2013.09.012.

LÜRLING, M. *et al.* **Critical assessment of chitosan as coagulant to remove cyanobacteria.** **Harmful Algae**, [s.l.], v. 66, p. 1–12, 2017. ISSN: 18781470, DOI: 10.1016/j.hal.2017.04.011.

MA, M. *et al.* Effect of moderate pre-oxidation on the removal of *Microcystis aeruginosa* by KMnO₄-Fe(II) process: Significance of the in-situ formed Fe(III). **Water Research**, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 73–81, 2012. ISBN: 00431354 (ISSN), ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2011.10.022.

MARKELOVA, A. G.; VLADIMIROVA, M. G.; KUPTSOVA, E. S. A comparison of cytochemical methods for the rapid evaluation of microalgal viability. **Russian Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 47, n. 6, p. 815–819, 2000. ISBN: 1021-4437, ISSN: 10214437, DOI: 10.1023/A:1026619514661.

MCNEMAR, Q. Note on the sampling error of the differences between correlated estimators of the odds ratio. **Biometrika**, [s.l.], v. 65, n. 2, p. 191–202, 2002.

MOHAMMED, T. J.; SHAKIR, E. Effect of settling time, velocity gradient, and camp number on turbidity removal for oilfield produced water. **Egyptian Journal of Petroleum**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 31–36, 2018. ISSN: 20902468, DOI: 10.1016/j.ejpe.2016.12.006.

MOISANDER, P. H. *et al.* Small-scale shear effects on heterocystous cyanobacteria. **Limnology and Oceanography**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 108–119, 2002. ISBN: 0024-3590, ISSN: 00243590, DOI: 10.4319/lo.2002.47.1.0108.

MUCCI, M. *et al.* Chitosan as coagulant on cyanobacteria in lake restoration management may cause rapid cell lysis. **Water Research**, [s.l.], v. 118, p. 121–130, 2017. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2017.04.020.

NACERADSKA, J. *et al.* The impact of pre-oxidation with potassium permanganate on cyanobacterial organic matter removal by coagulation. **Water Research**, [s.l.], v. 114, p. 42–49, 2017. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2017.02.029.

OLEA-POPELKA, F.; ROSEN, L. E. A Practical Guide for Statistics in Wildlife Studies. **Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy**, v. 9. [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. 21-27 p. DOI: 10.1016/B978-0-323-55228-8.00005-9.

OU, H. *et al.* Mechanistic studies of Microcystic aeruginosa inactivation and degradation by UV-C irradiation and chlorination with poly-synchronous analyses. **Desalination**, [s.l.], v. 272, n. 1–3, p. 107–119, 2011. ISBN: 0011-9164, ISSN: 00119164, DOI: 10.1016/j.desal.2011.01.014.

_____. Immediate and long-term impacts of potassium permanganate on photosynthetic activity, survival and microcystin-LR release risk of *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 219–220, p. 267–275, 2012. ISBN: 8602165986, ISSN: 03043894, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.04.006.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Principios de bioestatística**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 506 p.

PEREYRA, J. P. A. *et al.* Molecular and morphological survey of saxitoxin-producing cyanobacterium *Dolichospermum circinale* (*Anabaena circinalis*) isolated from geographically distinct regions of Australia. **Toxicon**, [s.l.], v. 138, p. 68–77, 2017. ISSN: 18793150, DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.08.006.

PESTANA, C. J. *et al.* The effect of water treatment unit processes on cyanobacterial trichome integrity. **Science of The Total Environment**, [s.l.], p. #pagerange#, 2018. ISSN: 00489697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.337.

PLACKETT, R. L. Karl Pearson and the Chi-squared Test. **International Statistical Review / Revue Internationale De Statistique**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 59–72, 1983. DOI: 10.2307/1402731.

QI, J. *et al.* Prechlorination of algae-laden water: The effects of transportation time on cell integrity, algal organic matter release, and chlorinated disinfection byproduct formation. **Water Research**, [s.l.], v. 102, p. 221–228, 2016. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2016.06.039.

RAMPHAL, S.; MUZI SIBIYA, S. Optimization of time requirement for rapid mixing during coagulation using a photometric dispersion analyzer. **Procedia Engineering**, [s.l.], v. 70, p. 1401–1410, 2014. ISSN: 18777058, DOI: 10.1016/j.proeng.2014.02.155.

RIZZO, L. The Contribution of the Coagulation Process in Controlling Microbial Risk and Disinfection By-products Formation in Drinking Water. **The Role of Colloidal Systems in Environmental Protection**. Salerno: Elsevier B.V., 2014. p. 219–238. ISBN: 9780444632838, DOI: 10.1016/B978-0-444-63283-8.00009-0.

SANT'ANNA, C. L. *et al.* Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras. **Instituto de Botânica**, [s.l.], p. 175, 2012. ISBN: 978-85-7523-040-4, DOI: 10.13140/2.1.4417.1208.

SHI, X. *et al.* A comparison of trichloromethane formation from two algae species during two pre-oxidation-coagulation-chlorination processes. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 656, p. 1063–1070, 2019. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.461.

SKOOG *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. In: THOMSON (Org.). 8ª ed. São Paulo: Thomson, 2005. 1026 p.

SRINIVASAN, R.; SORIAL, G. A. Treatment of taste and odor causing compounds 2-methyl isoborneol and geosmin in drinking water: A critical review. **Journal of Environmental Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 1–13, 2011. ISBN: 10010742, ISSN: 10010742, DOI: 10.1016/S1001-0742(10)60367-1.

STEBEGG, R.; SCHMETTERER, G.; ROMPEL, A. Transport of organic substances through the cytoplasmic membrane of cyanobacteria. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 157, n. August 2018, p. 206–218, 2019. ISSN: 00319422, DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.08.013.

VADASARUKKAI, Y. S.; GAGNON, G. A. Application of low-mixing energy input for the coagulation process. **Water Research**, [s.l.], v. 84, p. 333–341, 2015. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2015.07.049.

WANG, L. *et al.* Pre-oxidation with KMnO₄ changes extra-cellular organic matter's secretion characteristics to improve algal removal by coagulation with a low dosage of polyaluminium chloride. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 452–459, 2013. ISBN: 978-953-307-713-0, ISSN: 10010742, DOI: 10.1016/S1001-0742(12)60087-4.

WATANABE, Y. Flocculation and me. **Water Research**, [s.l.], v. 114, p. 88–103, 2017. ISBN: 8625835872, ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2016.12.035.

WILLIS, A. *et al.* Intraspecific variation in growth, morphology and toxin quotas for the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Toxicon**, [s.l.], v. 119, p. 307–310, 2016. ISBN: 1879-3150 (Electronic)0041-0101 (Linking), ISSN: 18793150, DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.07.005.

_____. Genome variation in nine co-occurring toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 73, p. 157–166, 2018. ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2018.03.001.

XIE, P. *et al.* Comparison of permanganate preoxidation and preozonation on algae containing water: Cell integrity, characteristics, and chlorinated disinfection byproduct formation. **Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 47, n. 24, p. 14051–14061, 2013. ISBN: 8620841106, ISSN: 0013936X, DOI: 10.1021/es4027024.

_____. A mini review of preoxidation to improve coagulation. **Chemosphere**, [s.l.], v. 155, p. 550–563, 2016. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.003.

YANG, X.; GUO, W.; LEE, W. Formation of disinfection byproducts upon chlorine dioxide preoxidation followed by chlorination or chloramination of natural organic matter. **Chemosphere**, [s.l.], v. 91, n. 11, p. 1477–1485, 2013. ISBN: 1879-1298 (Electronic)n0045-6535 (Linking), ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.12.014.

YATES, F. Contingency Tables Involving Small Numbers and the χ^2 Test. **Journal of the Royal Statistical Society**, [s.l.], v. 93, n. 1, p. 217–235, 1934.

ZHANG, Z. *et al.* Effects of slow-mixing on the coagulation performance of polyaluminum chloride (PACl). **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 318–323, 2013. ISBN: 1004-9541, ISSN: 10049541, DOI: 10.1016/S1004-9541(13)60463-2.

ZHOU, S.; SHAO, Y.; GAO, N.; LI, L. *et al.* Effect of chlorine dioxide on cyanobacterial cell integrity, toxin degradation and disinfection by-product formation. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 482–483, n. 1, p. 208–213, 2014. ISBN: 1879-1026 (Electronic)r0048-9697 (Linking), ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.007.

ZHOU, S.; SHAO, Y.; GAO, N.; ZHU, S. *et al.* Removal of *Microcystis aeruginosa* by potassium ferrate (VI): Impacts on cells integrity, intracellular organic matter release and disinfection by-products formation. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 251, p. 304–309, 2014. ISSN: 13858947, DOI: 10.1016/j.cej.2014.04.081.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS

Uma vez que os experimentos foram realizados com cepas cultivadas em laboratório diluídas em uma matriz com concentração de matéria orgânica (em suspensão e dissolvida) menor do que aquela que normalmente se encontra em água bruta, as condições ensaiadas de pré-oxidação foram mais severas do que aquelas realizadas em um ETA real (utilizando as mesmas condições experimentais). Mesmo assim, as cepas de *C. raciborskii* mostraram-se resistentes tanto às condições hidráulicas (750 s^{-1} durante 60 s e 70 s^{-1} durante 14 min) quanto a determinados estresses químicos (1 mg.L^{-1} de Cl_2 e 1, 2 ou 4 mg.L^{-1} de KMnO_4). Esse fato diverge do ocorrido com *D. circinale*, o que pode sinalizar uma alerta para as companhias de saneamento em caso de florações dessa espécie, uma vez que não foram encontrados nem condições hidráulicas e nem concentração de oxidante que não reduzisse as chances de células íntegras de *D. circinale* nesse experimento.

Paralelamente, a etapa da coagulação apresentou-se como a mais crítica na ausência de pré-oxidação. Isso sinaliza que estudos em busca das condições ótimas para essa etapa devem ser realizados, utilizando, com já assinalado, *D. circinale* com organismo limitador das condições operacionais. Ressalta-se que outras cianobactérias poderiam também ter características similares às observadas nessas cepas, reiterando a necessidade de outros estudos similares.

Os fatos observados indicam que as normas internacionais devem considerar a presença de cianobactérias nos mananciais destinados para o consumo humano para a sugestão mais correta de valores de gradiente de velocidade e tempo de mistura tanto para projeto quanto operação das ETA. Na falta de desses valores, sugere-se a realização de ensaios de tratabilidade recorrentes, em sintonia com monitoramento da presença desses organismos geralmente realizado nas estações, com o intuito de adequar a estação às limitações das cepas mais sensíveis e potencialmente tóxicas, tais como *D. circinale*.

Salienta-se ainda que possíveis complicações na desestabilização desses organismos devido a condições hidráulicas mais brandas durante a mistura rápida poderiam ser contornadas, em parte, na floculação, visto que não se registrou nesta fase reduções significativas de tricomas e nem das chances de células íntegras. Todavia, em caso de superdosagens de pré-oxidantes, os longos tempos de contato e os baixos gradientes de velocidade característicos dessa etapa podem promover uma condição próxima à mistura completa, tornando a mistura lenta tão crítica para esses organismos quanto a coagulação.

Como em todas as concentrações de ambos os oxidantes reduziram demasiadamente as chances de células íntegras em *D. circinale* em todos os cenários de comparação, estudos com cepas coletadas e isoladas da água *in natura* poderiam ser realizados e comparados aos resultados encontrados aqui, afim de se confirmar o comportamento diferenciado desses organismos observado durante os ensaios.

Devido a sua cinética, o KMnO_4 apresentou durante os experimentos um elevado residual. Uma vez que soluções com baixas concentração desse pré-oxidante (de acordo com Skoog *et al.* (2005), acrescentando-se 0,01-0,02 mL de uma solução $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ de KMnO_4 a 100 mL de água, pode-se perceber a cor característica desse oxidante) uma cor púrpura característica pode ser observada, fato observado em todos os experimentos realizado, esse residual pode comprometer o tratamento e inviabilizar seu uso. Assim, recomenda-se a realização de ensaios com amostra naturais, com a finalidade de observar possíveis alterações de cor, uma vez que não foram encontrados estudos que mencionassem esse problema.

Mesmo com a flexibilização do teste exato de Fisher no que diz respeito ao tamanho da amostra e a possibilidade de células com baixa frequência (menores do que 5), em trabalhos futuros, recomenda-se técnicas mais avançadas de aprendizagem de máquina e reconhecimento de imagem para que se possa aumentar o tamanho da amostra e assim o poder dos testes estatísticos.

Apesar da evidente sensibilidade das cepas de *D. circinale* às condições experimentais ensaiadas na presença de pré-oxidação, não se mensurou o quanto as chances de células íntegras em *C. raciborskii* são maiores do que as observadas nessa espécie, assim como o realizado apenas para as condições hidráulicas no item 2.3.2. Portanto, em trabalhos futuros, pode-se utilizar a abordagem multivariada (e.g. modelo de regressão logística) para determinar essas chances. Contudo, devido ao “excesso de zeros”, provenientes tanto do comportamento característicos de *C. raciborskii* (elevadas resistências) quanto de *D. circinale* (elevada susceptibilidade aos estresses químicos), alguns contratemplos podem ser esperados, a exemplo do que ocorreu na abordagem tradicional, onde os dados tiverem que ser transformados para se contornar problemas de indeterminação dos intervalos de confiança. Portanto, para o modelo de regressão logístico, esse excesso pode comprometer o ajuste, causando problemas como a subestimação dos erros padrão dos coeficientes estimados e o consequente aumento do p-valor associado aos parâmetros do modelo, produzindo inferências pouco confiáveis.

REFERÊNCIAS

AGRESTI, A. **Categorical Data Analysis**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012. 721 p.

ALCÁNTARA, I. et al. Toxic and non-toxic strains of *Microcystis aeruginosa* induce temperature dependent allelopathy toward growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 48, n. April, p. 20–27, 2017. ISBN: 1568-9883, ISSN: 01677012, DOI: 10.1016/j.hal.2015.07.002.

APHA-AWWA-WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. In: APHA (Org.). 21th ed. New York: [s.n.], 2005.

AUNG, M. T. et al. Preterm birth in relation to the bisphenol A replacement, bisphenol S, and other phenols and parabens. **Environmental Research**, [s.l.], v. 169, n. June 2018, p. 131–138, 2019. ISSN: 10960953, DOI: 10.1016/j.envres.2018.10.037.

BAKER, E. B.; SHOWERS, W. J. Hysteresis analysis of nitrate dynamics in the Neuse River, NC. **Science of the Total Environment journal**, [s.l.], v. 652, n. 8, p. 889–899, 2019. ISSN: 0048-9697, DOI: 10.1016/J.SCITOTENV.2018.10.254.

BAKHEET, B. et al. Electrochemical inactivation of *Cylindrospermopsis raciborskii* and removal of the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 344, p. 241–248, 2018. ISSN: 18733336, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.024.

BARROS, M. U. G. et al. Impact of filamentous cyanobacteria on the water quality of two tropical reservoirs. **Brazilian Journal of Water Resources**, [s.l.], v. 22, n. 6, 2017.

BILDER, C. R.; LOUGHIN, T. M. **Analysis of categorical data with R**. New York: CRC Press, 2015. 547 p. ISBN: 9781498706766.

BYUN, S. et al. Improvement of coagulation efficiency using instantaneous flash mixer (IFM) for water treatment. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 268, n. 1–3, p. 104–110, 2005. ISSN: 09277757, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2005.06.027.

CALANDRINO, E. S.; PAERL, H. W. Determining the potential for the proliferation of the

harmful cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Currituck Sound, North Carolina. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 11, p. 1–9, 2011. ISBN: 15689883, ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2011.04.003.

CALOMENI, A. J.; JR, J. H. R. Ecotoxicology and Environmental Safety Evaluation of the utility of six measures for algal (*Microcystis aeruginosa* , *Planktothrix agardhii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) viability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 111, p. 192–198, 2015. ISSN: 0147-6513, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.033.

CAPDEVILLE, C. et al. Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on fauna and vegetation in a mangrove ecosystem. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 129, n. 1, p. 379–391, 2018. ISSN: 18793363, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.02.035.

CAPELLI, C. et al. Biogeography of bloom-forming microcystin producing and non-toxicogenic populations of *Dolichospermum lemmermannii* (Cyanobacteria). **Harmful Algae**, [s.l.], v. 67, p. 1–12, 2017. ISSN: 18781470, DOI: 10.1016/j.hal.2017.05.004.

CAPELO NETO, J.; NEYCOMBE, G. Oxidação de cianobactérias e seus metabólitos em sistemas de tratamento de água: o estado da arte. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [s.l.], v. 22, n. 5, p. 829–840, 2017. ISSN: 1413-4152, DOI: 10.1590/s1413-41522017148174.

CARMICHAEL, W. W.; BOYER, G. L. Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 54, p. 194–212, 2016. ISBN: 1878-1470, ISSN: 18781470, DOI: 10.1016/j.hal.2016.02.002.

CEPOI, L. Environmental and Technological Stresses and Their Management in Cyanobacteria. **Cyanobacteria**, [s.l.], p. 217–244, 2019. ISBN: 9780128146675, DOI: 10.1016/B978-0-12-814667-5.00011-8.

CHAILAKHYAN, L. M. et al. Intercellular power transmission along trichomes of cyanobacteria. **BBA - Bioenergetics**, [s.l.], v. 679, n. 1, p. 60–67, 1982. ISSN: 00052728, DOI: 10.1016/0005-2728(82)90255-9.

CHANG, Y.; BAI, Y.; QU, J. Does KMnO₄ preoxidation reduce the genotoxicity of disinfection

by-products? **Chemosphere**, [s.l.], v. 163, p. 73–80, 2016. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.018.

CHEN, J. J.; YEH, H. H.; TSENG, I. C. Effect of ozone and permanganate on algae coagulation removal - Pilot and bench scale tests. **Chemosphere**, [s.l.], v. 74, n. 6, p. 840–846, 2009. ISBN: 0045-6535, ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.10.009.

CHERNOVA, E. et al. Dolichospermum and Aphanizomenon as neurotoxins producers in some Russian freshwaters. **Toxicon**, [s.l.], v. 130, p. 47–55, 2017. ISSN: 18793150, DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.02.016.

CHISWELL, R. K. et al. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, cylindrospermopsis raciborskii: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. **Environmental Toxicology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 155–161, 1999. ISBN: 1520-4081, ISSN: 15204081, DOI: 10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<155::AID-TOX20>3.0.CO;2-Z.

CHO, M. et al. Linear correlation between inactivation of E. coli and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. **Water Research**, [s.l.], v. 38, n. 4, p. 1069–1077, 2004. ISBN: 0043-1354 (Print)r0043-1354 (Linking), ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2003.10.029.

CORAL, L. A. et al. Oxidation of Microcystis aeruginosa and Anabaena flos-aquae by ozone: Impacts on cell integrity and chlorination by-product formation. **Water Research**, [s.l.], v. 47, n. 9, p. 2983–2994, 2013. ISBN: 0043-1354, ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2013.03.012.

COSTA, I. a S. et al. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. **Brazilian journal of biology**, [s.l.], v. 66, n. 1B, p. 211–219, 2006. ISBN: 1519-6984 (Print)r1519-6984 (Linking), ISSN: 1519-6984, DOI: 10.1590/S1519-69842006000200005.

CRIDER, Y. et al. Can you taste it? Taste detection and acceptability thresholds for chlorine residual in drinking water in Dhaka, Bangladesh. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 613–614, p. 840–846, 2018. ISBN: 00489697 (ISSN), ISSN: 18791026, DOI:

10.1016/j.scitotenv.2017.09.135.

DALY, R. I.; HO, L.; BROOKES, J. D. Effect of chlorination on *Microcystis aeruginosa* cell integrity and subsequent microcystin release and degradation. **Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 41, n. 12, p. 4447–4453, 2007. ISBN: 0013-936X (Print), ISSN: 0013936X, DOI: 10.1021/es070318s.

DAVIDSON, K. et al. Forecasting the risk of harmful algal blooms. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 53, p. 1–7, 2016. ISBN: 1878-1470 (Electronic) 1568-9883 (Linking), ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2015.11.005.

DÍEZ-QUIJADA, L. et al. Microcystin-RR: Occurrence, content in water and food and toxicological studies. A review. **Environmental Research**, [s.l.], v. 168, n. April 2018, p. 467–489, 2019. ISSN: 10960953, DOI: 10.1016/j.envres.2018.07.019.

DREHER, T. W. et al. *Anabaena/Dolichospermum* as the source of lethal microcystin levels responsible for a large cattle toxicosis event. **Toxicon: X**, [s.l.], p. 100003, 2018. ISSN: 25901710, DOI: 10.1016/j.toxcx.2018.100003.

DUGAN, N. R.; SMITH, S. J.; SANAN, T. T. Impacts of Potassium Permanganate and Powdered Activated Carbon on Cyanotoxin Release. **Journal - American Water Works Association**, [s.l.], p. 1–12, 2018. ISSN: 0003150X, DOI: 10.1002/awwa.1125.

DZIALOWSKI, A. R. et al. Development of predictive models for geosmin-related taste and odor in Kansas, USA, drinking water reservoirs. **Water Research**, [s.l.], v. 43, n. 11, p. 2829–2840, 2009. ISBN: 0043-1354, ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2009.04.001.

EBIE, K.; AZUMA, Y. Reducing turbidity and coagulant residue in treated water through optimization of rapid mix conditions. **Water Science and Technology: Water Supply**, [s.l.], v. 2, n. 5–6, p. 103–110, 2002. ISSN: 16069749.

EGOROV, A. I. et al. Application of a salivary immunoassay in a prospective community study of waterborne infections. **Water Research**, [s.l.], v. 142, p. 289–300, 2018. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2018.05.030.

FAN, J.; HO, L. et al. Evaluating the effectiveness of copper sulphate , chlorine , potassium permanganate , hydrogen peroxide and ozone on cyanobacterial cell integrity. **Chemosphere**, [s.l.], v. 7, 2013. DOI: 10.1016/j.watres.2013.05.057.

FAN, J.; DALY, R. et al. Impact of potassium permanganate on cyanobacterial cell integrity and toxin release and degradation. **Chemosphere**, [s.l.], v. 92, n. 5, p. 529–534, 2013. ISBN: 00456535 (ISSN), ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.03.022.

FAN, J. et al. The effects of various control and water treatment processes on the membrane integrity and toxin fate of cyanobacteria. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 264, p. 313–322, 2014. ISBN: 03043894 (ISSN), ISSN: 18733336, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.10.059.

_____. Impact of chlorine on the cell integrity and toxin release and degradation of colonial *Microcystis*. **Water Research**, [s.l.], v. 102, p. 394–404, 2016. ISBN: 0043-1354, ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2016.06.053.

_____. Evaluation of potassium ferrate as an alternative disinfectant on cyanobacteria inactivation and associated toxin fate in various waters. **Water Research**, [s.l.], v. 129, p. 199–207, 2018. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2017.11.026.

FISHER, R. A. **Statistical Methods for Research Workers (originally published 1925, 14th ed., 1970)**. Edinburgh: Oliver & Boyd., 1934.

FLORES, E. et al. Septal Junctions in Filamentous Heterocyst-Forming Cyanobacteria. **Trends in Microbiology**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 79–82, 2016. ISBN: 1878-4380 (Electronic)r0966-842X (Linking), ISSN: 18784380, DOI: 10.1016/j.tim.2015.11.011.

GARCÍA-PÉREZ, J. et al. Risk of neuroblastoma and residential proximity to industrial and urban sites: A case-control study. **Environment International**, [s.l.], v. 92–93, p. 269–275, 2016. ISBN: 0160-4120, ISSN: 18736750, DOI: 10.1016/j.envint.2016.04.023.

GENUÁRIO, D. B. et al. Cyanobacteria From Brazilian Extreme Environments. **Microbial Diversity in the Genomic Era**, [s.l.], p. 265–284, 2019. ISBN: 9780128148495, DOI:

10.1016/B978-0-12-814849-5.00016-2.

GIOLO, S. R. **Introdução à análise de dados categóricos com aplicações**. São Paulo: Blucher, 2017. 256 p.

GORHAM, P. R. et al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **SIL Proceedings, 1922-2010**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 796–804, 1964. ISBN: 1531-8249, ISSN: 0368-0770, DOI: 10.1080/03680770.1962.11895606.

GREENFIELD, D. I. et al. The Effects of Three Chemical Algaecides on Cell Numbers and Toxin Content of the Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Anabaenopsis* sp. **Environmental Management**, [s.l.], v. 54, n. 5, p. 1110–1120, 2014. ISSN: 14321009, DOI: 10.1007/s00267-014-0339-2.

HARRISON, M. et al. Smart growth and the septic tank: Wastewater treatment and growth management in the Baltimore region. **Land Use Policy**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 483–492, 2012. ISBN: 0264-8377, ISSN: 02648377, DOI: 10.1016/j.landusepol.2011.08.007.

HE, X. et al. Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment. **Harmful Algae journal**, [s.l.], v. 54, p. 174–193, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.001>.

HERBERT, R. A. Methods for Enumerating Microorganisms and Determining Biomass in Natural Environments. **Methods in Microbiology**, [s.l.], v. 22, n. C, p. 1–39, 1990. ISBN: 0-12-521522-3, ISSN: 05809517, DOI: 10.1016/S0580-9517(08)70238-1.

HO, L. et al. Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues. **Water Research**, [s.l.], v. 40, n. 6, p. 1200–1209, 2006. ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2006.01.030.

_____. Fate of cyanobacteria and their metabolites during water treatment sludge management processes. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 424, p. 232–238, 2012. ISBN: 1879-1026 (Electronic)r0048-9697 (Linking), ISSN: 00489697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.02.025.

HOFF-RISSETI, C. et al. Cyndrospermopsin and Saxitoxin Synthetase Genes in *Cyndrospermopsis raciborskii* Strains from Brazilian Freshwater. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 8, n. 8, p. 35–39, 2013. ISBN: 1932-6203, ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0074238.

HOTHORN, T.; EVERITT, B. S. **A handbook of statistical analyses using R**. [s.l.]: Chapman and Hall/CRC, 2014.

HUSSAIN, S. et al. Coagulation of dissolved organic matter in surface water by novel titanium (III) chloride: Mechanistic surface chemical and spectroscopic characterisation. **Separation and Purification Technology**, [s.l.], v. 213, n. September 2018, p. 213–223, 2019. ISSN: 18733794, DOI: 10.1016/j.seppur.2018.12.038.

JAJA-CHIMEDZA, A. et al. Identification of teratogenic polymethoxy-1-alkenes from *Cyndrospermopsis raciborskii*, and taxonomically diverse freshwater cyanobacteria and green algae. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 49, p. 156–161, 2015. ISBN: 1568-9883, ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2015.09.010.

JARVIS, P. et al. A review of floc strength and breakage. **Water Research**, [s.l.], v. 39, n. 14, p. 3121–3137, 2005. ISBN: 0043-1354 (Print)r0043-1354 (Linking), ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2005.05.022.

JIAN, Z. et al. Removal of micropollutants and cyanobacteria from drinking water using KMnO₄ pre-oxidation coupled with bioaugmentation. **Chemosphere**, [s.l.], v. 215, p. 1–7, 2019. ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.013.

JIN, Y. et al. Application of N-TiO₂ for visible-light photocatalytic degradation of *Cyndrospermopsis raciborskii* — More difficult than that for photodegradation of *Microcystis aeruginosa* ?. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 245, p. 642–650, 2019. ISSN: 02697491, DOI: 10.1016/j.envpol.2018.11.056.

KAN, C.; HUANG, C.; PAN, J. R. Time requirement for rapid-mixing in coagulation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 203, n. 1–3, p. 1–9, 2002. ISBN: 0927-7757, ISSN: 09277757, DOI: 10.1016/S0927-7757(01)01095-0.

KIM, C. et al. Removal of geosmin and 2-methylisoboneol (2-MIB) by membrane system combined with powdered activated carbon (PAC) for drinking water treatment. **Journal of Water Process Engineering**, [s.l.], v. 4, n. C, p. 91–98, 2014. ISSN: 22147144, DOI: 10.1016/j.jwpe.2014.09.006.

KOHLHARDT-FLOEHR, C. et al. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation - Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 101, n. 1, p. 97–102, 2010. ISBN: 1873-2682 (Electronic)r1011-1344 (Linking), ISSN: 10111344, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2010.06.017.

KOMÁREK, J.; JOHANSEN, J. R. Filamentous Cyanobacteria. **Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification**. [s.l.]: [s.n.], 2015. 135-235 p. ISBN: 9780123858771, ISSN: 0029-8549, DOI: 10.1016/B978-0-12-385876-4.00004-9.

KUBÍČKOVÁ, B. et al. Effects of cylindrospermopsin on cultured immortalized human airway epithelial cells. **Chemosphere**, [s.l.], 2018. ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.12.157.

LI, D.; LIU, S. Water Quality Early Warnings. **Water Quality Monitoring and Management**. [s.l.]: [s.n.], 2019. p. 199–210. ISBN: 9780128113301, DOI: 10.1016/B978-0-12-811330-1.00006-5.

LI, H. et al. Behavior of *Cylindrospermopsis raciborskii* during coagulation and sludge storage – higher potential risk of toxin release than *Microcystis aeruginosa*? **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 347, p. 307–316, 2018. ISSN: 18733336, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.01.009.

LI, L. et al. Kinetics of cell inactivation, toxin release, and degradation during permanganation of *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 48, n. 5, p. 2885–2892, 2014. ISBN: 1520-5851 (Electronic)r0013-936X (Linking), ISSN: 15205851, DOI: 10.1021/es405014g.

_____. Kinetics and mechanism of *Pseudoanabaena* cell inactivation, 2-MIB release and degradation under exposure of ozone, chlorine and permanganate. **Water Research**, [s.l.], v.

147, p. 422–428, 2018. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2018.10.023.

_____. Sulfate radical-based technology for the removal of 2-methylisoborneol and 2-methylisoborneol-producing algae in drinking water sources. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 356, n. May 2018, p. 43–52, 2019. ISSN: 13858947, DOI: 10.1016/j.cej.2018.08.180.

LI, X.; DREHER, T. W.; LI, R. An overview of diversity, occurrence, genetics and toxin production of bloom-forming *Dolichospermum* (*Anabaena*) species. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 54, p. 54–68, 2016. ISBN: 1568-9883, ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2015.10.015.

LIN, J. L. et al. Pretreatment of algae-laden and manganese-containing waters by oxidation-assisted coagulation: Effects of oxidation on algal cell viability and manganese precipitation. **Water Research**, [s.l.], v. 89, p. 261–269, 2016. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2015.11.042.

_____. Algal removal from cyanobacteria-rich waters by preoxidation-assisted coagulation–flotation: Effect of algogenic organic matter release on algal removal and trihalomethane formation. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s.l.], v. 63, p. 147–155, 2018. ISSN: 18787320, DOI: 10.1016/j.jes.2017.02.007.

LIN, J. L.; HUANG, C.; WANG, W. M. Effect of cell integrity on algal destabilization by oxidation-assisted coagulation. **Separation and Purification Technology**, [s.l.], v. 151, p. 262–268, 2015. ISSN: 18733794, DOI: 10.1016/j.seppur.2015.07.064.

LIN, J. L.; PAN, J. R.; HUANG, C. Enhanced particle destabilization and aggregation by flash-mixing coagulation for drinking water treatment. **Separation and Purification Technology**, [s.l.], v. 115, p. 145–151, 2013. ISBN: 1383-5866, ISSN: 13835866, DOI: 10.1016/j.seppur.2013.05.013.

LIN, T. F. et al. Effect of chlorination on the cell integrity of two noxious cyanobacteria and their releases of odorants. **Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA**, [s.l.], v. 58, n. 8, p. 539–551, 2009. ISBN: 0003-7214, ISSN: 00037214, DOI: 10.2166/aqua.2009.117.

LIU, B. et al. Microcystis aeruginosa-laden water treatment using enhanced coagulation by persulfate/Fe(II), ozone and permanganate: Comparison of the simultaneous and successive oxidant dosing strategy. **Water Research**, [s.l.], v. 125, p. 72–80, 2017. ISBN: 1879-2448 (Electronic) 0043-1354 (Linking), ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2017.08.035.

LIU, R. et al. Preferential binding between intracellular organic matters and Al13 polymer to enhance coagulation performance. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s.l.], v. 76, p. 1–11, 2018. ISSN: 18787320, DOI: 10.1016/j.jes.2018.05.011.

LIU, Y. et al. Genetic analysis on Dolichospermum (Cyanobacteria; sensu Anabaena) populations based on the culture-independent clone libraries revealed the dominant genotypes existing in Lake Taihu, China. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 31, p. 76–81, 2014. ISBN: 1568-9883, ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2013.09.012.

LOPES, I. K. C. et al. Prevalence of paralytic shellfish poison-producing Planktothrix agardhii and Cylindrospermopsis raciborskii in a Brazilian semi-arid reservoir. **Acta Limnologica Brasiliensia**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 238–246, 2015. ISSN: 2179-975X, DOI: 10.1590/S2179-975X5014.

LÜRLING, M. et al. Critical assessment of chitosan as coagulant to remove cyanobacteria. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 66, p. 1–12, 2017. ISSN: 18781470, DOI: 10.1016/j.hal.2017.04.011.

MA, M. et al. Effect of moderate pre-oxidation on the removal of Microcystis aeruginosa by KMnO₄-Fe(II) process: Significance of the in-situ formed Fe(III). **Water Research**, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 73–81, 2012. ISBN: 00431354 (ISSN), ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2011.10.022.

MARKELOVA, A. G.; VLADIMIROVA, M. G.; KUPTSOVA, E. S. A comparison of cytochemical methods for the rapid evaluation of microalgal viability. **Russian Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 47, n. 6, p. 815–819, 2000. ISBN: 1021-4437, ISSN: 10214437, DOI: 10.1023/A:1026619514661.

MCNEMAR, Q. Note on the sampling error of the differences between correlated estimators of the odds ratio. **Biometrika**, [s.l.], v. 65, n. 2, p. 191–202, 2002.

MOHAMMED, T. J.; SHAKIR, E. Effect of settling time, velocity gradient, and camp number on turbidity removal for oilfield produced water. **Egyptian Journal of Petroleum**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 31–36, 2018. ISSN: 20902468, DOI: 10.1016/j.ejpe.2016.12.006.

MOISANDER, P. H. et al. Small-scale shear effects on heterocystous cyanobacteria. **Limnology and Oceanography**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 108–119, 2002. ISBN: 0024-3590, ISSN: 00243590, DOI: 10.4319/lo.2002.47.1.0108.

MUCCI, M. et al. Chitosan as coagulant on cyanobacteria in lake restoration management may cause rapid cell lysis. **Water Research**, [s.l.], v. 118, p. 121–130, 2017. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2017.04.020.

NACERADSKA, J. et al. The impact of pre-oxidation with potassium permanganate on cyanobacterial organic matter removal by coagulation. **Water Research**, [s.l.], v. 114, p. 42–49, 2017. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2017.02.029.

NDONG, M. et al. Estimating the risk of cyanobacterial occurrence using an index integrating meteorological factors: Application to drinking water production. **Water Research**, [s.l.], v. 56, p. 98–108, 2014. ISBN: 4352642711438, ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2014.02.023.

O'DWYER, J. et al. Development of a hierarchical model for predicting microbiological contamination of private groundwater supplies in a geologically heterogeneous region. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 237, p. 329–338, 2018. ISSN: 18736424, DOI: 10.1016/j.envpol.2018.02.052.

OLEA-POPELKA, F.; ROSEN, L. E. A Practical Guide for Statistics in Wildlife Studies. **Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy**, v. 9, [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. 21-27 p. DOI: 10.1016/B978-0-323-55228-8.00005-9.

OSBORNE, N. J.; SHAW, G. R.; WEBB, P. M. Health effects of recreational exposure to Moreton Bay, Australia waters during a *Lyngbya majuscula* bloom. **Environment International**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 309–314, 2007. ISBN: 0160-4120, ISSN: 18736750, DOI: 10.1016/j.envint.2006.10.011.

OU, H. et al. Mechanistic studies of Microcystic aeruginosa inactivation and degradation by UV-C irradiation and chlorination with poly-synchronous analyses. **Desalination**, [s.l.], v. 272, n. 1–3, p. 107–119, 2011. ISBN: 0011-9164, ISSN: 00119164, DOI: 10.1016/j.desal.2011.01.014.

_____. Immediate and long-term impacts of potassium permanganate on photosynthetic activity, survival and microcystin-LR release risk of *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 219–220, p. 267–275, 2012. ISBN: 8602165986, ISSN: 03043894, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.04.006.

PADE, N.; HAGEMANN, M. Salt Acclimation of Cyanobacteria and Their Application in Biotechnology. **Life**, [s.l.], v. 5, p. 25–49, 2015. ISBN: 9789264211018, ISSN: 2075-1729, DOI: 10.3390/life5010025.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Principios de bioestatística**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 506 p.

PANTELIĆ, D. et al. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. **Chemosphere**, [s.l.], v. 91, n. 4, p. 421–441, 2013. ISBN: 0045-6535, ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.003.

PEREYRA, J. P. A. et al. Molecular and morphological survey of saxitoxin-producing cyanobacterium *Dolichospermum circinale* (*Anabaena circinalis*) isolated from geographically distinct regions of Australia. **Toxicon**, [s.l.], v. 138, p. 68–77, 2017. ISSN: 18793150, DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.08.006.

PESTANA, C. J. et al. Fate of cyanobacteria in drinking water treatment plant lagoon supernatant and sludge. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 565, p. 1192–1200, 2016. ISBN: 0048-9697, ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.173.

_____. The effect of water treatment unit processes on cyanobacterial trichome integrity. **Science of The Total Environment**, [s.l.], p. 125-138, 2018. ISSN: 00489697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.337.

PLACKETT, R. L. Karl Pearson and the Chi-squared Test. **International Statistical Review / Revue Internationale De Statistique**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 59–72, 1983. DOI: 10.2307/1402731.

QI, J. et al. Prechlorination of algae-laden water: The effects of transportation time on cell integrity, algal organic matter release, and chlorinated disinfection byproduct formation. **Water Research**, [s.l.], v. 102, p. 221–228, 2016. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2016.06.039.

QIAN, F. et al. The effect of pH on the release of metabolites by cyanobacteria in conventional water treatment processes. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 39, p. 253–258, 2014. ISBN: 1568-9883, ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2014.08.006.

RAMPHAL, S.; MUZI SIBIYA, S. Optimization of time requirement for rapid mixing during coagulation using a photometric dispersion analyzer. **Procedia Engineering**, [s.l.], v. 70, p. 1401–1410, 2014. ISSN: 18777058, DOI: 10.1016/j.proeng.2014.02.155.

RIZZO, L. The Contribution of the Coagulation Process in Controlling Microbial Risk and Disinfection By-products Formation in Drinking Water. **The Role of Colloidal Systems in Environmental Protection**. Salerno: Elsevier B.V., 2014. p. 219–238. ISBN: 9780444632838, DOI: 10.1016/B978-0-444-63283-8.00009-0.

RZYMSKI, P. et al. Polyphasic toxicological screening of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon gracile* isolated in Poland. **Algal Research**, [s.l.], v. 24, p. 72–80, 2017. ISSN: 22119264, DOI: 10.1016/j.algal.2017.02.011.

SANT'ANNA, C. L. et Al. Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras. **Instituto de Botânica**, [s.l.], p. 175, 2012. ISBN: 978-85-7523-040-4, DOI: 10.13140/2.1.4417.1208.

SHAFIK, H. M. et al. Some special morphological features of *Cylindrospermopsis raciborskii* in batch and continuous cultures. **Hydrobiologia**. [s.l.]: [s.n.], 2003. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez11.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1023%2FB%3AHYDR.0000008588.89048.70.pdf>>. Acesso em: 19/out./18.

SHENG, H. et al. Analysis on cyanobacteria bloom in Waihai of Lake Dianchi. **Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 0056–0063, 2012. ISBN: 1574-9541, ISSN: 10000933, DOI: 10.5846/stxb201011261680.

SHI, X. et al. A comparison of trichloromethane formation from two algae species during two pre-oxidation-coagulation-chlorination processes. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 656, p. 1063–1070, 2019. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.461.

SKOOG et al. **Fundamentos de Química Analítica**. In: THOMSON (Org.). 8^a ed. São Paulo: Thomson, 2005. 1026 p.

SRINIVASAN, R.; SORIAL, G. A. Treatment of taste and odor causing compounds 2-methyl isoborneol and geosmin in drinking water: A critical review. **Journal of Environmental Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 1–13, 2011. ISBN: 10010742, ISSN: 10010742, DOI: 10.1016/S1001-0742(10)60367-1.

STEBEGG, R.; SCHMETTERER, G.; ROMPEL, A. Transport of organic substances through the cytoplasmic membrane of cyanobacteria. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 157, n. August 2018, p. 206–218, 2019. ISSN: 00319422, DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.08.013.

STOMMEL, E. W.; FIELD, N. C.; CALLER, T. A. Aerosolization of cyanobacteria as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. **Medical Hypotheses**, [s.l.], v. 80, n. 2, p. 142–145, 2013. ISBN: 0306-9877, ISSN: 03069877, DOI: 10.1016/j.mehy.2012.11.012.

STUCKEN, K. et al. Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. **Systematic and Applied Microbiology**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 37–48, 2009. ISBN: 0723-2020 (Print)n0723-2020 (Linking), ISSN: 07232020, DOI: 10.1016/j.syapm.2008.10.002.

SUN, F. et al. The lysis of *Microcystis aeruginosa* in AlCl₃ coagulation and sedimentation processes. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 193–194, p. 196–202, 2012. ISBN: 1385-8947, ISSN: 13858947, DOI: 10.1016/j.cej.2012.04.043.

TORNEVI, A. et al. Efficacy of water treatment processes and endemic gastrointestinal illness

- A multi-city study in Sweden. **Water Research**, [s.l.], v. 102, p. 263–270, 2016. ISBN: 0043-1354, ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2016.06.018.

TSAI, K. P. Effects of two copper compounds on *Microcystis aeruginosa* cell density, membrane integrity, and microcystin release. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 120, p. 428–435, 2015. ISBN: 9780717143931, ISSN: 10902414, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.06.024.

VADASARUKKAI, Y. S.; GAGNON, G. A. Application of low-mixing energy input for the coagulation process. **Water Research**, [s.l.], v. 84, p. 333–341, 2015. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2015.07.049.

WANG, L. et al. Pre-oxidation with $KMnO_4$ changes extra-cellular organic matter's secretion characteristics to improve algal removal by coagulation with a low dosage of polyaluminium chloride. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 452–459, 2013. ISBN: 978-953-307-713-0, ISSN: 10010742, DOI: 10.1016/S1001-0742(12)60087-4.

WATANABE, Y. Flocculation and me. **Water Research**, [s.l.], v. 114, p. 88–103, 2017. ISBN: 8625835872, ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2016.12.035.

WERT, E. C. et al. Effect of oxidant exposure on the release of intracellular microcystin, MIB, and geosmin from three cyanobacteria species. **Water Research**, [s.l.], v. 52, p. 251–259, 2014. ISBN: 0043-1354, ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2013.11.001.

WILLIS, A. et al. Intraspecific variation in growth, morphology and toxin quotas for the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Toxicon**, [s.l.], v. 119, p. 307–310, 2016. ISBN: 1879-3150 (Electronic)0041-0101 (Linking), ISSN: 18793150, DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.07.005.

_____. Genome variation in nine co-occurring toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 73, p. 157–166, 2018. ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2018.03.001.

WORRALL, F.; GIBSON, H. S.; BURT, T. P. Production vs. solubility in controlling runoff of

DOC from peat soils - The use of an event analysis. **Journal of Hydrology**, [s.l.], v. 358, n. 1–2, p. 84–95, 2008. ISBN: 0022-1694, ISSN: 00221694, DOI: 10.1016/j.jhydrol.2008.05.037.

XIE, P. et al. Comparison of permanganate preoxidation and preozonation on algae containing water: Cell integrity, characteristics, and chlorinated disinfection byproduct formation. **Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 47, n. 24, p. 14051–14061, 2013. ISBN: 8620841106, ISSN: 0013936X, DOI: 10.1021/es4027024.

_____. A mini review of preoxidation to improve coagulation. **Chemosphere**, [s.l.], v. 155, p. 550–563, 2016. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.003.

YANG, X.; GUO, W.; LEE, W. Formation of disinfection byproducts upon chlorine dioxide preoxidation followed by chlorination or chloramination of natural organic matter. **Chemosphere**, [s.l.], v. 91, n. 11, p. 1477–1485, 2013. ISBN: 1879-1298 (Electronic)n0045-6535 (Linking), ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.12.014.

YATES, F. Contingency Tables Involving Small Numbers and the χ^2 Test. **Journal of the Royal Statistical Society**, [s.l.], v. 93, n. 1, p. 217–235, 1934.

ZAMYADI, A.; HO, L. et al. Fate of toxic cyanobacterial cells and disinfection by-products formation after chlorination. **Water Research**, [s.l.], v. 46, n. 5, p. 1524–1535, 2012. ISBN: 5143404711, ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2011.06.029.

ZAMYADI, A.; MACLEOD, S. L. et al. Toxic cyanobacterial breakthrough and accumulation in a drinking water plant: A monitoring and treatment challenge. **Water Research**, [s.l.], v. 46, n. 5, p. 1511–1523, 2012. ISBN: 1879-2448 (Electronic)r0043-1354 (Linking), ISSN: 00431354, DOI: 10.1016/j.watres.2011.11.012.

ZAMYADI, A. et al. Fate of geosmin and 2-methylisoborneol in full-scale water treatment plants. **Water Research**, [s.l.], v. 83, p. 171–183, 2015. ISBN: 1879-2448 (Electronic) 0043-1354 (Linking), ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2015.06.038.

ZHANG, Z. et al. Effects of slow-mixing on the coagulation performance of polyaluminum chloride (PACl). **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 318–323,

2013. ISBN: 1004-9541, ISSN: 10049541, DOI: 10.1016/S1004-9541(13)60463-2.

ZHENG, H. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in manure-free piggery wastewater with high-strength ammonium for nutrients removal and biomass production: Effect of ammonium concentration, carbon/nitrogen ratio and pH. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 273, n. November 2018, p. 203–211, 2019. ISSN: 18732976, DOI: 10.1016/j.biortech.2018.11.019.

ZHOU, S.; SHAO, Y.; GAO, N.; LI, L. et al. Effect of chlorine dioxide on cyanobacterial cell integrity, toxin degradation and disinfection by-product formation. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 482–483, n. 1, p. 208–213, 2014. ISBN: 1879-1026 (Electronic)r0048-9697 (Linking), ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.007.

ZHOU, S.; SHAO, Y.; GAO, N.; ZHU, S. et al. Removal of *Microcystis aeruginosa* by potassium ferrate (VI): Impacts on cells integrity, intracellular organic matter release and disinfection by-products formation. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 251, p. 304–309, 2014. ISSN: 13858947, DOI: 10.1016/j.cej.2014.04.081.

APÊNDICE A – Quadro com os valores do OR_{rel} e IC(95%)

α= 0.05					No data transformations			TRANSFORMATION 1 (ε=0.5)			TRANSFORMATION 2 (ε=1.0)			
Conc	Spes	Oxid	Exp. Cond.	Hip	p-value	OR	CI - Inf	CI - Sup	OR	CI - Inf	CI - Sup	OR	CI - Inf	CI - Sup
0 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC1 x EC0	H1	1.000	0.0%	0.00%	3900.05%	0.0%	0.00%	542.30%	49.7%	0.83%	968.25%
0 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC2 x EC0	H2	0.497	0.0%	0.00%	531.61%	0.0%	0.00%	531.61%	32.8%	0.62%	416.84%
0 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC2 x EC1	H3	1.000	49.7%	0.83%	968.41%	98.0%	6.98%	1376.41%	66.1%	5.42%	590.26%
0 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC1 x EC0	H1	1.000	0.0%	0.00%	Inf	0.0%	0.00%	Inf	100.0%	1.26%	7921.76%
0 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC2 x EC0	H2	1.000	0.0%	0.00%	Inf	0.0%	0.00%	Inf	100.0%	1.26%	7921.76%
0 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC2 x EC1	H3	1.000	0.0%	0.00%	Inf	0.0%	0.00%	Inf	100.0%	1.26%	7921.76%
0 mg/L	D. circile	Cl2	EC1 x EC0	H1	0.019	48.1%	25.58%	89.46%	49.1%	26.24%	90.83%	48.9%	26.23%	90.25%
0 mg/L	D. circile	Cl2	EC2 x EC0	H2	0.013	46.2%	24.59%	85.90%	47.1%	25.23%	86.72%	47.1%	25.23%	86.72%
0 mg/L	D. circile	Cl2	EC2 x EC1	H3	1.000	96.1%	53.07%	173.86%	95.9%	53.10%	172.91%	96.2%	53.44%	172.92%
0 mg/L	D. circile	KMnO4	EC1 x EC0	H1	0.000	21.7%	10.22%	44.24%	22.8%	10.93%	45.73%	22.8%	10.93%	45.73%
0 mg/L	D. circile	KMnO4	EC2 x EC0	H2	0.000	29.0%	13.54%	59.47%	30.5%	14.52%	61.92%	30.2%	14.41%	61.10%
0 mg/L	D. circile	KMnO4	EC2 x EC1	H3	0.389	133.3%	73.08%	244.10%	133.8%	73.61%	244.32%	132.5%	73.13%	240.99%
1 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC1 x EC0	H1	0.497	0.0%	0.00%	531.61%	0.0%	0.00%	531.61%	32.8%	0.62%	416.84%
1 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC2 x EC0	H2	0.497	0.0%	0.00%	531.61%	0.0%	0.00%	531.61%	32.8%	0.62%	416.84%
1 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC2 x EC1	H3	1.000	100.0%	7.12%	1404.62%	100.0%	7.12%	1404.62%	100.0%	13.07%	764.99%
1 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC1 x EC0	H1	1.000	0.0%	0.00%	Inf	0.0%	0.00%	Inf	100.0%	1.26%	7921.76%
1 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC2 x EC0	H2	1.000	0.0%	0.00%	Inf	0.0%	0.00%	Inf	100.0%	1.26%	7921.76%
1 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC2 x EC1	H3	1.000	0.0%	0.00%	Inf	0.0%	0.00%	Inf	100.0%	1.26%	7921.76%
1 mg/L	D. circile	Cl2	EC1 x EC0	H1	0.000	4.1%	1.60%	9.55%	4.6%	1.88%	10.37%	4.6%	1.88%	10.37%
1 mg/L	D. circile	Cl2	EC2 x EC0	H2	0.000	0.4%	0.01%	2.67%	0.9%	0.10%	3.54%	0.9%	0.10%	3.54%
1 mg/L	D. circile	Cl2	EC2 x EC1	H3	0.018	10.3%	0.23%	76.86%	18.5%	1.93%	90.29%	18.5%	1.93%	90.29%
1 mg/L	D. circile	KMnO4	EC1 x EC0	H1	0.000	2.7%	1.09%	6.26%	3.0%	1.26%	6.84%	3.0%	1.26%	6.84%
1 mg/L	D. circile	KMnO4	EC2 x EC0	H2	0.000	5.7%	2.54%	12.00%	6.0%	2.72%	12.50%	6.2%	2.81%	12.77%
1 mg/L	D. circile	KMnO4	EC2 x EC1	H3	0.068	210.6%	95.31%	483.80%	197.8%	90.86%	445.10%	203.4%	94.02%	455.36%
2 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC1 x EC0	H1	0.000	0.0%	0.00%	27.07%	0.0%	0.00%	27.07%	5.8%	0.14%	39.17%
2 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC2 x EC0	H2	0.000	0.0%	0.00%	1.97%	0.0%	0.00%	1.97%	0.5%	0.01%	3.04%
2 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC2 x EC1	H3	0.000	7.8%	3.53%	16.24%	7.8%	3.53%	16.24%	8.4%	3.87%	17.17%
2 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC1 x EC0	H1	1.000	0.0%	0.00%	Inf	0.0%	0.00%	Inf	100.0%	1.26%	7921.76%
2 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC2 x EC0	H2	1.000	0.0%	0.00%	Inf	0.0%	0.00%	Inf	100.0%	1.26%	7921.76%
2 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC2 x EC1	H3	1.000	0.0%	0.00%	Inf	0.0%	0.00%	Inf	100.0%	1.26%	7921.76%
2 mg/L	D. circile	Cl2	EC1 x EC0	H1	0.000	2.7%	0.86%	6.94%	2.7%	0.88%	7.05%	3.1%	1.10%	7.75%
2 mg/L	D. circile	Cl2	EC2 x EC0	H2	0.000	0.0%	0.00%	1.72%	0.0%	0.00%	1.75%	0.4%	0.01%	2.66%
2 mg/L	D. circile	Cl2	EC2 x EC1	H3	0.029	0.0%	0.00%	82.59%	0.0%	0.00%	82.59%	13.5%	0.30%	108.58%
2 mg/L	D. circile	KMnO4	EC1 x EC0	H1	0.000	4.5%	1.97%	9.73%	4.8%	2.11%	10.13%	4.9%	2.20%	10.43%
2 mg/L	D. circile	KMnO4	EC2 x EC0	H2	0.000	3.2%	1.32%	7.19%	3.6%	1.51%	7.80%	3.6%	1.51%	7.80%
2 mg/L	D. circile	KMnO4	EC2 x EC1	H3	0.457	70.7%	31.33%	156.68%	74.5%	33.55%	163.29%	71.9%	32.57%	156.03%
4 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC1 x EC0	H1	0.000	0.0%	0.00%	4.10%	0.0%	0.00%	4.10%	1.0%	0.02%	6.24%
4 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC2 x EC0	H2	0.000	0.0%	0.00%	1.21%	0.0%	0.00%	1.21%	0.3%	0.01%	1.91%
4 mg/L	C. raciborskii	Cl2	EC2 x EC1	H3	0.000	28.4%	14.49%	54.31%	28.4%	14.49%	54.31%	29.3%	15.12%	55.50%
4 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC1 x EC0	H1	0.246	0.0%	0.00%	240.56%	0.0%	0.00%	152.71%	24.4%	0.49%	252.27%
4 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC2 x EC0	H2	0.497	0.0%	0.00%	531.61%	0.0%	0.00%	531.61%	32.8%	0.62%	416.84%
4 mg/L	C. raciborskii	KMnO4	EC2 x EC1	H3	1.000	151.2%	16.94%	1847.20%	199.3%	27.84%	2251.36%	134.5%	22.13%	941.89%
4 mg/L	D. circile	Cl2	EC1 x EC0	H1	0.000	0.0%	0.00%	1.72%	0.0%	0.00%	1.75%	0.4%	0.01%	2.66%
4 mg/L	D. circile	Cl2	EC2 x EC0	H2	0.000	0.0%	0.00%	1.72%	0.0%	0.00%	1.75%	0.4%	0.01%	2.66%
4 mg/L	D. circile	Cl2	EC2 x EC1	H3	1.000	0.0%	0.00%	Inf	0.0%	0.00%	Inf	100.0%	1.26%	7921.76%
4 mg/L	D. circile	KMnO4	EC1 x EC0	H1	0.000	3.2%	1.32%	7.19%	3.6%	1.51%	7.80%	3.6%	1.51%	7.80%
4 mg/L	D. circile	KMnO4	EC2 x EC0	H2	0.000	0.2%	0.01%	1.24%	0.4%	0.04%	1.69%	0.4%	0.04%	1.69%
4 mg/L	D. circile	KMnO4	EC2 x EC1	H3	0.000	5.8%	0.14%	39.08%	10.8%	1.18%	48.18%	10.8%	1.18%	48.18%

Fonte: Autor (2019)

APÊNDICE B – Quadro com os p-valores dos testes de Wilcoxon

Resultado das comparações dos gradientes pelo Teste de Wilcoxon com ajuste de Bonferroni												
Mistura Rápida	1 mg/L CR CL2	1 mg/L CR KMnO4	1 mg/L DR CL2	1 mg/L DR KMnO4	2 mg/L CR CL2	2 mg/L CR KMnO4	2 mg/L DR CL2	2 mg/L DR KMnO4	4 mg/L CR CL2	4 mg/L CR KMnO4	4 mg/L DR CL2	4 mg/L DR KMnO4
1 mg/L CR KMnO4	1	NA	NA	NA								
1 mg/L DR CL2	1	1	NA	NA								
1 mg/L DR KMnO4	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2 mg/L CR CL2	1	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2 mg/L CR KMnO4	1	1	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2 mg/L DR CL2	1	1	1	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2 mg/L DR KMnO4	1	1	1	1	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA
4 mg/L CR CL2	1	1	1	1	1	1	1	1	NA	NA	NA	NA
4 mg/L CR KMnO4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA	NA	NA
4 mg/L DR CL2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA	NA
4 mg/L DR KMnO4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mistura lenta	1 mg/L CR CL2	1 mg/L CR KMnO4	1 mg/L DR CL2	1 mg/L DR KMnO4	2 mg/L CR CL2	2 mg/L CR KMnO4	2 mg/L DR CL2	2 mg/L DR KMnO4	4 mg/L CR CL2	4 mg/L CR KMnO4	4 mg/L DR CL2	4 mg/L DR KMnO4
1 mg/L CR KMnO4	1	NA	NA	NA								
1 mg/L DR CL2	1	0.450995046	NA	NA								
1 mg/L DR KMnO4	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2 mg/L CR CL2	1	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2 mg/L CR KMnO4	1	1	0.252015249	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2 mg/L DR CL2	1	0.765741154	1	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2 mg/L DR KMnO4	1	1	1	1	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA
4 mg/L CR CL2	1	1	1	1	1	1	1	1	NA	NA	NA	NA
4 mg/L CR KMnO4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA	NA	NA
4 mg/L DR CL2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA	NA
4 mg/L DR KMnO4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Fonte: Autor (2019)