

27º Encontro Técnico AESABESP

INATIVAÇÃO DE CISTOS DE *Giardia* POR OZONIZAÇÃO: AVALIAÇÃO NAS ESCALAS REAL, PILOTO E DE BANCADA EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUA

Liane Yuri Kondo Nakada⁽¹⁾

Engenheira Ambiental e Mestre em Engenharia Civil e Ambiental pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Doutoranda em Engenharia Civil – Área de concentração: Saneamento e Ambiente pela Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo (FEC), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Vagner Ricardo da Silva Fiuza

Médico Veterinário, Mestre e Doutor em Ciência Animal pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Pesquisador colaborador na FEC-UNICAMP.

Luciana Urbano dos Santos

Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas), Mestre e Doutora em Biologia Animal pelo Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP. Professora em tempo integral do Centro Universitário Padre Anchieta (UniAnchieta).

Sidnei de Lima Siqueira

Químico Industrial pela Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Especialista em Engenharia de Saneamento Básico pela Faculdade de Saúde Pública (FSP) da Universidade de São Paulo (USP), e Mestre em Engenharia Civil pela UNICAMP. Coordenador das ETA 3 e 4 da Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA).

Regina Maura Bueno Franco

Bióloga pela UNICAMP, Mestre em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Doutora em Biologia Animal pela UNICAMP. Professora Doutora do IB-UNICAMP.

José Roberto Guimarães

Químico, Mestre e Doutor em Química pelo Instituto de Química (IQ) da UNICAMP. Livre-docente e Professor Titular da FEC-UNICAMP.

Endereço⁽¹⁾: Avenida Albert Einstein, 951 - Cidade Universitária Zeferino Vaz – Campinas – SP – CEP: 13083-852 - Brasil - Tel: +55 (19) 3521-2378 - e-mail: lianenakada@gmail.com

RESUMO

Recentemente, um extenso período de estiagem causou transtornos na região sudeste do Brasil. Em Campinas – SP, estudos apontam contaminação do principal manancial usado para abastecimento público pelo parasito *Giardia* spp.. No presente trabalho, foram avaliadas: i) a ocorrência de cistos de *Giardia* spp. na entrada de estações de tratamento de água (ETA); ii) o potencial do cloro e do ozônio de causar danos a esses cistos; e iii) a eficiência da ozonização na inativação de uma elevada concentração de cistos de *Giardia duodenalis*. Foram detectados cistos de *Giardia* spp. na entrada das ETA em todas as amostras analisadas, com média de 49 cistos·L⁻¹. Os resultados obtidos sugerem que existe uma forte relação entre a concentração de cistos de *Giardia* spp. na entrada das ETA e a vazão afluente às ETA, de modo que menores vazões implicam em maiores concentrações do parasito. A detecção de cistos foi mais frequente nas amostras ozonizadas, porém, as concentrações mínima e máxima foram mais elevadas nas amostras cloradas. Nas condições avaliadas, a pré-cloração foi capaz de causar alterações de forma e/ou fluorescência com maior frequência do que a pré-ozonização. A condição de ozonização aplicada em bancada foi eficiente em inativar uma elevada concentração de cistos.

PALAVRAS-CHAVE: desinfecção, PMA-PCR, protozoários patogênicos.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, períodos atípicos de estiagem atingiram a região sudeste do Brasil. Além do comprometimento da quantidade de água disponível, a escassez de chuva também agravou o problema de qualidade da água dos mananciais (ANA, 2014; JACOBI *et al.*, 2015), com potencial aumento da transmissão de doenças de veiculação hídrica.

O protozoário *Giardia duodenalis* (sin. *G. lamblia*, *G. intestinalis*), agente etiológico da giardiose, é um dos parasitos que causam maior preocupação ao setor de tratamento de água (WHO, 2002), sendo responsável por quase 40% dos surtos causados por veiculação hídrica de protozoários no mundo, entre 1954 e 2010 (KARANIS *et al.*, 2007; BALDURSSON e KARANIS, 2011).

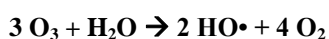
O cisto de *Giardia* spp., forma infectante e de resistência ambiental, suporta a ação de gás cloro, dióxido de cloro e cloraminas, nas condições (concentrações e tempos de contato) usualmente empregadas em estações de tratamento de água (KARANIS, 2011).

Experimentos de infectividade animal demonstraram que cistos mantêm a capacidade de infecção por até 7 dias em água tratada (20 a 28 °C), e permanecem infectantes após 28 dias em água de rio, em temperatura entre 19 e 27 °C. (DEREGNIER *et al.*, 1989).

O cloro é o desinfetante químico mais utilizado em tratamento de água para abastecimento público, em virtude de seu amplo espectro de ação antimicrobiana, e da manutenção de residual desinfetante ativo. Devido ao seu elevado potencial de oxidação ($E^{\circ} = 1,36V$), também é aplicado na oxidação de ferro e manganês, controle de sabor e odor, redução de cor, prevenção de crescimento de algas e de biofilmes (USEPA, 1999). Porém, a geração de subprodutos prejudiciais à saúde, e a resistência de determinados organismos patogênicos à cloração têm imposto restrições ao uso do referido oxidante (RICHTER, 2009; LIBÂNIO, 2010).

O ozônio tem sido indicado como uma alternativa ao cloro, com potencial de oxidar compostos orgânicos e inorgânicos, e inativar bactérias, vírus e (oo)cistos de protozoários (DANIEL, 2001; RICHTER, 2009; LIBÂNIO, 2010). Paschoalato *et al.* (2008) apontam que a pré-oxidação com ozônio associada aos processos de coagulação, filtração e pós-cloração resulta em quantidades reduzidas de subprodutos da desinfecção.

O ozônio pode atuar pelas vias direta ou indireta, ou seja, por meio do ozônio molecular ou do radical hidroxila ($HO\bullet$), respectivamente. Em meio básico há a formação de radicais hidroxila, conforme a Reação 1 (GOTTSCHALK *et al.*, 2010).



Reação (1)

A determinação da infectividade de cistos de *Giardia* spp. ainda restringe estudos de desinfecção, uma vez que somente experimentos *in vivo* são capazes de definir o potencial infectante.

A detecção de cistos de *Giardia* spp. por meio da Reação de Imunofluorescência Direta (RID) baseia-se na ligação entre os cistos e anticorpos monoclonais conjugados com o corante FITC, que proporciona fluorescência verde-maçã brilhante aos cistos observados em microscópio de fluorescência. Quando os cistos são danificados, a ligação antígeno - anticorpo é prejudicada, ocasionando falhas na visualização do organismo (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

Alterações estruturais na parede de cistos de *Giardia* spp. foram associadas com perda de capacidade infectante (WIDMER *et al.*, 2002). Desse modo, alterações de forma e/ou fluorescência do cisto podem ser consideradas válidas para inferências sobre a inativação desse organismo (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

Recentemente, a conjugação do corante vital Propídio Monoazida (PMA) com a técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi reportada como alternativa conveniente para a determinação da viabilidade de cistos de *G. duodenalis* (ALONSO *et al.*, 2014). O método baseia-se na premissa de que o PMA penetra somente em células danificadas, ligando-se ao DNA, impedindo sua amplificação em PCR. Desse modo, somente células íntegras são amplificadas em PCR.

Em Campinas - SP, a giardiose é endêmica (SANTOS *et al.*, 2013), e cistos de *Giardia* spp. foram detectados em 7 de 8 amostras de água coletadas do Rio Atibaia, em concentrações média de 35, mínima de 2,5 e máxima de 120 cistos·L⁻¹ (CANTUSIO NETO *et al.*, 2010).

Neste contexto, o presente estudo foi realizado, com o intuito de investigar a presença de cistos de *Giardia* spp. na entrada de estações de tratamento de água (ETA) em Campinas-SP; comparar a ação do cloro e do ozônio sobre o parasito; e avaliar o uso de PMA-PCR para determinação da viabilidade de cistos de *Giardia duodenalis* em água pré-ozonizada.

OBJETIVOS

Avaliar:

- i) A ocorrência de cistos de *Giardia* spp. na água bruta destinada ao tratamento para distribuição no município de Campinas – SP, e a existência de correlação e/ou inter-relações entre a concentração de cistos de *Giardia* spp. na entrada das ETA e variáveis climáticas, físico-químicas, microbiológica, e de operação (escala real);
- ii) Os efeitos da cloração sobre cistos de *Giardia* spp. (escala real);
- iii) Os efeitos da ozonização sobre cistos de *Giardia* spp. (escala piloto);
- iv) A eficiência da ozonização na inativação de cistos de *G. duodenalis* (escala de bancada).

MATERIAIS E MÉTODOS

▪ Área de estudo

O município de Campinas – SP abriga uma população urbana de mais de 1 milhão de habitantes, que é atendida pela Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA). O rio Atibaia é o principal manancial de abastecimento de água de Campinas, contribuindo com mais de 93% do volume destinado ao tratamento (SANASA, 2014).

▪ Estações de Tratamento de Água 3 e 4

As ETA 3 e 4 da SANASA fazem a captação de água no rio Atibaia, e atendem 75% da população de Campinas – SP. Essas ETA operam em ciclo completo, e empregam pré-cloração (t = 180 minutos) visando à redução de matéria orgânica, à oxidação de metais e à desinfecção primária com cloro residual livre; a desinfecção secundária é realizada com cloramina.

Nessas plantas, foi instalado um sistema piloto de aplicação de ozônio (t = 3 minutos), com medidor *online* de residual na água (Figura 1), para avaliar: a) o efeito da ozonização sobre alguns contaminantes de preocupação emergente, tais como fármacos, hormônios, e os protozoários patogênicos *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.; e b) a eliminação e/ou minimização da formação de subprodutos da desinfecção (SANASA, 2014).



Figura 1. Sistema piloto de ozonização instalado nas ETA 3 e 4 da SANASA.

▪ Amostras

Todas as amostras (1,0 – 1,2 L) foram coletadas nas dependências das ETA 3 e 4. Em 2014, ao longo de 7 meses (junho a dezembro), foram realizadas 7 campanhas de coleta, em três pontos das ETA: 1) entrada de água bruta; 2) saída da pré-cloração; e 3) saída da pré-ozonização.

As amostras de água bruta (n=7) foram coletadas para a determinação da ocorrência de cistos de *Giardia* spp. na entrada das ETA.

As amostras de água pré-ozonizada (n=6) foram coletadas para a avaliação dos efeitos da ozonização em escala piloto sobre cistos de *Giardia* spp.. As amostras de água pré-clorada (n=7) foram coletadas com o propósito de comparar o emprego do cloro e do ozônio.

Também foram avaliadas as eficiências de inativação da bactéria *Escherichia coli* com emprego do cloro e do ozônio, por se tratar de um organismo indicador.

Após a coleta, todas as amostras foram transportadas para os laboratórios da UNICAMP e, imediatamente, foram iniciados os procedimentos para as análises. A concentração dos cistos de *Giardia* spp., a RID e a ozonização em bancada foram realizadas no Laboratório de Processos Oxidativos (LABPOX/DSA/FEC). A visualização em microscópio de fluorescência foi realizada no Laboratório de Saneamento (LABSAN/FEAGRI). A PCR foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular (IB). A quantificação de *E.coli* foi realizada no Laboratório de Saneamento (LABSAN/DSA/FEC). A SANASA disponibilizou os dados de análises físico-químicas da água bruta e de operação das ETA.

▪ Concentração de cistos de *Giardia* spp.

Todas as amostras foram concentradas pela técnica de filtração em membranas (FM), seguindo um protocolo modificado de Franco *et al.* (2001), conforme descrito a seguir. As amostras foram filtradas em membranas (Millipore®), com 47 mm de diâmetro e porosidade nominal de 3 µm, compostas de ésteres mistos de celulose. Após a filtração, cada membrana foi cuidadosamente transferida para uma placa plástica estéril, na qual foi adicionada solução de eluição (*Tween* 80 a 0,1%). As seguintes etapas foram realizadas, alternadamente, por períodos equivalentes, em um tempo total de 20 minutos: i) raspagem da superfície das membranas, com alça plástica macia e, ii) lavagem manual com pipeta de Pasteur e solução de eluição. O líquido resultante da etapa de recuperação foi transferido para tubos de fundo cônico, que seguiram para centrifugação a 1.500 x g, por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e descartado, e o sedimento foi lavado com água ultra-pura e submetido à segunda centrifugação, sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado novamente, e ao sedimento remanescente, foi adicionada água ultra-pura até o volume de 1 mL, quando, então, o sedimento foi transferido para um tubo de microcentrifugação e mantido sob refrigeração a 4°C, até a execução da Reação por Imunofluorescência Direta (RID).

Foram realizados experimentos controle da metodologia de concentração de cistos de *Giardia* spp.. Os resultados asseguraram ausência de contaminação e eficiência de recuperação de 90% dos cistos.

▪ Reação de Imunofluorescência Direta (RID)

Para quantificar cistos presentes nas amostras concentradas, e visualizar possíveis danos morfológicos/alterações de fluorescência, causados pelos oxidantes, as amostras foram observadas por RID e, para isso, a homogeneização das amostras foi realizada com base no método 1623 (USEPA, 2005): o tubo contendo a amostra concentrada é agitado em vórtex por 2 minutos, em seguida é invertido 3 vezes e, imediatamente, cada alíquota é transferida para o poço da lâmina de RID. Foi utilizado o *kit* Merifluor® (Meridian Bioscience), conforme instruções do fabricante. A observação das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência. Todas as amostras foram visualizadas em triplicata.

Nos ensaios de RID foram considerados como critérios para positividade: i) comprimento entre 8 e 18 µm (ROBERTSON, 2013) e forma similares àquelas da amostra controle; e ii) fluorescência verde-maçã brilhante intensa na parede, e sem difusão quando focada no microscópio. Alterações de forma e/ou fluorescência foram consideradas para a avaliação dos efeitos dos oxidantes sobre os cistos detectados.

A estimativa do número de cistos por volume de amostra (L), é calculada de acordo com a Equação 1.

$$X = \frac{n}{k} \cdot \frac{S}{A}$$

Onde : X = concentração de cistos (número · L⁻¹)
 n = número de cistos visualizados na lâmina
 k = volume de sedimento analisado (µL)
 S = volume de sedimento obtido (µL)
 A = volume filtrado de amostra (L)

▪ Ozonização em escala de bancada

Para o experimento de ozonização em escala de bancada (fevereiro de 2016), foi coletada uma amostra de água bruta da entrada das ETA 3 e 4 (25 °C, pH 6,9, 72 NTU).

Considerando-se que testes prévios indicaram que elevados valores de turbidez da água bruta resultam em inibição do funcionamento do PMA (dados não mostrados), a água bruta coletada foi filtrada em papel filtro (maioria dos poros = 25µm) para diminuição da turbidez.

Foram inoculados 10⁵ cistos de *G. duodenalis* (*Waterborne, Inc.*) em 1 litro de água (23°C, pH 7,1, 22 NTU). A água com o inóculo permaneceu em agitador magnético durante 1h45, para condicionar os cistos e, eventualmente, proporcionar maior homogeneidade da amostra. Após esse período, a água foi ozonizada com uma dose de 5 mg·L⁻¹.

Para a ozonização em escala de bancada foi utilizado um sistema experimental constituído por um gerador de ozônio (ID-10, O₃R) e uma coluna de contato de vidro com volume de 1 L (40 cm de altura útil e 5,7 cm de diâmetro interno), com uma placa porosa (porosidade 4; 10 a 16 µm) acoplada em sua parte inferior (Figura 2a).

O ozônio produzido pelo gerador (entrada da coluna de contato), e o *off-gas* foram quantificados pelo método 2350E do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2012), de acordo com os procedimentos descritos a seguir. O ozônio foi borbulhado em 250 mL de solução de iodeto de potássio (KI) a 2%, resultando em solução de coloração amarelo - alaranjada. Em seguida, 10 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N foram adicionados à solução, que teve a coloração intensificada. Imediatamente, procedeu-se à titulação com solução de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 0,01N, previamente padronizada, até que a solução adquirisse tonalidade de amarelo. Após adicionar 1 mL de solução indicadora de amido, foi dada continuidade à titulação até que a solução se tornasse incolor. Os pontos de viragem da titulação realizada estão ilustrados na Figura 2b.

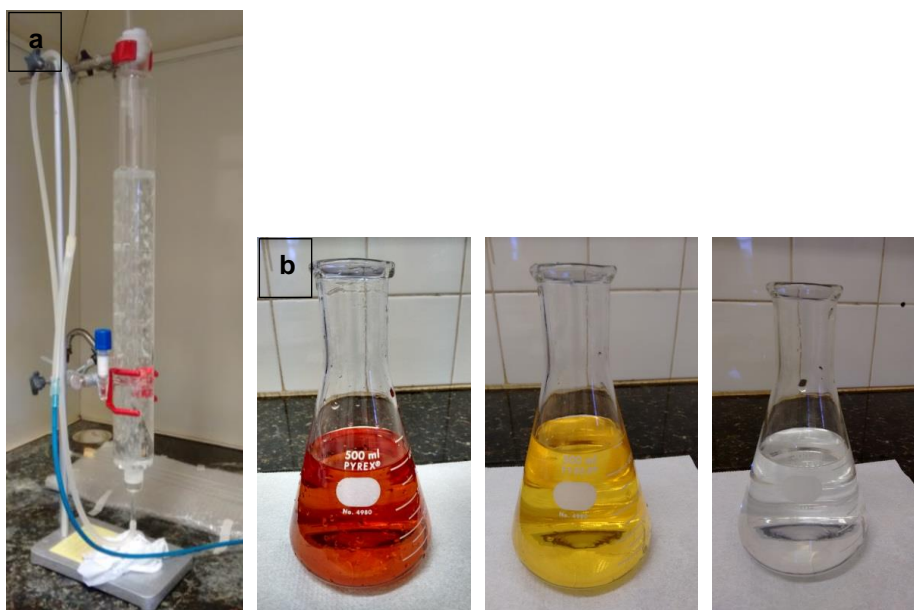


Figura 2. a) Coluna de contato; b) Quantificação de ozônio por método de titulação.

O residual de ozônio na amostra foi quantificado pelo método do disco colorimétrico, com utilização de reagente DPD (©Hach Company), de acordo com as instruções do fabricante, conforme descrito a seguir: 10 mL de água destilada foram adicionados a um dos tubos, o qual foi inserido no comparador, do lado em que o disco colorimétrico apresenta tonalidades de rosa. O reagente DPD foi adicionado ao segundo tubo, no qual foi acrescida a amostra ozonizada até o volume de 10 mL; o tubo foi invertido 3 vezes para homogeneização. O segundo tubo foi inserido no comparador, do lado em que o disco apresenta-se incolor. O disco foi girado até que os dois tubos apresentassem a mesma tonalidade, e a leitura de oxidante residual foi feita em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Imediatamente após a ozonização, os cistos foram concentrados pela técnica de filtração em membranas. A partir do volume final de 1 mL, a amostra foi analisada por RID e por PMA-PCR.

▪ Propídio Monoazida (PMA)

A amostra contendo os cistos foi incubada com PMA (200 μM), ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, por 30 minutos, para propiciar a penetração do PMA nas paredes que estivessem danificadas. Após esse período, o PMA foi fotoativado em dispositivo PMA-Lite™ LED Photolysis Device (Biotium, Inc.), durante 15 minutos.

▪ Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen®), de acordo com instruções do fabricante.

▪ PCR

Um fragmento de cerca de 292pb do gene da SSU-rDNA de *Giardia* foi amplificado em duas reações de PCR, que ocorreram em um volume final de 50 μL : tampão PCR 1x; MgCl_2 (1,5 mM); dNTP (0,2 mM); Taq (2 U); DMSO (2,5 μL) e 0,5 μL de cada iniciador (50 μM). Para a primeira reação foram utilizados os iniciadores: GiaF: 5'-AAGTGTGGTGACGACGGACTC-3' e GiaR: 5'-CTGCTGCCGTCCTTGGATGT-3' (APPELBEE *et al.*, 2003). Foram realizados 35 ciclos, cada um consistindo de 96°C/45s, 58°C/30s e 72°C/45s. Também foram incluídas uma etapa inicial de 96°C/2min e uma extensão final de 72°C/4min. Para a segunda reação de amplificação, foi utilizada uma mistura idêntica à primeira, com os iniciadores: RH-4 5'-CATCCGGTTCGATCCTGCC-3' e RH-11 5'-AGTCGAACCCTEATTCTCCGCCAGG-3' (HOPKINS *et al.*, 1997), e temperatura de anelamento de 55°C. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1%, corado com GelRed™.

▪ Quantificação de *Escherichia coli*

A quantificação (NMP/100 mL) de *E. coli* foi feita com a utilização do kit Colilert® (IDEXX Laboratories, Inc.), cartela para contagem *Quanti-tray*®/2000 (IDEXX Laboratories, Inc.) e seladora para *Quanti-tray*® (IDEXX Laboratories, Inc.), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, o substrato foi adicionado à amostra, e a homogeneização foi promovida por repetida inversão do frasco, previamente autoclavado. O conteúdo do frasco foi transferido para a cartela de contagem, que foi selada e levada à estufa a $35 \pm 0,5$ °C, durante 24 horas. Após esse período, foram contabilizados os poços com fluorescência sob luz UV, visualizados em leitor UV *Spectroline* EA-160 (Spectronics Corporation), que emite luz no comprimento de onda de 365 nm.

▪ Análises estatísticas

Foi investigada a existência de correlação (coeficiente de Pearson) entre a concentração de cistos de *Giardia* spp. na entrada das ETA e variáveis climáticas (chuva e estiagem), físico-químicas (temperatura, pH e turbidez), microbiológica (*E. coli*), e de operação (vazão das ETA).

Também foi realizada análise de componentes principais (ACP), um método de estatística multivariada que possibilita verificar inter-relações entre as variáveis consideradas. Para a ACP, foi utilizado o critério do *Scree Plot* para a extração dos fatores. Esse critério consiste em determinar, graficamente, a partir de qual fator inicia-se uma tendência linear de decréscimo dos autovalores, responsáveis pela importância atribuída aos fatores.

O teste t de Student foi realizado para verificar se as diferenças entre os resultados obtidos para amostras cloradas e ozonizadas são estatisticamente significativas ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

▪ Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. na água bruta (escala real)

Cistos de *Giardia* spp. foram detectados com frequência de 100%, em concentrações mínima de 8, máxima de 138, e média de 49 cistos·L⁻¹. Essas concentrações apontam para a necessidade de atenção especial no tratamento de água, uma vez que menos do que 10 cistos podem causar infecção em hospedeiros suscetíveis (KARANIS, 2011).

• Correlação de Pearson e Análise de Componentes Principais

Na Tabela 1 é apresentada a matriz de correlação de Pearson, com um nível de significância $\alpha=0,05$, entre as variáveis consideradas para a ACP.

Foram verificadas correlações, estatisticamente significativas: i) negativa entre a concentração de cistos (L⁻¹) e a vazão das ETA (L·s⁻¹), indicando que a concentração de cistos aumenta com a diminuição da vazão afluente às ETA; ii) positivas entre pH e chuva, e *E.coli* e chuva, apontando que o pH e a concentração de *E.coli* apresentam valores maiores, quanto maior a altura precipitada nas últimas 24 horas; e iii) positiva entre *E. coli* e pH, sugerindo que a concentração de *E.coli* aumenta com o aumento do pH.

Tabela 1. Matriz de correlação de Pearson, destacando-se as correlações consideradas significativas com um nível de significância $\alpha=0,05$

	Concentração de cistos (L ⁻¹)	Estiagem (dias)	Chuva 24h ETA (mm)	Temperatura da água (°C)	pH	Turbidez (NTU)	<i>E.coli</i> (NMP/100mL)	Vazão da ETA (L·s ⁻¹)
Concentração de cistos (L ⁻¹)	1							
Última chuva (dias)	0,056	1						
Chuva 24h ETA (mm)	0,159	-0,226	1					
Temperatura da água (°C)	0,274	-0,213	0,574	1				
pH	-0,006	-0,053	0,798	0,135	1			
Turbidez (NTU)	0,214	-0,653	0,546	0,677	0,431	1		
<i>E.coli</i> (NMP/100mL)	0,162	-0,265	0,982	0,451	0,786	0,459	1	
Vazão da ETA (L·s ⁻¹)	-0,738	-0,133	0,365	0,340	0,173	0,101	0,312	1

Na ACP, foram extraídos dois fatores: F1, influenciado, sobretudo, pelas variáveis chuva em 24 horas, pH, turbidez e *E.coli*, sendo possível inferir, com significância estatística, que essas variáveis mantêm fortes correlações entre si; e F2, altamente influenciado pela concentração de cistos de *Giardia* spp. na entrada das ETA e pela vazão afluente às ETA, indicando que a elevada correlação negativa entre essas variáveis não se perde quando realizada análise multivariada (Figura 3).

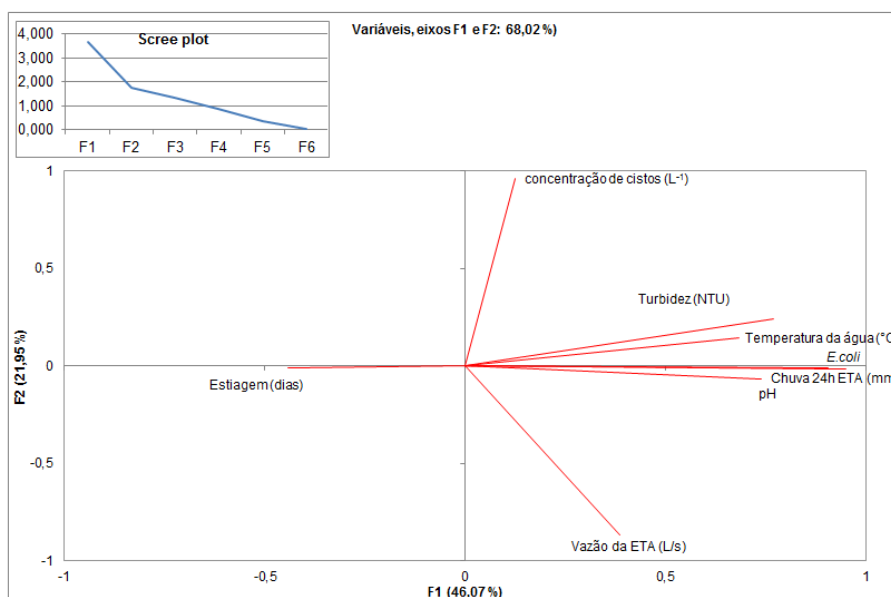


Figura 3. Gráfico F1 versus F2, com detalhe do Scree plot

▪ **Efeitos da cloração (escala real) e da ozonização (escala piloto) sobre cistos de *Giardia* spp.**

Cistos de *Giardia* spp. foram detectados com frequências de 57% e 66% nas amostras pré-cloradas (13 a 50 cistos·L⁻¹) e pré-ozonizadas (8 a 44 cistos·L⁻¹), respectivamente. Embora a detecção de cistos tenha sido mais frequente em amostras ozonizadas, as concentrações mínima e máxima foram mais elevadas nas amostras cloradas.

Em média, as concentrações de cistos foram de 14 cistos·L⁻¹ nas amostras cloradas, e 17 cistos·L⁻¹ nas amostras ozonizadas. De acordo com o teste t de Student, essa diferença não é estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$).

Alterações de forma e/ou fluorescência foram identificadas em 80% dos cistos detectados em amostras cloradas, e em 60% dos cistos detectados em amostras ozonizadas. É importante salientar que o tempo de contato do cloro é 60 vezes maior do que o do ozônio. Guimarães *et al.* (2015) estudaram a inativação de cistos de *G. duodenalis* em solução aquosa pelo processo oxidativo avançado (POA) peroxidação assistida por radiação ultravioleta (H₂O₂/UV). Os autores apontaram que, em média, 42% dos cistos observados por RID após o POA apresentaram alterações de forma e/ou fluorescência.

▪ **Eficiência da ozonização na inativação de cistos de *Giardia duodenalis* (escala de bancada)**

Não foi possível quantificar ozônio na saída da coluna de contato, indicando que todo o ozônio aplicado foi consumido ou estava em solução como residual. Foi detectado um residual de oxidante de 0,1 mg·L⁻¹.

• **RID**

Após a ozonização, foram observadas diversas alterações de forma dos cistos, não necessariamente com redução de fluorescência. Cistos com fluorescência fraca também apresentaram alterações de forma. No entanto, ainda foi possível detectar cisto com padrões de forma e fluorescência (Figura 4).

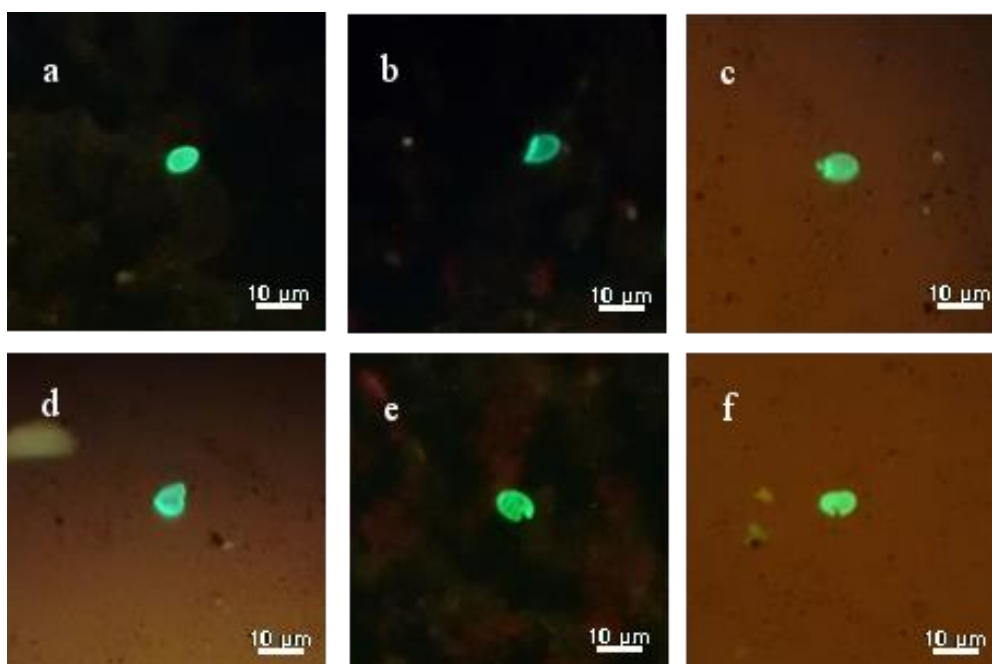


Figura 4. Cistos de *Giardia duodenalis* após ozonização. Cisto padrão (a); cisto com forma alterada e fluorescência fraca (b) e (c); cisto com forma alterada (d); cisto com parede rompida (e) e (f)

• **PMA-PCR**

A amostra ozonizada apresentou amplificação: a) banda mais intensa, quando não utilizado PMA; e b) banda com intensidade reduzida, quando empregado PMA (Figura 5).

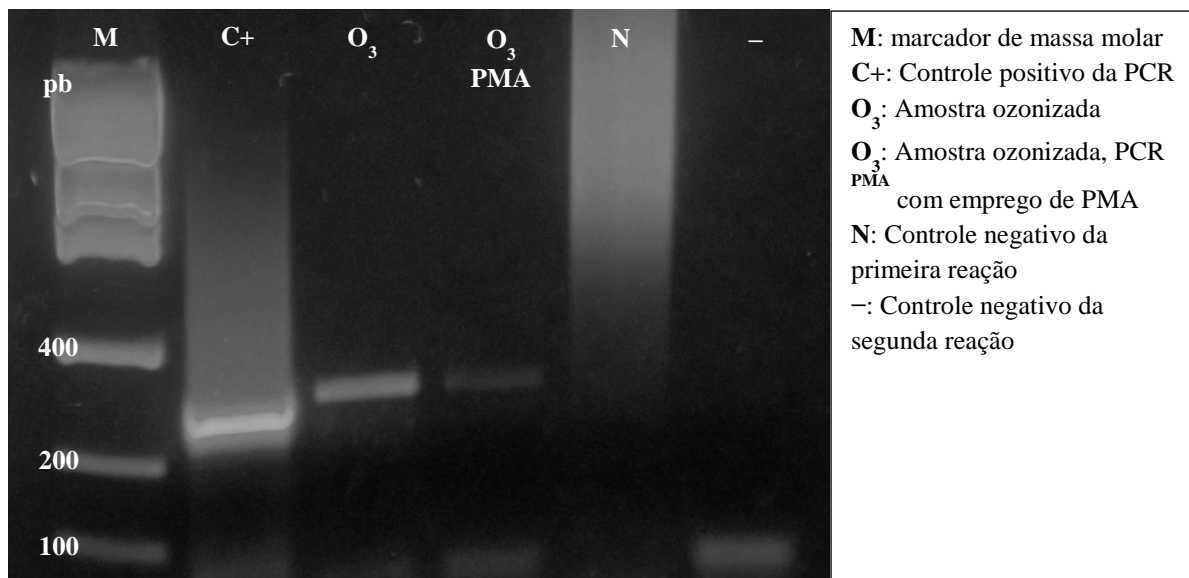


Figura 5. Visualização do produto da segunda reação.

▪ Inativação de *Escherichia coli*

A concentração de *E.coli* (NMP/100 mL) na entrada das ETA variou entre $1,5 \cdot 10^3$ e $2,9 \cdot 10^4$, com média de $7,7 \cdot 10^3$. A pré-cloração garantiu concentração remanescente < 1 em todas as coletas, com eficiências de inativação entre 3,2 e 4,5 log. A pré-ozonização proporcionou remanescentes de *E.coli* entre < 1 e 41 NMP/100 mL, com eficiências de inativação entre 2,1 e 3,7 log. Em média, as eficiências de inativação de *E.coli* foram de 3,7 e 3,1 log, com emprego de cloro e ozônio, respectivamente. O teste t de Student indicou que essa diferença não é estatisticamente significativa ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

CONCLUSÕES

A detecção de cistos de *Giardia* spp. na entrada das ETA 3 e 4 foi frequente ao longo do período avaliado. Elevadas concentrações da forma infectante desse protozoário patogênico no principal manancial de abastecimento público do município de Campinas - SP ressaltam a importância da adoção de sistemas de desinfecção mais eficientes contra organismos resistentes.

Os dados analisados sugerem que existe uma forte correlação entre a concentração de cistos de *Giardia* spp. na entrada das ETA e a vazão afluyente às ETA, de modo que menores vazões implicam em maiores concentrações do parasito.

A detecção de cistos foi mais frequente em amostras ozonizadas, porém, as concentrações mínima e máxima foram mais elevadas nas amostras cloradas.

Foi indicado que não há diferença estatisticamente significativa entre as concentrações médias de cistos detectados após a pré-cloração e a pré-ozonização.

Nas condições avaliadas, a pré-cloração foi capaz de causar alterações de forma e/ou fluorescência com maior frequência do que a pré-ozonização.

A observação por RID indica que a maioria dos cistos foi danificada na ozonização em bancada. O resultado obtido por meio da conjugação do corante vital PMA com a técnica molecular PCR corroborou a hipótese gerada a partir da visualização dos cistos por RID. Desse modo, é possível concluir que a viabilidade dos cistos foi comprometida e, portanto, a condição de ozonização aplicada foi eficiente em inativar uma elevada concentração de cistos.

Em média, as eficiências de inativação de *E.coli* foram de 3,7 e 3,1 log, quando empregados cloro e ozônio, respectivamente. O teste t de Student ($\alpha = 0,05$) indicou que essa diferença não é estatisticamente significativa.

RECOMENDAÇÕES / PRÓXIMAS ETAPAS

Recomenda-se:

- avaliar a possibilidade de aumentar o tempo de contato do ozônio com a água nas ETA 3 e 4.
- investigar a existência de relação entre resultados obtidos com o uso de PMA-PCR e resultados obtidos em experimentos de infectividade animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALONSO, J.L., AMORÓS, I., GUY, R.A. Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. *Parasitology Research*, v.113, p.2671-2678, 2014.
2. APHA/AWWA/WEF (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION/AMERICAN WATER AND WASTEWATER ASSOCIATION/WATER ENVIRONMENT FEDERATION). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd ed., Baltimore, Maryland, USA. 1496p., 2012.
3. ANA (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS). *Conjuntura dos recursos hídricos do Brasil – Encarte especial sobre a crise hídrica*, 2014. Disponível em <<http://conjuntura.ana.gov.br/docs/crisehidrica.pdf>>. Acesso em: 4.mar.2016.
4. APPELBEE, A.J.; FREDERICK, L.M.; HEITMAN, T.L.; OLSON, M.E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Veterinary Parasitology*, v.112, n.4, p.289-294, 2003.
5. BALDURSSON, S., KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004 - 2010. *Water Research*, v.45, p. 6603-6614, 2011.
6. CANTÚSIO NETO, R., SANTOS, L.U., SATO, M.I.Z., FRANCO, R.M.B. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, Southeast Brazil. *Water Science and Technology*, v.62, n.1, p.217-222, 2010.
7. DANIEL, L.A. (Coordenador). *Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável*. São Carlos: Rima Editora. 139p., 2001.
8. DE REGNIER, D.P., COLE, L., SCHUPP, D.G., ERLANDSEN, S.L. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river and tap water. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, n.5, p. 1223-1229, 1989.
9. FRANCO, R.M.B., ROCHA-EBERHARDT, R., CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *cryptosporidium* oocysts and *giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.43, n.2, p. 109-111, 2001.
10. GOTTSCHALK, C., LIBRA, J.A., SAUPE, A. *Ozonation of water and wastewater: a practical guide to understanding ozone and its applications*. 2ed. Wiley, 378p., 2010.
11. GUIMARÃES, J.R., SANTOS, L.U., FRANCO, R.M.B., GUADAGNINI, R.A. Inativação de cistos de *Giardia duodenalis* por peroxidação e peroxidação assistida por radiação ultravioleta. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.20, n.2, p. 159-164, 2015.
12. HOPKINS, R.M.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *Journal of Parasitology*, v.83, n.1, p.44-51, 1997.
13. JACOBI, P. R.; CIBIM, J.; LEAO, R. S. Crise hídrica na macrometrópole Paulista e respostas da sociedade civil. *Estudos Avançados*, São Paulo, v.29, n.84, p.27-42, 2015.
14. KARANIS, P. *Giardia* and *Cryptosporidium*: Occurrence in water supplies. In: *Encyclopedia of Environmental Health*, p.946-954, 2011.
15. KARANIS, P., KOURENTI, C., SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of water and health*, v.5, n.1, p. 1-38, 2007.
16. LIBÂNIO, M. *Fundamentos de qualidade e tratamento de água*. Campinas: Editora Átomo. 494p., 2010.

17. PASCHOALATO, C.F.P.R., TRIMAILOVAS, M.R., DI BERNARDO, L. Formação de subprodutos orgânicos halogenados nas operações de pré-oxidação com cloro, ozônio e peroxônio e pós-cloração em água contendo substância húmica. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.13, n.3, p. 313-322, 2008.
18. RICHTER, C.A. *Água: métodos e tecnologias de tratamento*. São Paulo: Blucher. 340 p., 2009.
19. ROBERTSON, L.J. Introduction to *Giardia duodenalis*: The Parasite and the Disease. In: ROBERTSON, L.J. *Giardia as a Foodborne Pathogen*. Springer, p.1-7, 2013.
20. SANASA (SOCIEDADE DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA E SANEAMENTO S/A), 2014. Disponível em: <http://www.sanasa.com.br>. Acesso em: 23.mar.2016.
21. SANTOS, L.U., ALVES, D.P., GUARALDO, A.M.A., CANTUSIO NETO, R., DURIGAN, M., FRANCO, R.M.B. Infectivity of *Giardia duodenalis* cysts from UV light-disinfected wastewater effluent using a nude Balb/c mouse model. *ISRN Parasitology*, v. 2013, p.1-7, 2013.
22. USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). *Alternative disinfectants and oxidants – Guidance manual*, 1999.
23. WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). *Guidelines for Drinking-Water Quality*, 2nd ed., Geneva: WHO, 2002.