

Entrega em Set/88  
já depois do  
Simpósio

### III SIMPOSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITARIA E AMBIENTAL (SILUBESA)

Sistema de Colecta, Tratamento e Disposição Final de Esgotos  
Estudo correlacional da remoção de indicadores bacterianos de  
contaminação fecal num sistema de lagoas de estabilização (Frielas -  
Portugal)

M. Jenny do Nascimento  
Técnico Superior Principal da DGQA

J. Tiago Nunes Mexia  
Prof. Associado Convidado/Dept. Matemática  
FCT/UNL

J. Santos Oliveira  
Prof. Catedrático/Dept. Ambiente  
FCT/UNL

#### RESUMO:

Neste estudo mostra-se a vantagem de alargar a bacteria tradicional de indicadores de contaminação fecal por inclusão de *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens*.

#### 1. Introdução

O objectivo usual e imediato do exame bacteriológico de águas e de águas residuais, é a detecção da poluição fecal, humana ou animal, cujos agentes constituem perigo para a saúde pública, pelos patogénicos que a eles andam associados.

Tradicionalmente, os Coliformes fecais e os *Streptococci* fecais, têm sido usados como indicadores para detectar a poluição fecal humana e animal.

Um organismo indicador dessa situação deve ser definido, segundo ORAGUI 1982, do seguinte modo:

- a) Deve ser um biotipo predominante na água residual e excretado

pelo homem e animais;

- b) Estar presente e ocorrer em maior número que os patogénicos a ele associados;
- c) Ser incapaz de proliferar em número tão elevado como os patogénicos entéricos, no meio aquático;
- d) Ser mais resistente aos desinfectantes, no meio aquático, que os patogénicos;
- e) Ser cultivado e enumerado, recorrendo a técnicas simples, que permitam identificação não ambígua BUTTIAUX e MOSSEL 1961; BONDE 1963; 1966; ORAGUI 1982.

Contudo, é improvável que qualquer dos organismos, escolhidos como indicadores, preencha todos os requisitos apontados. Por esta razão outras bactérias e leveduras têm sido objecto de investigação e analisado o seu significado como "novos indicadores". Seleccionamos, a *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens*, para esse efeito.

O objectivo do nosso estudo foi avaliar a remoção dos Coliformes Fecais, *Streptococci* Fecais, *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens*, em lagoas de estabilização, instaladas na Estação de Tratamento de Frielas (Loures). Segundo o esquema da Fig. 1.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Colheita de amostras e enumeração bacteriana.

Amostras de água residual bruta e de efluentes das lagoas A1, F1 e M1 (Figura 1), foram colhidas em frascos de vidro esterilizados e transportados para o laboratório, em caixas isotérmicas refrigeradas.

Coliformes fecais, *Streptococci* fecais e *Clostridium perfringens* foram enumerados pelo método das membranas filtrantes (Millipore; tipo HAWG 0450).

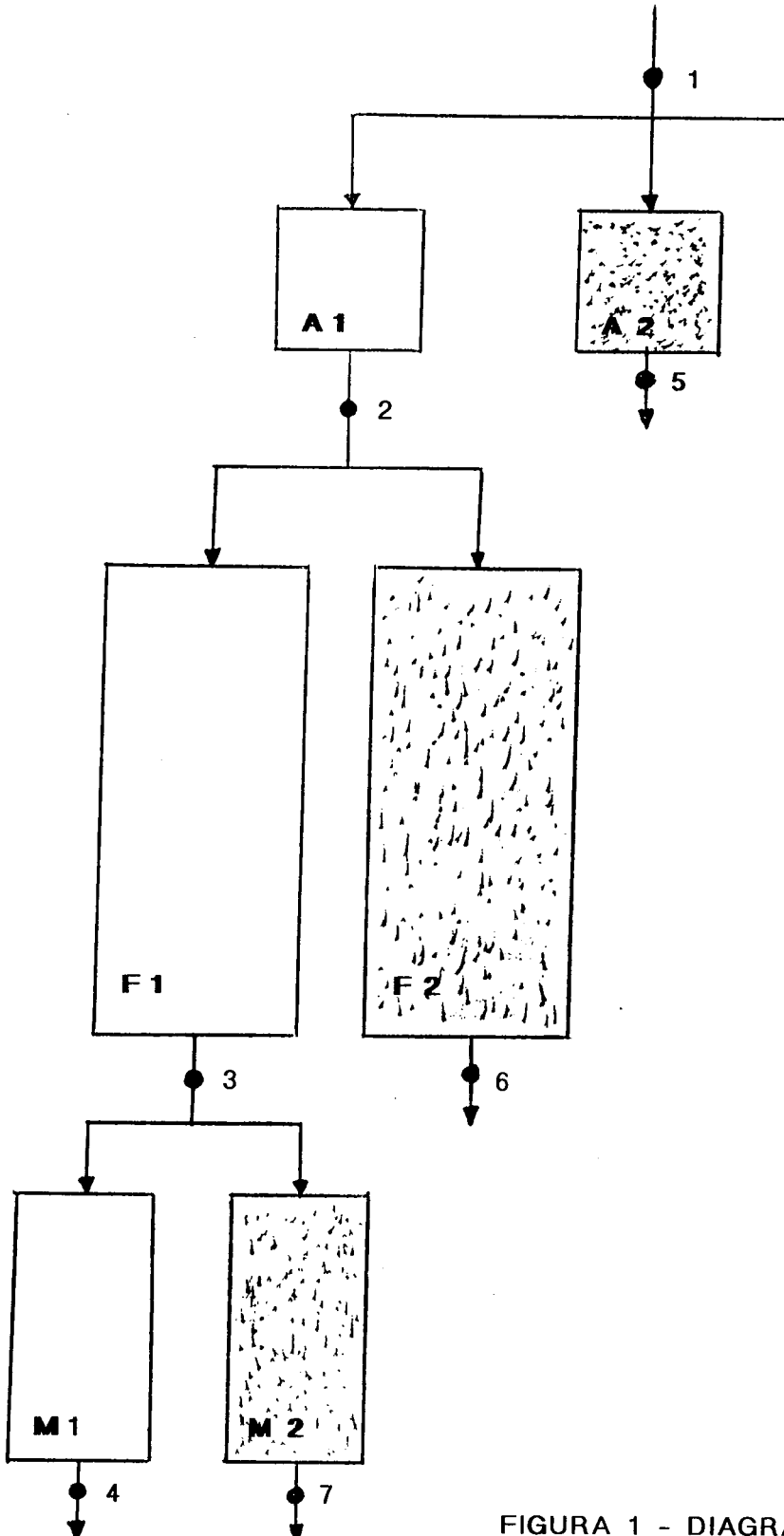


FIGURA 1 - DIAGRAMA DE CIRCUITOS E  
PONTOS DE COLHEITA

Para a enumeração dos Coliformes fecais, foram usadas almofadas saturadas com caldo de lauril sulfato a 0,1%. A incubação foi efectuada a 43°C, durante 24 horas.

O *Clostridium perfringens* foi enumerado em Agar Perfringens, tendo como suplementos oleandomicina, polimicina B e Sulfadiazina; a incubação foi efectuada em reactores anaeróbicos, incubados a 73°C, durante 48 horas.

Para a enumeração da *Pseudomonas aeruginosa* foram espalhadas, em placas de Base de Agar para *Pseudomonas*, com suplemento de cetrimide e de ácido nalidíxico, porções apropriadas de diluições decimais, com o auxílio de uma ansa de vidro esterilizada, em forma de L - incubação 25°C - 48 horas - *Streptococci* Fecais Agar KF para *Streptococci* 37°C - 48 horas.

Para a efectuação das diluições decimais foi utilizado soluto de Ringer estéril, também usado na filtração e lavagem dos funis.

## 2.2. Amostragem

O período de amostragem para o primeiro ano, decorreu entre 3/9/1984 e 7/10/85. O segundo período foi de 4/11/1986 a 29/6/1987, altura em que a avaria simultânea de três bombas, tornaram a estação experimental inoperante.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Remoção global de patogénicos

A remoção observada foi de uma potência de 10, para os indicadores tradicionais, e nenhuma remoção nos dois novos indicadores na lagoa anaeróbia. A1. Nas lagoas facultativa e de maturação, respectivamente F1 e M1, obteve-se a remoção de uma potência de 10 para qualquer dos indicadores estudados.

Os valores das médias geométricas das concentrações dos microorganismos analisados, no efluente, das lagoas constam do Quadro 1.

	Média Geométrica					
	A1		F1		M1	
	Afl.(1)	Efl.(2)	Afl.(2)	Efl.(3)	Afl.(3)	Efl.(4)
Coliformes Fecais (1)	$1,9 \times 10^7$	$6 \times 10^6$	$6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$
<i>Streptococci</i> Fecais (1)	$5,2 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$	$8,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	$9,6 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$2,2 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$8,4 \times 10^1$
<i>Clostridium perfringens</i> (2)	$3,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$

Quadro 1 - Média geométrica do afluente e efluente das três lagoas A1; F1 e M1. Remoção dos quatro microorganismos estudados nos dois períodos de amostragem.

(1) - Nº colônias 100 ml<sup>-1</sup>

(2) - Nº colônias ml<sup>-1</sup>

Os parâmetros estatísticos usuais das taxas de remoção observados, respectivamente nas lagoas A1, F1 e M1, constam dos Quadros 2, 3 e 4.

	$\bar{X}$	$\sigma$	$\sigma^2$	CVX	Xmax	Xmin	n
Coliformes Fecais	0,464	0,861	0,741	185,599	0,897	-3,250	22
<i>Streptococci</i> Fecais	0,744	0,196	0,038	26,266	0,978	0,100	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,658	0,190	0,036	28,921	0,900	0,082	20
<i>Clostridium perfringens</i>	0,522	0,370	0,137	70,942	0,957	-0,500	18

Quadro 2 - Média aritmética e restantes parâmetros estatísticos referentes às taxas de remoção dos quatro microorganismos estudados na Lagoa A1 nos dois períodos de amostragem.

	$\bar{X}$	$\sigma$	$\sigma^2$	CV $\bar{X}$	X <sub>max</sub>	X <sub>min</sub>	n
Coliformes Fecais	0,900	0,217	0,047	24,072	1,000	0,037	22
<i>Streptococci</i> Fecais	0,915	0,171	0,029	18,899	0,999	0,188	22
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	0,981	0,134	0,018	15,077	0,999	0,421	20
<i>Clostridium</i> <i>prefringens</i>	0,840	0,134	0,018	15,924	0,988	0,533	18

Quadro 3 -Média aritmética e restantes parâmetros estatísticos referentes às taxas de remoção dos quatro microorganismos estudados na Lagoa F1 nos dois períodos de amostragem.

	$\bar{X}$	$\sigma$	$\sigma^2$	CV $\bar{X}$	X <sub>max</sub>	X <sub>min</sub>	n
Coliformes Fecais	0,757	0,610	0,372	80,527	0,998	-1,750	22
<i>Streptococci</i> Fecais	0,612	1,225	1,502	200,164	0,998	-4,833	22
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	-0,381	2,516	6,330	-660,106	0,905	-10,500	20
<i>Clostridium</i> <i>prefringens</i>	-0,022	1,541	2,374	7047,708	0,980	-5,140	18

Quadro 4 -Média aritmética e restantes parâmetros estatísticos referentes às taxas de remoção dos quatro microorganismos estudados na Lagoa M1 nos dois períodos de amostragem.

### 3.2. Correlação de remoções

No Quadro 5 temos uma coluna por ponto de amostragem. Cada uma destas colunas encontra-se dividida em 6 troços, cada um dos quais corresponde a um par de organismos sendo estes representados por:

- CF - Coliformes Fecais;
- SF - *Streptococci* Fecais;

Pa - *Pseudomonas aeruginosa*;  
Cp - *Clostridium perfringens*.

Por cada par indica-se:

r - coeficiente de correlação estimado;

t - estatística do teste "t" para a hipótese de ausência de correlação, bem como o resultado da transformação de FISHER dada por:

$$Z = \frac{1}{2} \log \left( \frac{1 + r}{1 - r} \right)$$

Os níveis de significância utilizados foram:

X - 5%;  
XX - 1%;  
XXX - 0,1%;

Pontos Comparados	Afluente Bruto			Efluente lagoa anaeróbia (A1)			Efluente lagoa facultativa (F1)			Efluente lagoa de maturação (M1)		
	r	t	z	r	t	z	r	t	z	r	t	z
CF/ /SF	0,1271	0,7581	0,1278	0,2701	1,6598	0,2770	0,6891	5,6255***	0,8472	0,2701	1,6598	0,2770
CF/ /PA	0,2834	1,7485	0,2914	-0,0022	0,0131	-0,0032	0,3916	2,5180**	0,4137	-0,0022	0,0132	-0,0022
CF/ /CP	0,3445	2,171*	0,3592	0,2322	1,4122	0,2365	0,3962	2,5531**	0,4192	0,2322	1,4122	0,2365
SF/ /PA	-0,1107	0,6588	-0,1111	-0,3283	2,0559*	0,3409	0,6932	5,6899***	0,8541	-0,3283	2,0559	-0,3409
SF/ /CP	0,0204	0,1206	0,0204	-0,1477	0,8833	-0,1488	0,3296	2,0652*	0,3424	-0,1477	0,8833	-0,1488
PA/ /CP	0,1889	1,1378	0,1912	0,3420	2,1531*	0,3564	0,2817	1,7367	0,2895	0,3420	2,1531*	0,3564

Quadro 5 - Correlações das remoções

Como se pode verificar pelo exame do quadro 5:

- a) Para o par CF/SF tem-se correlação positiva significativa ( $p \leq 0,1\%$ ) nos efluentes da lagoa facultativa;
- b) Também é nos efluentes da lagoa facultativa que se tem correlação positiva significativa ( $p \leq 1\%$ ) para os pares CF/Pa e CP/Cp;
- c) Para o par SF/Pa encontra-se correlação negativa significativa ( $Cp \leq 5\%$ ) nos efluentes da lagoa anaeróbica e da lagoa de maturação havendo correlação positiva significativa ( $p \leq 0,1\%$ ) nos efluentes da lagoa facultativa;
- d) Para o par SF/Cp encontra-se correlação significativa positiva ( $p \leq 5\%$ ) nos efluentes da lagoa facultativa;
- e) Para o par Pa/Cp encontram-se correlações significativas positivas nos efluentes das lagoas anaeróbica e da lagoa de maturação.

### 3.3. Comparação de correlações

Utilizando-se os valores dados pela transformação de FISHER procedem-se, à comparação das correlações que, para cada par de organismos, se tinham para os quatro pontos de amostragem.

Assim, segundo a técnica descrita em apêndice, começou por realizar-se um teste de chi-quadrado para a hipótese de existência de diferenças entre as correlações para os quatro pontos de amostragem.

Os pontos de amostragem eram:

- 1 - efluente bruto;
- 2 - efluente da lagoa anaeróbica;
- 3 - efluente da lagoa facultativa;
- 4 - efluente da lagoa de maturação.

Quando esta hipótese é rejeitada utilizamos uma modificação do método de comparação múltipla de SCHEFFÉ cujos resultados apresentamos no quadro 6.



Pares de pontos	CF/SF	CF/PA	CF/CP	SF/PA	SF/CP	PA/CP
X <sup>2</sup>	13,1081**	3,9094	3,5488	28,1535***	4,6088	2,1313
1/2	-0,1997	0,3931	0,1642	0,3075	0,2264	-0,2211
1/3	-0,9616	-0,1637	-0,0803	-1,2920	-0,4310	-0,1316
1/4	0,0969	0,3138	0,4839	-0,0890	0,0944	0,2241
2/3	-0,7619	-0,5568	-0,2446	-1,5995	-0,6574	0,0895
2/4	0,2966	-0,0793	0,3197	-0,3966	-0,1320	0,4452
3/4	1,0586	0,4775	0,5643	1,2029	0,5254	0,3557

Quadro 6 - Comparação de correlações.

Neste quadro temos uma coluna para cada par de organismos.

Em cada coluna, na primeira linha, encontra-se a estatística do teste de chi-quadrado. As linhas seguintes correspondem aos pares de locais. Se o valor que se encontra numa dada linha for  $< -1$  [ $>1$ ] a correlação correspondente ao primeiro local é significativamente inferior [superior] à do segundo local do par. Para cada coluna a probabilidade de erro para o conjunto das comparações feitas é de 5%.

Da análise do quadro 6 vê-se que apenas existem diferenças significativas entre correlações para os pares CF/SF e SF/Pa. Para o primeiro destes pares a correlação para o ponto 3 é significativamente superior à do ponto 1. Finalmente para o par SF/Pa a correlação para o ponto 3 é significativamente superior às restantes.

#### 4. Conclusão

A variação das correlações de ponto para ponto de amostragem e a existência inclusivé de correlações negativas significativas apontam para a não existência de redundância na informação recolhida ao passar-se a trabalhar com 4 organismos em vez das 2 tradicionais. Será pois de recomendar a utilização desta "bateria alargada" de indicadores tanto mais que como referimos não existirem, provavelmente, indicadores ótimos.

AnexoMetodologia estatística

Sejam  $\rho_i^*$ ,  $i = 1,2,3,4$ , os coeficientes de correlação estimados para um dado par de organismos e para os quatro pontos de amostragem. Então, ver KENDAL & STUART (1958, pg 391), podemos admitir que, as

$$Z_i = \frac{1}{2} \log \left( \frac{1 + \rho_i^*}{1 - \rho_i^*} \right) ; i = 1,2,3,4$$

são normais, independentes, com valores médios

$$\mu_i = \frac{1}{2} \log \left( \frac{1 + \rho_i}{1 - \rho_i} \right) ; i = 1,2,3,4$$

e variância  $\delta^2 = 1/34$ . Então, debaixo da hipótese

$$H_0 : \rho_1 = \rho_2 = \rho_3 = \rho_4$$

a estatística

$$X = 34 \left[ \sum_{i=1}^4 Z_i^2 - \frac{1}{4} \left( \sum_{i=1}^4 Z_i \right)^2 \right]$$

distribui-se como um chi-quadrado com 3 graus de liberdade.

Por outro lado, sendo  $x_{4,1-q}$  o quantil para a probabilidade  $1 - q$  da distribuição do chi-quadrado com 4 graus de liberdade, uma modificação directa do método de comparação múltipla de SCHEFFÉ diz-nos que, quando

$$|Z_i - Z_j| > \sqrt{\frac{1}{17} x_{4,1-q}}$$

podemos concluir, com probabilidade de erro não superior a  $q$ , que  $\rho_i \neq \rho_j$ .

BIBLIOGRAFIA

- BONDE, G. J., "Bacterial Indicators of Water Pollution" 2nd ed. Tekn, Forlag, Copenhagen, 1963.
- BONDE, G. J., "Bacteriological Methods for Estimation of Water Pollution" Hlth. Lab. Sci., 3, 1966, p 124-128.
- BUCHNAN, R. E. e GIBBONS, N. E. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 8 th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1974.
- BUTTIAUX, R. e MOSSEL, D. A. A., " The Significance of Various Organisms of Faecal Origin in Foods and Drinking Water" J. Appl. Bact 24, 1961, p 353-364.
- CABELLI, V. J., KENNEDY e LEVIN, M. A. "*Pseudomonas aeruginosa* - Faecal Coliform Relationships in Estuarine and Fresh Recreational Waters". J. Wat. Pollut. Cont. Fed 48(2) 1976, p 367-376.
- C.E.T.E.S.B. - "Lagoas de Estabilização", Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, S. Paulo, Brasil, 1985.
- DUTTKA, B. J. "Coliforms are an inadequate index of Water Quality" Jour. Environ. Health 36(1), 1973, p 39-46.
- KENDAL M & STUART, A - The Advanced Theory of Statistics, Vol. I - Charles Griffin & CO - Londres, 1958.
- GELDREICH, E. E.; CLARK, H. P.; HUFF, C. B. "A Study of Pollution Indicators in a Waste Stabilization Pond" J. Wat. Pollut. Cont. Fed 36 (11), 1964, p 1372-1379.
- GLOYNA, E. F., "Bassins de Stabilization des Eaux Usées, O.M.S., Geneve 1972.
- MARA, D. D., "Sewage Treatment in Hot Climats" John Wiley, London, 1976.
- OLIVEIRA, J. S.; NASCIMENTO, M. J.; SOUSA, J. G. - Sistemas de Lagunagem no Tratamento de Efluentes Domésticos e Industriais em Zonas Litorais. Estoril, II Jornadas Técnicas da A.P.R.H., 1985.
- OLIVEIRA, J. S., SOUSA J. G. "Lagooning In Portugal" Wastes Quat. Bull (in print) 1986.

ORAGUI, J. I. - "Bacteriological Methods for the Distinction Between Human and Animal Faecal Pollution". PhD Thesis, Department of Civil Engineering, University of Leeds, 1982.

SOUSA, J. G. - Tratamento de Aguas Residuais por Lagoas de Estabilização - A Instalação Experimental de Frielas, I Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental - A.P.R.H. - 1984, Lisboa.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 25th ed. Amar. Publ. Health Ass. Inc New York 1980.