



ADENOVÍRUS HUMANO COMO RASTREADOR DE POLUIÇÃO FECAL HUMANA EM BALNEÁRIOS

Nicole Mariele Santos Röhnelt – nicolemariele@gmail.com
Universidade Feevale.
93120600 – São Leopoldo – Rio Grande do Sul

Tatiana Moraes da Silva Heck – tatianaheck@terra.com.br
Universidade Feevale.

Larissa Ferreira de Jesus – larissafj@gmail.com
Universidade Feevale.

Daniela Montanari Migliavacca Osorio – danielaosorio@feevale.br
Universidade Feevale.

Carlos Augusto do Nascimento – nascimento@feevale.br
Universidade Feevale.

Resumo: Áreas turísticas com locais para banhos localizadas distantes de centros urbanos têm atraído visitantes em função da inexistência da presença humano, e assim livre de poluição antrópica. Na grande maioria destes locais a qualidade da água para banho é atestada pela percepção visual de seus visitantes, principalmente através da turbidez e cor, geralmente, o usuário entende que quanto mais incolor, melhor sua qualidade. Este estudo realizou 10 coletas de amostras de água de dois locais utilizados como balneários, banho e prática de esporte, na bacia hidrográfica do Rio dos Sinos com o objetivo de classificar a qualidade destas águas, segundo o preconizado pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 274/2000, exclusivamente o parâmetro Número mais Provável de *Escherichia coli* em 100 mililitros de amostra (NMP/100mL). Em adição a este parâmetro foi incorporado na avaliação a presença de Adenovírus, como forma de rastrear a poluição humana presente nestas águas, já que pela sua localização, longe de centros urbanos, o indicador utilizado pela Resolução CONAMA não pode identificar a fonte específica das bactérias, se humanas ou de outros animais de sangue quente. Os resultados indicam presença superior a 8000 NMP/ 100 mL, nos dois locais avaliados, em pelo menos uma das coletas realizadas. Segundo o estabelecido na Resolução CONAMA os dois pontos avaliados obtiveram resultados de qualidade de água satisfatório para uso como água de contato direto. Os resultados para Adenovírus indicam a presença de fezes humanos em 75% do período monitorado.

Palavras-chave: Água, Balneabilidade, Adenovírus, *Escherichia coli*.

HUMAN ADENOVIRUS AS POLLUTION TRACKER OF HUMAN FECES IN RECREATIONAL WATERS



Abstract: Tourist attractions with freshwater bathing areas located away from urban centers have attracted visitors due to the absence of human presence, thus, free from anthropic pollution. In many of these places the water quality is confirmed by the visual perception of its visitors, mainly through turbidity and color, users usually understand that less colored waters have a better quality. In this study, ten (10) water samples were collected in two (2) recreational water areas, used for bathing and water sports in the Sinos River Basin, aiming at classifying the water quality based on the Most Probable Number (MPN) of *Escherichia coli* according to the Regulation No. 274/2000 by the National Council of Environment (CONAMA, in Portuguese). In addition, the presence of Adenovirus was also evaluated as a means to track human pollution in these waters, since their location, away from urban centers, the use of the indicator proposed by the legal regulation do not allow the precise identification of bacterial contamination source, from human or other warm-blooded animals. The results indicate more than 8,000 MPN/100 mL in both investigated places in at least one sample. According to CONAMA regulation guidelines, both places presented satisfactory results when it comes to primary contact recreational water. The results for Adenovirus indicate the presence of human feces in 75% of the monitoring period.

Keywords: Water, Freshwater bathing, Adenovirus, *Escherichia coli*.

1. INTRODUÇÃO

Estudos sobre a qualidade das águas de balneários e seus impactos na saúde de seus usuários não são recentes (STEVENSON, 1953). Via de regra a presença humana afeta a qualidade da água, portanto é essencial o controle da qualidade de águas recreacionais. Águas recreacionais podem expor seus usuários a diversas doenças causadas por microrganismos, incluindo os que estão naturalmente presentes na água, mas principalmente os agentes infecciosos resultantes da poluição fecal, principalmente humano (FEWTRELL & KAY, 2015).

O governo brasileiro regulou nos anos 2000, através das resoluções CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) número 274/2000 e 357/2005 (CONAMA, 2000; CONAMA, 2005) os critérios para a balneabilidade. As resoluções promovem o gerenciamento da qualidade da água para contato direto, e determina que os governos Federal, Estadual e Municipal são os responsáveis pela sua execução e publicidade dos resultados, estimulando ainda articulação com a sociedade para sua efetivação. No Estado do Rio Grande do Sul programas para a efetivação do monitoramento em atendimento ao disposto em lei têm ficado limitados a balneários com grande número de usuários, balneários municipais localizados no interior do Estado não têm sido avaliados, ou se o são, não tem seus resultados divulgados (FEPAM, 2016).

O indicador de poluição fecal utilizado pela legislação brasileira são bactérias que, embora presente nas fezes humanas, também são encontradas nas fezes de animais de sangue quente (HACHICH *et al.*, 2012; POTERA, 2012), tornando assim o indicador pouco confiável, já que não é possível dizer que as bactérias encontradas são provenientes exclusivamente de esgoto doméstico humano.

Para balneários localizados distantes de conglomerados urbanos e próximos de pequenas fazendas, locais que geralmente possuem criação de gado, porcos entre outros animais é essencial o rastreamento da fonte de poluição. Atualmente existem diferentes propostas para o rastreamento da fonte de poluição humana, entre eles a cafeína e os vírus humanos (LINDEN *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2015).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a condição de balneabilidade em dois diferentes locais, no período novembro a dezembro de 2015, observando o que determina a legislação brasileira para o grupo bactérias (especificamente *Escherichia coli*) e também a identificação de adenovírus humano (HAdV) como proposta de indicador da presença de fezes humanas.



2. REFERENCIAL TEÓRICO

A bacia hidrográfica do Rio dos Sinos, localizada no Rio Grande do Sul - Brasil, possui diversos balneários, a maioria com acesso público gratuito, embora o rio principal da bacia, Rio dos Sinos é o 4º mais poluído do Brasil (ABES, 2016). A bacia hidrográfica citada possui arroios e rios localizados distantes dos centros urbanos, sendo alguns deles, usados como balneários públicos.

Entre os diversos locais utilizados como balneários desta bacia destaca-se dois balneários utilizados para recreação, a Cascata do Chuvisqueiro e o Parque das Laranjeiras. Todos pertencem a bacia hidrográfica do Rio dos Sinos, mas com origem em rios diferente.

O primeiro local é conhecido como Cascata do Chuvisqueiro que pertence ao Rio Rolante, localizado no município de Riozinho, que conta com 4.571 habitantes (IBGE, 2015). A cascata é um dos principais pontos turísticos da cidade, com setenta e dois metros de queda d'água. O balneário é frequentado por pessoas em busca de turismo e o local é caracterizado por ser uma área rodeada de serras e cursos d'água de leito acidentado, possuindo várias cascatas, morros e uma vegetação ombrófila com resquícios de Mata Atlântica que contribuem para uma série de paisagens que estimulam o turismo ecológico (CAMPING CASCATA DO CHUVISQUEIRO, 2016).

Outro local muito frequentado na bacia é o Parque das Laranjeiras no rio Paranhana, principal afluente do rio do Sinos. O local é usado para a prática de esportes de contato direto com a água, principalmente rafting e canoagem, também é sede de competições e eventos nacionais e internacionais relacionadas a essas práticas (PREFEITURA DE TRÊS COROAS, 2016). Localizado no município de Três Coroas, que conta com a população de 26.092 habitantes (IBGE, 2015).

O balneário Parque das Laranjeiras possui acesso gratuito, e o balneário localizado no município de Riozinho é particular, sendo cobrado ingresso para acesso a cascata, porém tem sua utilização estimulada pela prefeitura deste município. Todos estes balneários devem atender o preconizado na Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000 que define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras (CONAMA, 2000), porém nunca foi realizado monitoramento de qualidade para este fim, ou se houve não foi dada publicidade ao fato.

A Resolução citada, classifica as águas destinadas à recreação de contato primário como próprias e impróprias, sendo a primeira subdivididas nas seguintes categorias de acordo com o valor máximo de *E. coli* por 100mL de água (tabela 1).

Tabela 1 – Categoria de qualidade e o número máximo de microrganismos, segundo a resolução CONAMA nº 274/00

Categoria	Subdivisão	<i>E. coli</i> (NMP/100mL)
Própria	Excelente	200
	Muito boa	400
	Satisfatória	800
Imprópria		Acima de 800; última coleta superior de 2000.

Fonte – Adaptado de Resolução CONAMA nº 274/00

Segundo essa resolução para a avaliação das águas destinadas a recreação são necessárias um conjunto de amostras coletadas durante cinco semanas seguidas. Para a determinação da categoria 80% dessas amostras não podem ultrapassar o valor máximo mostrado na tabela 1 (CONAMA, 2000).

O patógeno *E. coli* utilizado na pesquisa pertence à família *Enterobacteriaceae* e é liberado no meio ambiente em grande quantidade a partir das fezes de pessoas e animais de sangue quente. É usado como marcador de contaminação, pois o mesmo só está presente em esgotos, efluentes, águas naturais e solos que tenham recebido contaminação fecal recente (CONAMA, 2000).

Os HAdV pertencem a família *Adenoviridae* e ao gênero *Mastadenovirus*, apresentam DNA de fita dupla e são não envelopados, transmitidos de forma fecal-oral, por consumo de água e irrigações com água não tratada, bem como por águas recreacionais após contato direto por meio de mucosas da pele ou por inalação (WYN-JONES & SELLWOOD, 2001). Apresentam mais de 67 sorotipos humanos divididos em 7 subgrupos de A a G (MATSUSHIMA *et al.*, 2013), sendo a espécie F considerada adenovírus fastidiosos, Ad40 e AdV41, causadores de gastroenterites em humanos (SHENK *et al.*, 1996; HORWITZ *et al.*, 1996). Acomete principalmente crianças de 3 a 5 anos e também adultos, podendo ser assintomática ou com quadros febris e vômitos, sendo comum também infecções respiratórias e miocardites (JIANG & CHU, 2004; TAVARES *et al.*, 2005).

Outrossim em monitoramento de qualidade hídrica, quando avaliado vírus, é comum a escolha de HAdV para indicação da presença de vírus humano, por suas implicações sobre a saúde pública, por detecções frequentes em ambientes aquáticos bem como a sua resistência à remoção ou à inativação em sistemas de tratamento (DAVISON *et al.*, 2003; LECHEVALLIER & AU, 2004).

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta de amostras

Foram realizadas coletas durante 5 semanas consecutivas, conforme definido na legislação CONAMA 274 de 2000, entre os meses de novembro e dezembro. As amostras foram obtidas em 2 balneários distintos: Cascata do Chuvisqueiro em Riozinho e Parque das Laranjeiras em Três Coroas (Figura 1). Foi coletado 1 amostra de água em cada local uma vez por semana, totalizando 10 amostras ao final.

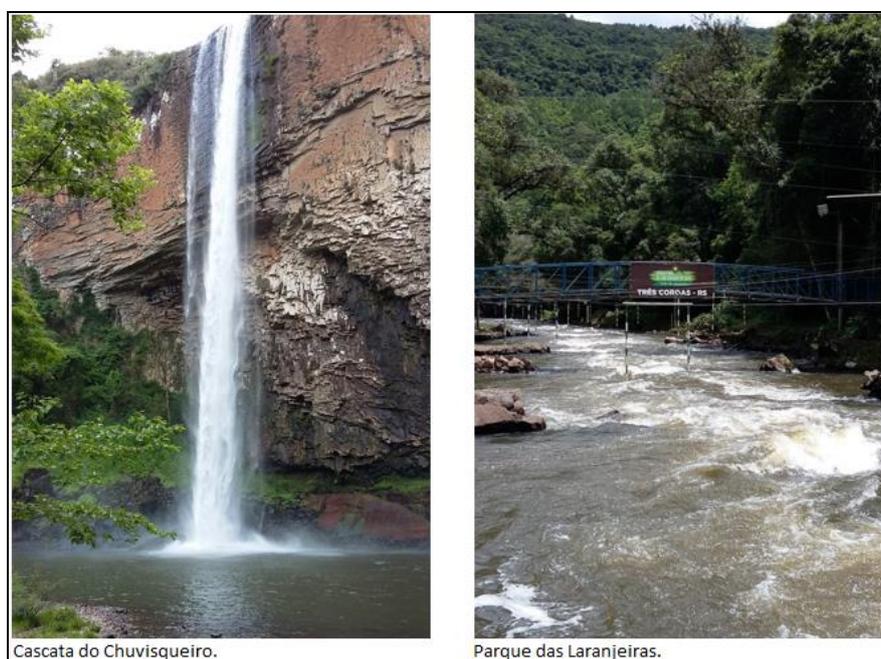


Figura 1 – Locais monitorados no estudo.

As coletas das amostras foram realizadas em frascos estéreis e encaminhadas para o laboratório de microbiologia da Universidade Feevale em caixas térmicas.

3.2. Análises microbiológicas das amostras de água



A quantificação da bactéria *E. coli* foi realizada com substrato cromógeno e para a detecção de HAdV as amostras primeiramente foram centrifugadas para posterior extração de ácidos nucleicos e qPCR (PCR quantitativo).

A análise bacteriológica foi realizada em até 12h após a coleta através do Kit Colilert® seguindo a metodologia do fabricante. Este método é utilizado para detecção e quantificação da bactéria *E. coli* a partir de um substrato cromogênio. O método é definido e aprovado pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. A bactéria *E. coli* utiliza a enzima β -glucuronidase para metabolizar o substrato 4-metil-umbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG), apresentando uma coloração fluorescente (IDEXX, 2016).

Para essa análise é necessário 100mL de amostra onde é adicionado o substrato cromogênio e homogeneizando até completa dissolução do reagente. A solução é transferida para uma cartela contendo 97 poços (48 pequenos e 49 grandes) e selada para a distribuição uniforme entre os poços. A cartela foi incubada por 24 horas a 37° C em uma estufa.

Para a quantificação é necessário a contagem dos poços utilizando para a leitura luz UV. É positivo para *E. Coli* os poços que apresentarem fluorescência. Os poços grandes e pequenos são contados e com o auxílio de uma tabela disponibilizada pelo fabricante é determinado os resultados em NMP (Número Mais Provável) em 100 ml de água.

A concentração das amostras foi através do método de ultracentrifugação. Neste método 36mL das águas coletadas são submetidos a uma centrifugação a 41000xg por 3 horas a 8°C. Em seguida o sobrenadante é descartado e o pallet é ressuspendido utilizando 1mL de TE (pH 8) e armazenado em -80°C para posterior análise molecular.

A extração dos ácidos nucleicos foi realizada utilizando o kit de extração Spin Plus 250 (Biopur®), conforme recomendações do fabricante, usando de volume inicial 200 μ l de cada amostra de água concentrada através da ultracentrifuga. Se necessário o DNA viral era armazenado em um freezer a -80°C.

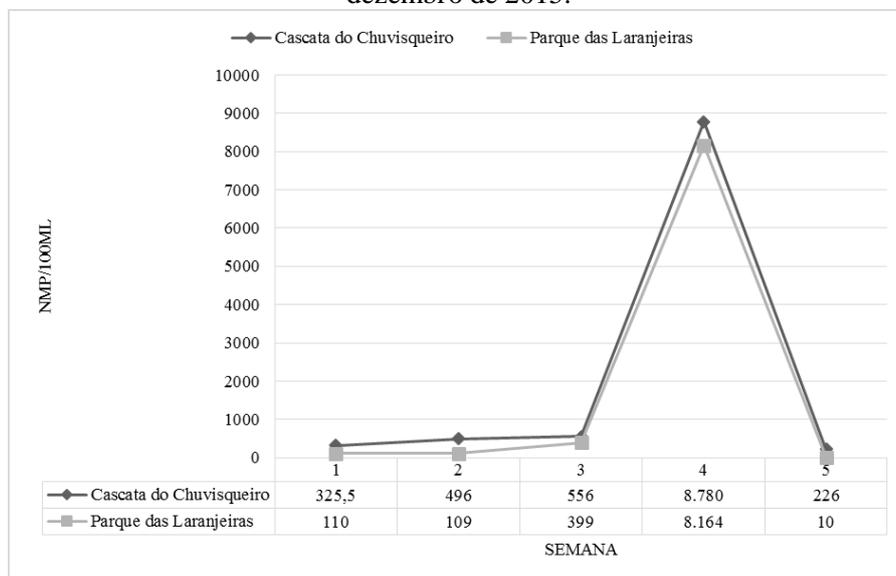
Para a quantificação do genoma viral foi realizada a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) através dos primers VTb2 HAdvC-f (5'-GAGACGTACTTCAGCCTGAAT-3') e VTb2 HAdvC-r (5'-GATGAACCGCAGCGTCAA-3') (WOLF *et al.*, 2010). As qPCR foram realizadas com *kit* comercial Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), seguindo metodologia recomendada pelo fabricante e usando protótipos de amostras positivas de HAdV para controle positivo. A ampliação do genoma viral foi através de um termociclador iQ5™ Bio-Rad. Para cada 25 μ L da reação, 12,5 μ L foi usado de mix, 1 μ L de cada primer, 5,5 μ L de água estéril e 5 μ L de ácido nucleico extraído de cada amostra. Para chegar a especificidade da ampliação foi feita uma curva de com 5 diluições do controle positivos. Em cada corrida foi utilizado controles negativos para confirmar que não houve contaminação. Todas as amostras e controles positivos e negativos foram analisadas em duplicata.

4. RESULTADOS

4.1. *E. coli* como indicador para balneabilidade

Os resultados de quantificação da bactéria *E. coli* durante o período avaliado está apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Número mais provável de *E. coli* em 100mL de água durante cinco semanas de novembro a dezembro de 2015.



Em 100% das amostras foram detectadas a presença da bactéria *E. coli*. A quantificação variou de 10 a 8.870 NMP/100mL e apresentou um pico durante a 4ª semana de coleta.

Analisando as concentrações de *E. coli* nos pontos de coletas observou-se que a Cascata do Chuvisqueiro apresentou valores elevados quando comparado com o Parque das Laranjeiras.

Segundo a resolução CONAMA (2000), ambos os balneários se classificaram como águas próprias para a recreação. As águas do balneário da Cascata do Chuvisqueiro foram subclassificadas como “Satisfatória”, por não ultrapassar 800 NPM/100mL em 80% das coletas. Já as do Parque das Laranjeiras foram subclassificadas em “Muito boa” por não ultrapassar 400 NPM/100mL em 80% das coletas.

4.2. HAdV como rastreador de efluente humano

Para HAdV, 70% (7/10) das amostras avaliadas foram positivas. Os resultados obtidos no monitoramento são apresentados na Tabela 3. Em todos os balneários analisados foram encontradas amostras positivas, sendo que 60% (3/5) das amostras obtidas na Cascata do Chuvisqueiro e 80% (4/5) das amostras obtidas no Parque das Laranjeiras foram positivas.

Tabela 2 – Detecção de HAdV em amostras de água durante o período de monitoramento (novembro a dezembro de 2015) por qPCR

Semana	Amostra de água	
	Cascata do Chuvisqueiro	Parque das Laranjeiras
1	+	+
2	+	+
3	-	-
4	-	+
5	+	+

"-": Resultado negativo "+" : Resultado positivo



5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Os locais avaliados estão localizados em locais isolados, distantes de cidades ou aglomeração de pessoas, a montante destes locais existem pequenos sítios com um reduzido número de residências, embora este cenário remeta seus frequentadores a um local livre de poluição antrópica não é esta a realidade quando avaliados os resultados desta pesquisa.

Os resultados obtidos para o parâmetro *E. coli* indicam a presença de fezes oriundas de animais de sangue quente, porém não permitem assertividade para a fonte, que pode ser humana ou de outros animais de sangue quente (HACHICH *et al.*, 2012; POTERA, 2012). Desta forma uma avaliação que considere exclusivamente este indicador não é confiável, principalmente para zonas rurais, onde a presença de criações de gado, suínos e aves é comum.

A avaliação utilizando o parâmetro HAdV permite afirmar que estes locais são afetados diretamente pela presença humana, assim o uso combinado de coliformes e vírus pode aumentar significativamente a confiabilidade de segurança de águas balneáveis, já que ocorrem surtos de doenças de veiculação hídrica mesmo quando a contagem de coliformes satisfaz o que determina a legislação (TCHOBANOGLIOUS *et al.*, 2003).

Os resultados finais desta pesquisa indicam a necessidade de avaliação permanente de balneabilidade nestes locais, tanto pelo resultado para a bactéria *E. coli* na coleta da quarta semana de avaliação, que apresentou resultado quatro vezes maior do que o sugerido na Resolução CONAMA 274/2000, tanto pela presença de HAdV em mais de 50% do período monitorado nos dois locais avaliados.

6. REFERENCIAS

ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, Seção Minas Gerais. Disponível em: <http://www.abes-mg.org.br/visualizacao-de-clippings/ler/2082/os-rios-mais-poluidos-do-brasil>. Acesso em: 21 de jun. 2016.

Camping Cascata do Chuvisqueiro. Disponível em: <http://cascatachuvisqueiro.com.br/> Acesso em: 22 mai. 2016.

CONAMA N°274, de 29 de novembro de 2000. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=272> Acesso em: 22 mai. 2016.

CONAMA N°357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> Acesso em: 22 mai. 2016.

DAVISON, A. J.; BENKO, M.; HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology*, v.84, p.2895–2908, 2003.

FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/balneabilidade.asp>. Acesso em: 21 jun. 2016.

FEWTRELL, L.; KAY, D. Recreational Water and Infection: A Review of Recent Findings. *Curr Envir Health Rpt* 2:85–94. DOI 10.1007/s40572-014-0036-6, 2015.

HACHICH, E. M.; DI BARI, M.; CHRIST, A. P. G.; LAMPARELLI, C. C.; RAMOS, S. S.; SATO, M. I. Z. Comparison of thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* densities in freshwater bodies. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v.43 n.2 p. 675-681, 2012.



HORWITZ, M. S.; FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. Adenoviruses. *Virology*, Philadelphia, v.2 p.2149-2171, 1996.

IDEXX. Disponível em: <<https://www.idexx.com/water/products/colilert.html>> Acesso: 04 jul 2016.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2015/estimativa_2015_TCU_20160211.pdf> Acesso em: 17 jul. 2016.

JIANG, S. C.; CHU, W. PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *J Appl Microbiol*, 97, p.17-28, 2004.

LECHEVALLIER, M. W.; AU, K. Water treatment and pathogen control: Process efficiency in achieving safe drinking water. World Health Organization (WHO), 2004.

LINFEN, R.; FLECK, D. J.; VECCHIA, A. D.; DO NASCIMENTO, C. A.; FABRES, R. B.; STAGGEMEIER, R.; SPILKI, F. R.; HEINZELMANN, L. S. Caffeine as an indicator of human fecal contamination in the Sinos River: a preliminary study. *Brazilian Journal of Biology (Online)*, v.75, p.81-84, 2015.

MATSUSHIMA, Y.; SCHIMIZU, H.; KANO, A.; NAKAJIMA, E.; ISHIMARU, Y.; DEY, S. K.; WATANABE, Y.; ADACHI, F.; MITANI, K.; FUJIMOTO, T.; PHAN, T. G.; USHIJIMA, H. Genome Sequence of a Novel Virus of the Species Human Adenovirus D Associated with Acute Gastroenteritis. *Genome Announc.* v.1 n.1 p.1-2, 2013.

PREFEITURA DE TRÊS COROAS. Disponível em: <<http://www.trescoroas.rs.gov.br/turismo-e-servicos/pontos-turisticos>> Acesso em: 22 mai. 2016.

POTERA, C. Caffeine in wastewater is a tracer for human fecal contamination. *Environ Health Perspect*, v.20 n.3 p.108-109, 2012.

RODRIGUES, M. T.; HENZEL, A.; STAGGEMEIER, R.; DE QUEVEDO, D. M.; RIGOTTO, C.; HEINZELMANN, L.; DO NASCIMENTO, C. A.; SPILKI, F. R. Human adenovirus spread, rainfalls, and the occurrence of gastroenteritis cases in a Brazilian basin. *Environmental Monitoring and Assessment (Dordrecht. Online)*, v.187, p.720, 2015.

SHENK, T.; FIELDS, B.; KNIPE, D.; HOWLEY, P.; CHANOCK, R.; MELNICK, J.; MONATH, T.; ROIZMAN, B.; STRAUS, E. Adenoviridae - The viruses and their replication. *Virology*, Philadelphia, v.2, p.2011-2148, 1996.

STEVENSON, A. H. Studies of Bathing Water Quality and Health. *American Journal of Public Health and the Nations Health*: May 1953, Vol. 43, No. 5_Pt_1, pp. 529-538. doi: 10.2105/AJPH.43.5_Pt_1.529. Disponível em http://ajph.aphapublications.org/doi/pdf/10.2105/AJPH.43.5_Pt_1.529.

TAVARES, T. M.; CARDOSO, D. D. P.; BRITO, W. M. E. D. Vírus Entéricos Veiculados por água: Aspectos Microbiológicos e de Controle de Qualidade da Água. *Rev Patol Trop.* 34 (2), p.85-104, 2005.



TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, H. D. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. Metcalf & Eddy, 4th ed., Boston, Massachusetts: McGraw-Hill, 2003.

WYN-JONES, A. P.; SELLWOOD, J. A review: Enteric viruses in aquatic environment. J Appl Microbiol. 91 p.945-962, 2001.

WOLF, S.; HEWITT, J.; GREENING, G. E. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. Appl Environ Microbiol. 76, p.1388–1394, 2010.

REALIZAÇÃO



CORREALIZAÇÃO



INFORMAÇÕES

abes-rs@abes-rs.org.br
51 3212.1375