

Vírus e microrganismos entéricos em balneários da bacia hidrográfica do Rio do Sinos-RS

Nicole Mariele Santos Röhnelt¹

Tatiana Moraes da Silva Heck²

Rodrigo Staggemeier³

Sabrina Esteves De Matos Almeida⁴

Carlos Augusto do Nascimento⁵

Resumo

O entendimento sobre a fonte de contaminação fecal nos meios hídricos é uma importante ferramenta para o estabelecimento de medidas de preservação ambiental e a contínua avaliação dos balneários se faz necessário para assegurar a saúde dos banhistas. Este estudo avaliou a presença de microrganismos entéricos em amostras de água por meio da quantificação de *Escherichia coli* e de *Mastadenovirus* de origem animal e humana em balneários da Bacia Hidrográfica do Rio do Sinos. As coletas foram realizadas em quatro períodos, entre 2015 e 2017, totalizando 59 amostras de águas, oriundas de três balneários: Balneário Parque das Laranjeiras, Cascata do Chuvisqueiro e Balneário João Martins Nunes. As amostras foram analisadas pelo método Colilert® e pela reação em cadeia da polimerase quantitativa. Observou-se que a maioria dos períodos analisados se enquadraram na classificação imprópria para banho, de acordo com a resolução brasileira de balneabilidade. Verificou-se uma correlação positiva entre a quantificação de bactéria e a precipitação pluviométrica em dois balneários. As análises revelaram a presença de *Human mastadenovirus* em 86,4% das amostras, *Canine mastadenovirus* em 42,4%, *Bovine mastadenovirus* em 37,3% e *Porcine mastadenovirus* em 28,8%, com cargas virais que variam de 10⁵ a 10¹⁰cg/L. Os resultados indicaram uma contaminação fecal de origem difusa em todos os balneários. Também foi possível evidenciar que a avaliação de diferentes bioindicadores podem gerar informações mais adequadas acerca da contaminação da água, evidenciando a importância do monitoramento dos recursos hídricos.

Palavras-chave: Balneabilidade. *Escherichia coli*. *Mastadenovirus*; Precipitação.

Abstract

Understanding the source of faecal contamination in water is an important tool for establishing environmental preservation measures and the continuous assessment of recreational waters is necessary to ensure the health of visitors. This study evaluated the presence of enteric microorganisms in water samples through quantification of the bacteria *Escherichia coli* and the detection of animal and human *Mastadenovirus* in three recreational waters of the hydrographic basin of the Sinos River. The samplings were made in four periods, between 2015 and 2017, totalizing 59 water samples from the Watering place Park of the Laranjeiras, Chuvisqueiro waterfall and the Watering place João Martins Nunes. The samples were analyzed by Colilert® method and by quantitative polymerase chain reaction. It was observed that most of the analyzed periods fit the improper bath classification, according to the Brazilian resolution of bathing. There was a positive correlation between quantification of bacteria with precipitation in two areas. The analyses revealed the presence of *Human mastadenovirus* in 86.4% of the samples, *Canine mastadenovirus* in 42.4%, *Bovine mastadenovirus* in 37.3% and 28.8% of *Porcine mastadenovirus* with viral loads ranging from 10⁵ to 10¹⁰cg/L. The results of the present study indicate a fecal contamination from diffuse sources. It was also possible to notice that the evaluation of various bioindicator scan generate more complete data about the contamination of water, highlighting the importance of monitoring water resources.

1 Biomédica (Feevale). Mestranda em Virologia na Universidade Feevale. nicolemariele@gmail.com

2 Biomédica (Feevale). Doutoranda em Qualidade Ambiental na Universidade Feevale. tatianaheck@terra.com.br

3 Doutor em Qualidade Ambiental (Feevale). Professor da Universidade Feevale. rstaggemeier@gmail.com

4 Doutora em Genética e Biologia Molecular (UFRGS). Pós-doutorado na área de Bioinformática (UFRGS). Professora do Programa de Pós-graduação em Qualidade Ambiental da Universidade Feevale. sabrinae@feevale.br

5 Doutor em Qualidade Ambiental (Feevale). Professor do Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental da Universidade Feevale. nascimento@feevale.br

Keywords: Recreational waters. *Escherichia coli*. *Mastadenovirus*; Precipitation.

1 Introdução

Balneários são áreas recreacionais afastados de centros urbanos que se destacam por sua natureza exuberante, sua vegetação e quedas d'água, bem como pela pouca interferência humana. Estes locais são destinados a recreação de contato primário com o meio hídrico e devem estar de acordo com a resolução nº 274/2000 do CONAMA, o qual estabelece parâmetros e indicadores específicos para assegurar as condições de balneabilidade (CONAMA, 2000; 2005).

Os balneários utilizados no estudo pertencem a Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos (BHRS), a qual inclui 32 municípios na região leste do Rio Grande do Sul (RS) por aproximadamente 3.800 km² (FIGUEIREDO *et al.*, 2010). Os balneários mais populares da região encontram-se no trecho médio da bacia, caracterizada por atividades rurais, como agropecuária, cultivo de arroz e pastagens, os quais já demonstram processos de destruição vegetal e avanço industrial.

Além do trecho médio a BHRS possui também o trecho superior, caracterizado pela atividade rural com menor densidade populacional e industrial, e por fim, o trecho inferior com maior densidade populacional, resultando no aumento de poluentes como esgotos domésticos e industriais que são despejados no curso hídrico do Rio dos Sinos sem devido tratamento prévio e adequado (OLIVEIRA e HENKES, 2013). De forma geral, estes três trechos caracterizam a bacia como um todo e a interação geoquímica entre eles é importante na qualidade do ambiente.

No Brasil as águas destinadas à balneabilidade são reguladas de acordo com a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) número 274 do ano 2000. Esta resolução distingue as águas próprias das impróprias de acordo com o número máximo de coliformes termotolerantes ou de *E. coli*. Em adição, as águas próprias são divididas em excelente, muito boa e satisfatória. Assim, para classificar as águas é necessário um conjunto de amostras obtidas durante cinco semanas, colhidas no mesmo local. Estas não podem ultrapassar 80% do número máximo estipulado pela legislação, conforme a Tabela 1 (CONAMA, 2000).

A bactéria *E. coli* é liberada no meio ambiente através de fezes humanas e de animais de sangue quente, sendo encontrada em esgotos, efluentes e águas que receberam contaminação fecal recente (CONAMA, 2000). Entretanto, estudos recentes demonstram a fragilidade desse marcador como indicador de contaminação fecal. Segundo Pinto *et al.* (2010) o uso desse indicador é baseado na suposição que existe uma relação entre a bactéria e a presença de microrganismos patogênicos de origem fecal. Da mesma forma, Lopes *et al.* (2015) evidenciou

que não é possível distinguir a origem da contaminação fecal, humana ou animal, uma vez que a *E. coli* não difere entre eles, como também não excluir a presença de outros patógenos, como protozoários e vírus entéricos.

Tabela 1 - Categoria de qualidade e o número máximo de *E. coli*-resolução CONAMA nº 274/00

Categoria	Subdivisão	<i>E. coli</i> (NMP (Número Mais Provável) /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

Para suprir essa necessidade é indicado o uso adicional de outros marcadores para avaliar a qualidade da água, como os vírus, aumentando assim a confiabilidade dos resultados. Dentre os vírus bioindicadores de qualidade ambiental estão os *Mastadenovirus* (AdV), capaz de infectar mamíferos. Esses pertencem a família *Adenoviridae*, habitualmente utilizados em pesquisas e detectados em diversas matrizes ambientais (SANTOS *et al.*, 2008).

Os AdVs são vírus de veiculação hídrica e responsáveis por doenças gastroentéricas, pneumonias, conjuntivites e infecções respiratórias, sendo associados a capacidade de causar infecção em humanos e animais. A transmissão ocorre pela via fecal-oral e são caracterizados por sua estabilidade no meio ambiente e no trato gastrointestinal. Ou seja, são liberados através de fezes de humanos e animais contaminados, podendo permanecer no ambiente por longos períodos (STAGGEMEIER *et al.*, 2015). A maioria dos AdV são hospedeiro específico, possíveis de rastrear a fonte da contaminação fecal no ambiente. Assim, pode-se diferenciar por biologia molecular o *Human mastadenovirus* (HAdV), *Bovine mastadenovirus* (BAdV), *Canine mastadenovirus* (CAV) e *Porcine Mastadenovirus* (PoAdV), permitindo o rastreamento da contaminação.

Em vista disto, este trabalho objetivou analisar a qualidade da água pela presença de microrganismos entéricos, em três balneários distintos, através da detecção e quantificação da bactéria *E. coli* e de AdV humano e animal, assim como buscar possíveis associações do volume de precipitação com o nível de contaminação por *E. coli*.

2 Metodologia

2.1 Delineamento de estudo

Os balneários utilizados no estudo foram: Cascata do Chuvisqueiro, Parque das Laranjeiras e Balneário João Martins Nunes. Esses balneários pertencem ao trecho médio da

BHRS e possuem características próprias, conforme tabela 2 e figura 1. Os locais foram escolhidos segundo aos seguintes critérios: a) pertencentes a municípios diferentes; b) balneários com cursos hídricos distintos; c) locais com poucos moradores próximos, distantes de centros urbanos; d) destinados a recreação de contato primário que recebem quantidades significativas de visitantes durante o verão.

Tabela 2. Principais características dos três balneários estudados

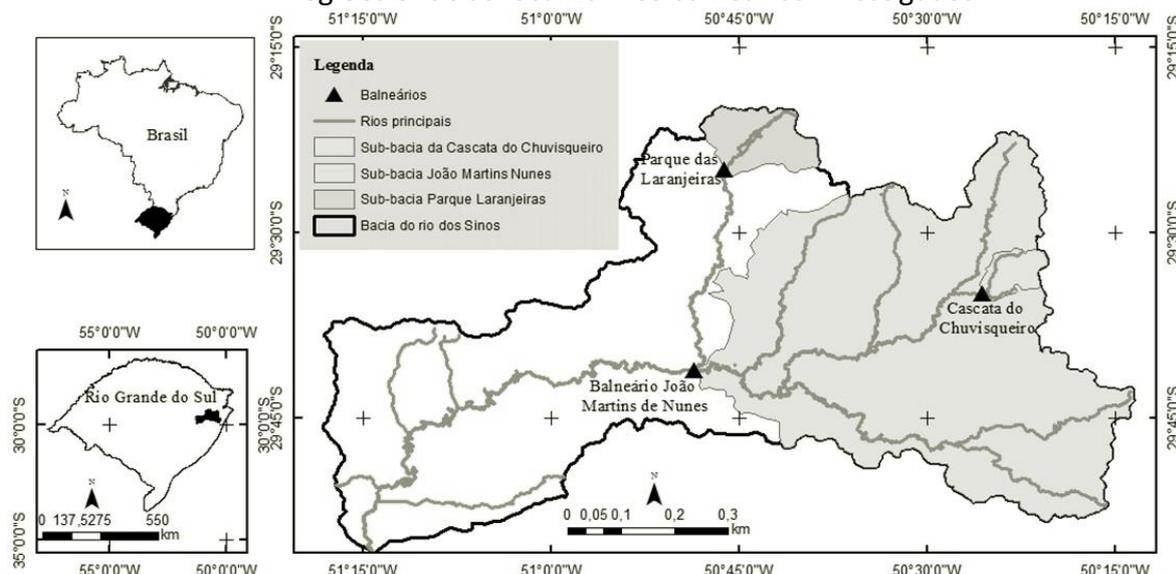
	Cascata do Chuvisqueiro	Parque das Laranjeiras	Balneário J. M. Nunes
Local	Riozinho	Três Coroas	Taquara
Rio	Rio Rolante (Arroio Chuvisqueiro)	Rio Paranhana	Rio dos Sinos
Área (IBGE, 2016)	239,559 km ²	185,539 km ²	457,881 km ²
Habitantes (IBGE, 2017)	4.607 pessoas	26.589 pessoas	57.544 pessoas
População bovina	1.926 cabeças	2.884 cabeças	24.204 cabeças
População suína	531 cabeças	37 cabeças	1.191 cabeças
Esgotamento sanitário adequado (IBGE, 2010)	48,90%	89,10%	83,60%
Características entorno	Jusante do rio	Jusante do rio	Montante do rio
Características balneário	Privado; visitado principalmente no verão para banho, prática de rapel, trilhas ecológicas e camping. Poucos moradores próximos.	Privado; permite a prática de canoagem e rafting, podendo ser utilizado para camping. Poucos moradores próximos.	Público; frequentado por moradores próximos, banhistas durante o verão e por pescadores da região.
Fluxo de água	Médio	Alto	Baixo

Fonte: Pesquisa de campo; IBGE (2010); IBGE (2016); IBGE (2017).

A Cascata do Chuvisqueiro é uma propriedade particular, que tem como principal característica uma queda d'água de 72 metros, promovida pelo Arroio Chuvisqueiro que é um afluente do Rio Rolante. Pertencente ao município de Riozinho que conta com 4.607 habitantes (IBGE, 2017), entre as atividades realizadas no local destaca-se o banho, prática de rapel, trilhas ecológicas e camping (CAMPING CASCATA DO CHUVISQUEIRO, 2016).

O Parque das Laranjeiras é localizado no município de Três Coroas, com 26.589 habitantes (IBGE, 2017), possui o Rio Paranhana como curso hídrico central e principal afluente do Rio dos Sinos. Conhecido como "rio que corre ligeiro" devido as suas corredeiras, é utilizado para prática de esportes, tais como rafting e canoagem, sendo sede de eventos nacionais e internacionais (PREFEITURA DE TRÊS COROAS, 2016).

Figura 1 - Imagem representativa da Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos, com destaque para as regiões onde se localizam os balneários investigados



Fonte: Lucheta; Kock; Martins; Schmitt (2018)

O Parque das Laranjeiras é localizado no município de Três Coroas, com 26.589 habitantes (IBGE, 2017), possui o Rio Paranhana como curso hídrico central e principal afluente do Rio dos Sinos. Conhecido como "rio que corre ligeiro" devido as suas corredeiras, é utilizado para prática de esportes, tais como rafting e canoagem, sendo sede de eventos nacionais e internacionais (PREFEITURA DE TRÊS COROAS, 2016).

Por fim, o balneário João Martins Nunes, local denominado popularmente como "Prainha", é localizado no município de Taquara, contando com 57.544 habitantes (IBGE, 2017). Local público e frequentado o ano todo por poucos moradores, com aumento considerável no verão com a chegada de banhistas (TAQUARA, 2016).

2.2 Amostragem

Foram coletadas amostras de água em frascos estéreis de 500mL nos três balneários citados. As coletas foram divididas em quatro períodos, sendo cada um composto por 5 semanas (uma coleta semanal), resultando em 5 coletas por período (Tabela 3). Ao total foram coletadas 59 amostras de água para análise bacteriana e viral, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Divisão dos períodos de coletas nos balneários

Local / Período	Período 1: novembro a dezembro de 2015	Período 2: janeiro a fevereiro de 2016	Período 3: novembro a dezembro de 2016	Período 4: janeiro a fevereiro de 2017	Total
Cascata do Chuvisqueiro	5 amostras	5 amostras	5 amostras	4 amostras*	19
Parque das Laranjeiras	5 amostras	5 amostras	5 amostras	5 amostras	20
Balneário João Martins Nunes	5 amostras	5 amostras	5 amostras	5 amostras	20

Fonte: Dados de pesquisa de campo. *uma coleta não pode ser realizada.

As datas foram primeiramente estabelecidas visando a resolução do CONAMA nº 274/00 para a análise bacteriana, onde preconiza o período de 5 semanas consecutivas. Após, para obter um diagnóstico completo, prolongado e para o uso em comparações, foram escolhidos intervalos entre cada período: reduzido (duas a três semanas) e maiores (dez meses).

2.3 Análise bacteriana

As análises bacterianas foram realizadas com o kit comercial Colilert® Quanti-Tray/2000. Para a quantificação foram adicionados o substrato em frasco estéril contendo 100 mL da amostra e homogeneizado até completa dissolução (diluições foram realizadas nas amostras quando necessário). A solução foi transferida para uma cartela contendo 97 poços, selada para a distribuição uniforme e incubada por 24 horas em estufa a 35°C \pm 0,5. Após a incubação foi realizado a leitura, sob luz UV, para visualização da fluorescência em poços positivos para *E. coli*. Neste método, a bactéria utiliza a enzima β -glucuronidase para metabolizar o substrato 4-metil-umbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG), apresentando uma coloração fluorescente. A quantificação é realizada conforme instruções do fabricante que determina por número mais provável (NMP) em 100mL de água (IDEXX, 2016).

2.4 Concentração viral

As amostras foram concentradas pelo método de ultracentrifugação, o qual utiliza 36 mL de água, submetidos a uma centrifugação a 41000xg por 3 horas a 8°C. O sobrenadante foi descartado e o pallet foi ressuspensão em 1 mL de TE (Tris EDTA pH 8,0).

2.5 Extração dos ácidos nucleicos e PCR Real Time

Foram utilizados 200 µL das amostras de água concentradas para a extração de ácidos nucleicos, realizado utilizando o kit de extração Spin Plus 250 (Biopur®) conforme recomendações do fabricante.

Para a detecção e quantificação do genoma viral foi realizada a reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR) através do *primer VTB2*, para a detecção de HAdV, e do *primer AdV*, para detecção e distinção de espécies. Primers são testes ou iniciadores para amplificação parcial da região da proteína hexon e detecção molecular de vírus (HAdV) e AdV), semelhante aos testes (PCR) utilizados para detecção de novo coronavírus.

As espécies de AdV foram diferenciadas através da análise da curva melting, a qual cada espécie viral tem uma temperatura específica: BAdV (85,5°C), PoAdV (83,5°C), CAV (82°C), e o HAdV com temperatura de 86°C (STAGGEMEIER *et al.*, 2015). A sequência de primers e a região conservada do genoma viral se encontram na tabela 4.

Tabela 4 - *Primers* e condições utilizadas para amplificação por qPCR de fragmentos genômicos de AdV utilizados no presente estudo.

Vírus	Gene Alvo	Primer		T° anelamento	Tamanho do Amplicon
		Nome	Sequência		
HAdV	Hexon	VTB2-HAdVCf	5'-GAGACGTACTTCAGCCTGAAT-3' ^a	55 °C	101 bp
		VTB2-HAdVCr	5'-GATGAACCGCAGCGTCAA-3' ^a		
AdV	Hexon	ADV-F1	5'-CAGTGGTCGTACATGCACAT-3' ^b	58 °C	130 bp
		ADV-R1	5'-TCGGTGGTGACGTCGTGG-3' ^b		

Fonte: ^a Sequência de primers reportados por Wolf et al. (2010).

^b Sequência de primers reportados por Vecchia et al. (2015).

A PCR *Real Time* foi realizada com kit comercial *Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), seguindo metodologia recomendada pelo fabricante e a ampliação do genoma viral foi através de um termociclador iQ5™ Bio-Rad. Para chegar à especificidade da ampliação foi utilizada uma curva de 5 diluições de controles positivos. Em cada corrida foram utilizados controles negativos para confirmar que não houve contaminação. Todas as amostras, incluindo os controles positivos e negativos, foram analisadas em duplicata.

2.6 Precipitação

As informações sobre o volume de precipitação ocorridas na bacia foram obtidas por buscas no *site AccuWeather*, que disponibiliza dados meteorológicos a partir de uma estação localizada no município de Taquara. Para a análise, foi somado a precipitação pluviométrica diária de dois dias anteriores a coleta (não foi acrescentado o dia da coleta já que elas eram realizadas no período da manhã). Estas informações foram utilizadas para verificar se a precipitação poderia ter influência nos níveis de contaminação por *E. coli*.

2.7 Análise estatística

Foram realizados testes estatísticos para: *i)* comparar cada período, entre os 3 balneários, para averiguar se houve comportamento semelhante (para quantificação de *E. coli* e, após, HAdV); *ii)* comparar o primeiro ano de estudo e o segundo ano de estudo, separando cada balneário (para quantificação de *E. coli* e, após, HAdV);; *iii)* comparação entre o volume de precipitação e a quantificação de *E. coli*. Para as análises foi utilizado o software SPSS.

3 Resultados

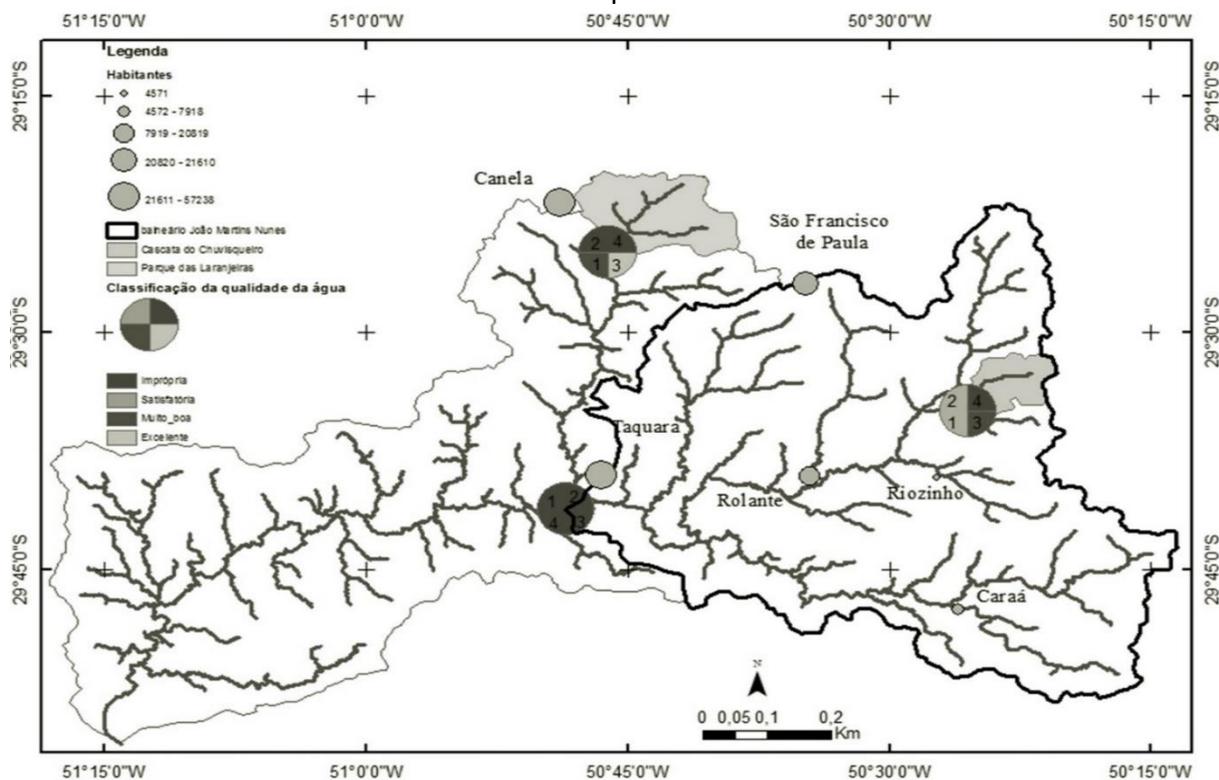
3.1 Detecção bacteriana

A presença da bactéria *E. coli* foi detectada em todas as amostras analisadas e em 52,5% delas observou-se resultados superiores ao valor máximo permitido estabelecido pela legislação (800 NMP/100mL). Nos 12 períodos investigados no trabalho (4 em cada balneário), de acordo com a resolução CONAMA 274/00, 5 foram classificados como próprios e 7 como impróprios para o contato primário. O maior valor detectado foi observado no terceiro período analisado, no Balneário João Martins Nunes (141.360 NMP/100mL), já o menor valor foi verificado no primeiro período de avaliação no Parque das Laranjeiras (10 NMP/100mL).

A qualidade da água do Balneário Cascata do Chuvisqueiro apresentou variação, desde muito boa até imprópria, sendo o terceiro período com a melhor classificação (muito boa) e o quarto com a pior (imprópria). A água do Parque das Laranjeiras também obteve classificação de própria a imprópria, sendo o primeiro período o mais bem classificado (muito boa) e o segundo e último período foram qualificados como impróprios. Por último, o Balneário João Martins

Nunes recebeu classificação de águas imprópria em todos os períodos analisados (Figura 2 e Tabela 5).

Figura 2 - Classificação de qualidade da água, segundo a resolução CONAMA 274 de 2000 de acordo com o período de coleta.



Fonte: Fonte: Lucheta; Kock; Martins; Schmitt (2018)

Tabela 5 - Quantificação de *E. coli* por coleta realizada (NMP/100mL).

LOCAL/PERÍODO	1	2	3	4	5	CONAMA
Parque Das Laranjeiras						
Período 1	110	109	399	8164	10	Muito boa
Período 2	5475	109	63	189	3.873	Imprópria
Período 3	41	85	31	41	63	Excelente
Período 4	14390	4170	1650	74	52	Imprópria
Cascata Do Chuvisqueiro						
Período 1	325,5	496	556	8780	226	Satisfatória
Período 2	644	341	231	189	1725	Satisfatória
Período 3	228	313	295	86	116	Muito boa
Período 4	8390	*	279	959	933	Imprópria
Balneário João Martins Nunes						
Período 1	1112	1553	1112	12033	3873	Imprópria
Período 2	9804	12997	17850	4106	7030	Imprópria
Período 3	8910	5200	2720	141360	9080	Imprópria
Período 4	39900	2460	1600	1720	3654	Imprópria

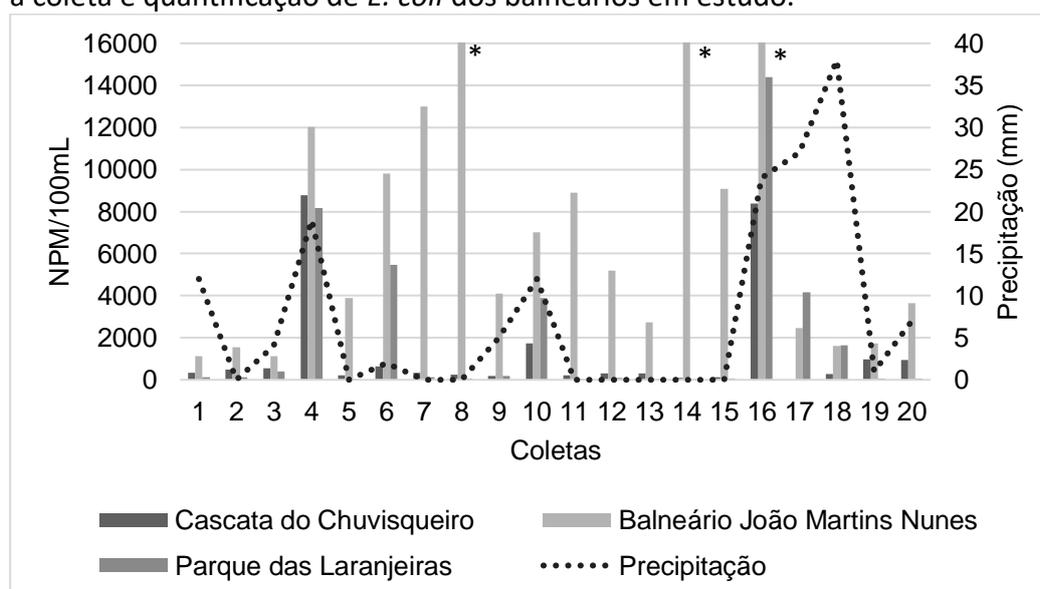
Fonte: dados de pesquisa de campo. *Coleta não realizada – devido as condições meteorológicas.

Aplicando a correlação de Pearson para comparar a quantificação bacteriana em cada períodos de coleta nos diferentes balneários, observamos que no primeiro período e no último período houve uma correlação significativa entre todos os balneários ($P=0,009$ e $P=0,001$), ou seja, a quantificação de *E. coli* apresentou atividade semelhante entre os balneários no período de coleta. Em comparação estatística entre o primeiro ano de estudo (período 1 e 2) e o segundo ano de estudo (períodos 3 e 4) não foram encontradas diferenças estatísticas em nenhum dos balneários em estudo.

3.2 Precipitação

Os dados de precipitação levantados no site AccuWeather nos dois dias anteriores as coletas são mostradas na figura 3, junto com a quantificação de *E. coli* encontrada em cada coleta. O maior índice pluviométrico foi encontrado no quarto período de coleta (38mm). As análises estatísticas de correlação de Pearson apresentaram correlação significativa entre a precipitação e a contaminação por *E. coli* no Balneário Parque das Laranjeiras ($P=0,009$) e entre a Cascata do Chuvisqueiro ($P=0,024$), com índice de correlação de Pearson de 0,566 e 0,515 respectivamente.

Figura 3 - Precipitação pluviométrica de acordo com o site AccuWeather dos dois dias anteriores a coleta e quantificação de *E. coli* dos balneários em estudo.



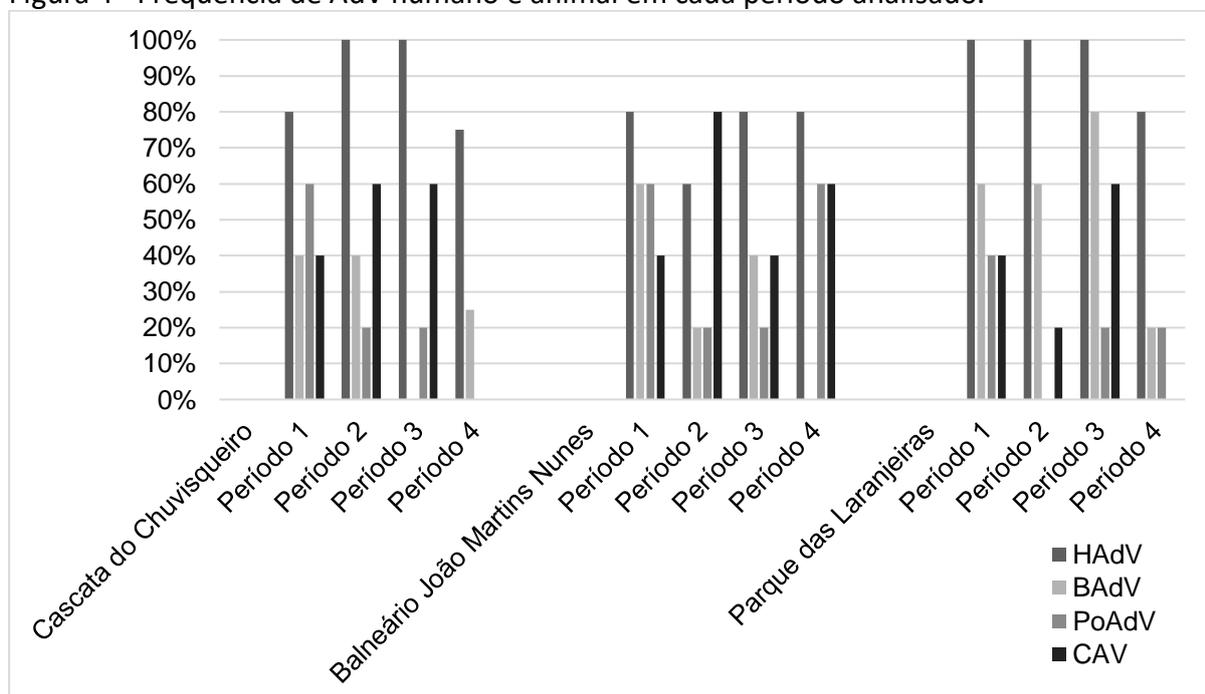
Fonte: Autores. * Valores superiores a 16.000 NPM/100mL (8: 17.850 NPM/100mL; 14: 141.360 NPM/100mL; 16: 39.900 NPM/100mL).

3.3 Detecção viral

Das 59 amostras analisadas 93,2% obtiveram presença de pelo menos um tipo de AdV (HAdV, BAdV, PoAdV e CAV), sendo que em 86,4% houve presença de HAdV; 42,4% de CAV; 37,3% de BAdV; e 28,8% de PoAdV. O Balneário Cascata do Chuvisqueiro apresentou 89,5% de amostras positivas para HAdV, seguido por 42,1% de CAV e 26,3% de BAdV e PoAdV. A frequência no Balneário João Martins Nunes foi semelhante ao primeiro, tendo 75% de HAdV, seguido de 55% de CAV, 40% de PoAdV e 30% de BAdV. Por último o Balneário Parque das Laranjeiras obteve com maior frequência 95% de HAdV, seguido de 55% de BAdV, 30% de CAV e 20% de PoAdV. As frequências dos períodos separadamente se encontram na Figura 4, sendo que 92% dos períodos obtiveram o HAdV com maior frequência.

Dentre as quantificações, a maior carga viral detectada foi de BAdV no último período do Balneário Parque das Laranjeiras $6,23 \times 10^{10}$ cg/L, embora as cargas máximas encontradas se assemelhem em todos os tipos virais. A menor carga detectada foi de HAdV no primeiro período da Cascata do Chuvisqueiro $9,64 \times 10^5$ cg/L.

Figura 4 - Frequência de AdV humano e animal em cada período analisado.



Fonte: Dados de pesquisa de campo

O período com maior carga viral de HAdV, de acordo com a média de carga viral detectada nas 5 coletas de cada período, foi o terceiro período do Balneário João Martins Nunes, já a maior contaminação por BAdV ocorreu também no terceiro período, porém no Parque das Laranjeiras,

em relação ao PoAdv a maior carga média foi encontrada no primeiro período da Cascata do Chuvisqueiro e por último o segundo período da Cascata do Chuvisqueiro apresentou a maior média de carga para CAV, as médias de cargas virais para cada tipo específico podem ser visualizadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Média de carga viral (cg/L) e frequência para HAdV, BAdV, PoAdv e CAV por período analisado.

Local/Período	HAdV	BAdV	PoAdv	CAV	CONAMA
Parque das Laranjeiras					
Período 1	2,06E+07 (5/5)	8,30E+09 (3/5)	3,05E+09 (2/5)	9,28E+09 (2/5)	Muito boa
Período 2	7,13E+07 (5/5)	1,11E+10 (3/5)	0,00E+00 (0/5)	2,20E+09 (1/5)	Imprópria
Período 3	5,76E+06 (5/5)	2,24E+10 (4/5)	3,58E+09 (1/5)	1,73E+10 (3/5)	Excelente
Período 4	4,16E+06 (4/5)	1,25E+10 (1/5)	2,74E+09 (1/5)	0,00E+00 (0/5)	Imprópria
Cascata do Chuvisqueiro					
Período 1	4,59E+07 (4/5)	7,11E+09 (2/5)	2,41E+10 (3/5)	1,20E+10 (2/5)	Satisfatória
Período 2	2,61E+07 (5/5)	1,97E+10 (2/5)	4,12E+09 (1/5)	2,16E+10 (3/5)	Satisfatória
Período 3	4,51E+06 (5/5)	0,00E+00 (0/5)	6,92E+08 (1/5)	1,10E+10 (3/5)	Muito boa
Período 4	7,31E+06 (3/4)	9,23E+08 (1/4)	0,00E+00 (0/4)	0,00E+00 (0/4)	Imprópria
Balneário J. M. Nunes					
Período 1	2,51E+07 (4/5)	3,93E+09 (3/5)	4,43E+09 (3/5)	1,83E+09 (2/5)	Imprópria
Período 2	1,53E+07 (3/5)	3,16E+09 (1/5)	2,56E+09 (1/5)	1,25E+10 (4/5)	Imprópria
Período 3	5,15E+09 (4/5)	3,36E+09 (2/5)	1,69E+09 (1/5)	4,83E+09 (2/5)	Imprópria
Período 4	9,77E+06 (4/5)	0,00E+00 (0/5)	2,15E+10 (3/5)	2,15E+10 (3/5)	Imprópria

Fonte: Dados de pesquisa de campo

Analisando as cargas virais de HAdV, através do teste de Pearson, foi possível notar uma correlação significativa entre o Balneário João Martins Nunes e o Parque das Laranjeiras ($P=0,001$) no primeiro período de coleta, os períodos restantes não apresentaram correlação. Na comparação entre o primeiro ano de estudo (períodos 1 e 2) e o segundo ano de estudo (períodos 3 e 4) foram encontrados diferença estatística apenas no Balneário Parque das Laranjeiras ($P=0,003$).

3.4 Discussão dos resultados

O entendimento sobre a fonte de contaminação fecal nos meios hídricos é uma importante ferramenta para o estabelecimento de medidas de preservação ambiental. Além do esgoto doméstico, comum fonte de contaminação dos corpos hídricos, a atividade pecuária pode afetar indiretamente a qualidade da água. O excremento dos animais muitas vezes é mal

gerenciado, possibilitando a dispersão dos patógenos até os corpos hídricos, principalmente durante os períodos de chuvas (STAGGEMEIER *et al.*, 2015).

Olhando cada balneário de forma isolada notamos que o Balneário Cascata do Chuvisqueiro obteve nos três primeiros períodos classificação águas próprias para banho, enquanto o último período obteve classificação imprópria, por ultrapassar 800 NMP/100mL em 80% das amostras. O Parque das Laranjeiras recebeu tanto classificação de águas próprias quanto de águas impróprias para banho. Por ordem de qualidade o terceiro período ficou classificado como excelente, o primeiro como muito boa e o segundo e quarto como impróprios. O quarto período recebeu esta classificação por exceder 80% de amostras superiores a 800 NMP/100mL e o segundo, além de exceder esse valor, obteve na última coleta resultado superior a 2.000 NMP/100mL.

O último balneário, João Martins Nunes, obteve classificação imprópria em todos os períodos analisados por apresentarem em 80% das amostras valores superiores a 800 NMP/100mL e na última coleta as amostras apresentaram valores superiores a 2.000 NMP/100mL. Os elevados valores encontrados neste balneário em todos os períodos de coleta podem estar relacionados ao fato do balneário se encontrar em uma área mais urbanizada em relação aos demais, além disto, o rio passa por diversas cidades a montante do balneário, ocorrendo lançamentos de esgotos, principalmente o doméstico.

Quando analisados os períodos de coleta, é possível notar que os primeiros três períodos do estudo apresentaram classificação que variaram de própria a imprópria, entretanto o último período apresentou apenas a classificação imprópria, sendo assim o período de maior contaminação em relação à bactéria *E. coli* (tabela 5).

Alguns trabalhos trazem a chuva como um dos motivos da deterioração da qualidade da água, já que ocorre, por meio do escoamento superficial o carregamento de impurezas e material fecal para os corpos hídricos, comprometendo assim a qualidade da água (LOPES; MAGALHÕES, 2010; MORAIS; SILVA, 2012). Além do escoamento, a precipitação também causa a ressuspensão dos sedimentos, levando a contaminação da coluna de água. O último período de coleta foi realizado com chuva intensa, inclusive na segunda coleta da Cascata do Chuvisqueiro não foi possível o acesso ao local devido a fatores como o aumento do nível do rio e deslizamentos que ocorreram no local.

Buscando averiguar essa afirmação, foi realizada uma pesquisa da precipitação nos dias de coleta, essa informação é possível visualizar no gráfico 1, assim como os valores de *E. coli*. Visualizando o gráfico é notável que apenas na primeira e na sexta coleta não houve

concordância entre a chuva e a quantificação da bactéria. As análises estatísticas comprovam que ocorreu relação entre a precipitação e o Balneário Parque das Laranjeiras e a Cascata do Chuvisqueiro. O Balneário João Martins Nunes apresentou valores exorbitantes em todos os períodos independente de eventos pluviométricos no período de coleta, expondo uma contaminação crônica independente do fator chuva.

Morais e Silva (2012), em uma pesquisa no Balneário Curva de São Paulo em Teresina, Piauí, utilizando a mesma correlação, encontraram resultados semelhantes. Durante os períodos de estiagem a concentração de coliformes termotolerantes manteve-se abaixo do limite estipulado pela legislação, já durante os períodos chuvosos foram encontrados valores acima do limite. Outra pesquisa realizada por Freitas *et al.* (2017) também observou a influência da precipitação sobre a qualidade da água, sendo encontrado índice de correlação de Pearson de 0,328.

O teste de correlação de Pearson também mostrou que no primeiro e no último período de coleta ocorreu uma correlação significativa entre os balneários, ou seja, os níveis de coliformes aumentaram e diminuíram de forma similar em todos os balneários durante as semanas de coleta. Em contraste, no segundo e o terceiro período não houve correlação. Na análise de comparação entre os anos de estudo não houve diferença significativa, isso pode ser explicado pelo fato que os períodos que correspondem aos meses de janeiro e fevereiro (2 e 4) apresentaram mais águas impróprias e os períodos que correspondem a novembro e dezembro (1 e 3) apresentaram mais águas próprias, ou seja, de certa forma houve um equilíbrio durante os anos. A correlação significativa entre os balneários mostra que mesmo em áreas distintas a deterioração e a melhora da qualidade da água se comportam de maneira semelhante durante os períodos analisados, independente das características próprias de cada local, podendo esse fato estar ligada a precipitação pluviométrica.

Diferente das bactérias os vírus não são inclusos na legislação, sendo assim, não existe um ponto de corte indicando qual seria o máximo de carga viral permitido. Contudo verificando a carga viral de HAdV encontradas em outros trabalhos que analisaram águas residuais e esgotos foram encontradas cargas virais semelhantes que variam de 10^2 a 10^8 cg/L (RAMES *et al.*, 2016; FONG *et al.*, 2010; BOFILL-MAS *et al.*, 2006; HE; JIANG, 2005; RODRÍGUEZ *et al.*, 2013).

Comparando com outros estudos, tanto a frequência quanto a carga viral encontrada, foram inferiores ao observado em nosso estudo. Staggemeier *et al.* (2015), analisaram águas de barragens e córregos próximas a fazendas na mesma região em estudo e obteve 83,3% de amostras positivas para HAdV, 27,8% de CAV e 16,7% de BAdV. As cargas virais também foram

inferiores, para HAdV variou de 10^2 a 10^4 cg/L, para CAV variou de 10^5 a 10^9 cg/L e BAdV de 10^5 a 10^6 cg/L. Outro trabalho na região também obteve valores inferiores de frequência em amostras positivas e na carga viral encontrada. Vecchia *et al.* (2015) analisou o trecho médio da bacia e detectou 55,6% de HAdV, 5,8% de BAdV e 4,2% de PoAdV, porém, ao contrário do detectado no presente estudo, foi encontrado maior frequência de CAV (51,7%).

A partir do teste de correlação, no qual foram utilizados os dados obtidos para HAdV, foi possível notar correlação apenas entre o balneário João Martins Nunes e o Parque das Laranjeiras ($P=0,001$) no primeiro período de coleta, isso porque os mesmos se comportaram de forma semelhante, tendo um pico na 4 semana de coleta que diminuiu na semana seguinte. Na comparação entre o primeiro ano de estudo (períodos 1 e 2) e o segundo ano de estudo (períodos 3 e 4) foram encontradas diferenças estatísticas apenas no Balneário Parque das Laranjeiras, sendo que o primeiro ano apresentou maior carga viral com a maioria das quantificações em 10^7 cg/L, já o segundo ano apresentou a maioria das quantificações em 10^6 cg/L.

A maioria dos períodos apresentaram com maior frequência o HAdV, com exceção do segundo período do balneário João Martins Nunes que apresentou mais amostras positivas para CAV. O segundo tipo viral mais frequente variou nos períodos pesquisados, dois períodos do Balneário Cascata do Chuvisqueiro apresentaram como segundo mais frequente o CAV e os outros dois períodos variaram entre BAdV e PoAdV. O Balneário João Martins Nunes variou no segundo tipo mais frequente em todos os períodos e o Parque das Laranjeiras obteve nos três primeiros períodos o BAdV como segundo mais frequente e o último período obteve em conjunto o BAdV e o PoAdV.

Analisando qual o balneário mais contaminado, tendo em vista a frequência de amostras positivas, foi constatado que o Parque das Laranjeiras apresentou as maiores frequências de HAdV e BAdV, enquanto o mais contaminado por PoAdV e CAV foi o Balneário João Martins Nunes. As frequências de cada período dos balneários se encontram no Figura 4.

É importante lembrar que a cidade de Taquara, onde está localizado o Balneário João Martins Nunes, conta com 57.544 habitantes, número bastante superior as demais cidades do estudo, sendo 26.589 habitantes em Três Coroas e 4.607 em Riozinho. Segundo o IBGE cidades (2017), Taquara também apresenta maior número de bovino, 24.204 cabeças, e maiores rebanhos de suínos, 1.191 cabeças. A cidade de Três Coroas apresenta 2.884 cabeças de bovino e 37 cabeças de suínos, já Riozinho contém 1.926 cabeças de bovino e 531 cabeças de suínos. Além disto, as cidades de Riozinho e Três Coroas estão a jusante no Chuvisqueiro e no Parque

das Laranjeiras, enquanto no Balneário João Martins Nunes parte da cidade está a montante do local, bem como toda as atividades de relacionadas ao gado e a suínos também está a montante.

De acordo com Oliveira e Henkes (2013), os locais onde os balneários se encontram já apresentam desmatamento, desvio do curso do rio para irrigação e por dragas que retiram areia do seu leito, já apresentando vestígios de poluição industrial e residencial. A presença de *E. coli* e os diversos tipos de AdV encontrados indicam uma contaminação de origem difusa, que deve ser destacada como um todo, podendo estar disseminando entre os trechos da bacia, devido ao ciclo geohídrico. A contribuição de contaminação humana é forte quando olhamos a frequência de amostras positivas de HAdV, os outros tipos virais, de origem animal, apresentaram uma frequência menor, porém quando analisado a carga viral é notado um aumento de até 10^3 cg/L em comparação ao humano, indicando que mesmo não estando sempre presente representa uma grande parte da contaminação fecal nos balneários.

Contrapondo a classificação dos balneários que obtiveram melhor classe quanto a bactéria *E. coli*, Parque das Laranjeiras e a Cascata do Chuvisqueiro, foram encontradas mais amostras positivas para HAdV nesses balneários. Foram encontrados 95% de amostras positivas no Parque das Laranjeiras e 90% na Cascata do Chuvisqueiro, enquanto o Balneário João Martins Nunes obteve 75% das amostras positivas. Ou seja, o balneário João Martins Nunes, que foi considerado o mais contaminado pela resolução CONAMA 274/00, obteve menor frequência de HAdV. O Parque das Laranjeiras também obteve maior número de amostras positivas para BAdV. O Balneário Cascata do Chuvisqueiro obteve a maior carga viral média para CAV e o Parque das Laranjeiras obteve a maior carga de BAdV. Porém analisando a carga viral média de HAdV, o Balneário João Martins Nunes obteve carga viral de 10^9 cg/L enquanto os outros balneários obtiveram 10^7 cg/L, assim como obteve maior carga viral de PoAdV, isto pode ser explicado pelo alto nível de contaminação do balneário.

Quando analisamos os períodos de cada balneário separadamente, notamos que no Balneário Parque das Laranjeiras onde foram obtidas as melhores classificações (primeiro e terceiro período), foi onde ocorreu a maior frequência dos tipos virais. No terceiro período, do mesmo balneário, que ficou com a melhor classificação (excelente), foi encontrado a maior frequência viral e as maiores cargas virais médias de BAdV, PoAdV e CAV. A maior carga média de HAdV foi encontrada em um período impróprio, segundo período, todavia a menor carga também foi encontrada nessa classificação, porém no quarto período. As menores cargas de PoAdV e CAV foram encontradas ambas em balneários impróprios, e a menor carga de BAdV, ao

contrário das anteriores, ocorreu em uma classificação própria. Sendo assim, na maioria dos períodos próprios houve maior frequência dos tipos virais e maiores cargas virais.

No Balneário Cascata do Chuvisqueiro também foi possível observar uma inversão dos fatores quando comparamos a frequência e as cargas virais contra a classificação dos períodos. Os três primeiros períodos, que obtiveram classificação de águas próprias, apresentaram valores positivos com mais frequência assim como obtiveram mais tipos virais, em contraposição ao pior período. Mais especificamente nos dois primeiros períodos ocorreram a presença de mais tipos virais e foram encontradas as maiores cargas virais médias do balneário. No período classificado como impróprio houve a presença de apenas dois tipos virais, HAdV e BAdV, obtendo um log e dois logs, respectivamente, a menos que a maior carga viral.

Como o Balneário João Martins Nunes só obteve classificação imprópria não foi possível a comparação, principalmente na questão das cargas virais, contudo, como descrito anteriormente, quando analisado contra os outros períodos foi encontrado menor frequência de HAdV. Em concordância, tanto a maior carga viral de HAdV quanto o maior valor encontrado para a bactéria *E. coli*, originou-se do terceiro período no Balneário João Martins Nunes, porém não foram da mesma coleta.

Alguns estudos como o de Staggemeier *et al.* (2017) também obtiveram os mesmos achados na análise de águas recreativas do Rio de Janeiro. Nos lugares onde os coliformes estavam dentro de limite foi encontrado intensa contaminação viral. Outra pesquisa, buscando verificar a relação entre as bactérias e outros organismos patogênicos, Pinto *et al.* (2010), comparou a presença de *Salmonella sp.*, *Cryptosporidium sp.*, *Giardia sp.*, *Acanthamoeba sp.* e os indicadores de balneabilidade, os resultados mostraram que a qualidade da água se enquadraram na categoria excelente, porém foram encontrados outros organismos patogênicos, concluindo que a classificação atual não condiz com a presença de diferentes tipos de microrganismos, sendo assim a população pode estar exposta a riscos de saúde.

O uso de um único indicador nos monitoramentos de qualidade da água não é seguro para sugerir que existe correlação com outros microrganismos, o uso conjunto de organismos indicadores é mais indicado para ser preditivo da presença de certos agentes patogênicos (HARWOOD *et al.*, 2005; LECLERC *et al.*, 2001). Os agentes virais oferecem um complemento à avaliação feitas apenas com indicadores bacterianos, completando lacunas deixadas pela avaliação delas, aumentando assim a confiabilidade dos resultados.

4 Considerações Finais

Os resultados do presente estudo corroboram com diversos trabalhos que demonstram que a ausência ou a baixa quantificação da bactéria *E. coli* em meios hídricos não elimina a presença de vírus entéricos, sugerindo que a avaliação apenas em coliformes fecais não seja suficiente. Além disso, demonstra que a contaminação fecal nos balneários pode ser atribuída a poluentes difusos, como contaminação fecal de animais, além da clássica de esgoto doméstico, podendo ser oriundos das atividades rurais em torno dos balneários, que provavelmente gerenciam os resíduos animais de forma inadequada.

Em suma, o estudo mostra a relevância do monitoramento adequado e contínuo das águas recreacionais, já que diferenças na qualidade da água, segundo a resolução CONAMA 274/00, são vistos em curtos períodos. Além disso, o trabalho aponta pontos específicos e diretos que afetam a qualidade da água, como a precipitação, ressaltando a importância de um monitoramento contínuo.

A identificação das prováveis fontes de contaminação e dos fatores capazes de alterar a qualidade de águas recreacionais são de grande importância para as medidas de prevenção que visem a manutenção do ambiente. Por isso, em função da relevância do tema para as políticas de saúde pública, sugere-se que novas pesquisas e ações sejam realizadas no Rio do Sinos.

Referências

- OFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GIRONES, R. *Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7894-7896. 2006.
- CAMPING CASCATA DO CHUVISQUEIRO. Disponível em: <<http://cascatachuvisqueiro.com.br/>> Acesso em: 23 ago. 2016.
- CONAMA. *Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000*. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=272>> Acesso em: 22 ago. 2016.
- CONAMA. *Resolução nº 357, de 17 de março de 2005*. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 22 ago. 2016.
- FIGUEIREDO, J. A. S.; DRUMM, E.; RODRIGUES, M. A. S.; SPILKI, F. R.. *The Rio dos Sinos watershed: an economic and social space and its interface with environmental status. Brazilian Journal of Biology*, 70(4), 1131-1136. 2010.
- FONG, T. T.; PHANIKUMAR, M. S.; XAGORARAKI, I.; ROSE, J. B. *Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 715-723. 2010.

FREITAS, F.; NEIVA, G. S.; CRUZ, E. S.; DA MOTA SANTANA, J.; SILVA, I. D. M. M.; DE SOUZA MENDONÇA, F. *Qualidade microbiológica e fatores ambientais de áreas estuarinas da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape (Bahia) destinadas ao cultivo de ostras nativas. Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 22, n. 4, 2017.

HARWOOD, V. J.; LEVINE, A. D.; SCOTT, T. M.; CHIVUKULA, V.; LUKASIK, J.; FARRAH, S. R.; ROSE, J. B. *Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 6, p. 3163-3170, 2005.

HE, J. W.; JIANG, S. *Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2250-2255. 2005.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Estimativa populacional 2017*. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2017/estimativa_dou.shtm> Acesso em: 11 set. 2017.

IBGE Cidades (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Estatísticas*. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>> Acesso em: 14 set. 2017.

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

LECLERC, H. D. A. A.; MOSSEL, D. A. A.; EDBERG, S. C.; STRUIJK, C. B. *Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. Annual Reviews in Microbiology*, v. 55, n. 1, p. 201-234, 2001.

LOPES, F. A.; SPERLONG, E. V.; MAGALHAES JR, A. P. *Indicadores para balneabilidade em águas doces no Brasil*. Belo Horizonte, janeiro - junho Vol.11 nº1, 2015.

LOPES, F. W.; MAGALHÃES JR, A. P. *Avaliação da qualidade das águas para recreação de contato primário na Bacia Do Alto Rio Das Velhas, MG. Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, 6(11). 2010.

LUCHETA, F.; KOCK, N. M.; MARTINS, S. M. A.; SCHMITT, J. L.. *Comunidade de líquens corticícolas em um gradiente de urbanização na Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos, no sul do Brasil*. Rodriguésia [online]. vol.69, nº.2. pp.323-334. Rio de Janeiro abr./jun. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201869205>

MORAIS, R. C. S.; SILVA, C. E. *Diagnóstico ambiental do balneário Curva São Paulo no rio Poti em Teresina, Piauí. Engenharia Sanitária e Ambiental*, 17(1). 2012.

OLIVEIRA, L. A.; HENKES, J. A. *Poluição hídrica: poluição industrial no Rio do Sinos-RS*. R. gest. sust. ambient., Florianópolis, v.2, n.1, p. 186-221. abr. /set. 2013.

PINTO, M. C. K.; FRIGO, E. P.; FRIGO, M. F.; DOS SANTOS, L. C.; PANAZZOLO, F.; DE CHRISTO, A. P. *Análise de microorganismos patogênicos para avaliação da balneabilidade. Varia scientia agrárias*. V. 01, N. 02, P. 105-119, 2010.

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

RAMES, E.; ROIKO, A.; STRATTON, H.; MACDONALD, J. *Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. Water research*, 96, 308-326. 2016.

RODRÍGUEZ, R. A.; POLSTON, P. M.; WU, M. J.; WU, J.; SOBSEY, M. D. *An improved infectivity assay combining cell culture with real-time PCR for rapid quantification of human adenoviruses*

41 and semi-quantification of human adenovirus in sewage. Waterresearch, 47(9), 3183-3191. 2013.

SANTOS, N.; ROMANOS, M.; WIGG, M. *Introdução à virologia humana*. 2ª ed. 2008.

SCHNEIDER, I. L. *Caracterização espectroscópica dos sedimentos da bacia hidrográfica do rio dos sinos-RS*. Programa de Pós-Graduação em Sensoriamento Remoto. Universidade federal do Rio Grande do Sul (Ufrgs), 2012.

STAGGEMEIER, R. ET AL. *Animal and human enteric viruses in water and sediment samples from dairy farms*. Elsevier. Agricultural Water Management. 152, 135–141, 2015.

STAGGEMEIER, R. ET AL. *Enteric viruses and adenovirus diversity in waters from 2016 Olympic Venues*. Science of The Total Environment, v. 586, p. 304-312, 2017.

TAQUARA. Disponível em: <<http://www.taquara.com.br/>> Acesso em: 22 ago. 2016.

VECCHIA, A. D. et al. *Surface water quality in the Sinos River basin, in Southern Brazil: tracking microbiological contamination and correlation with physicochemical parameters*. Environ SciPollut Res Int. Jul. 22 (13), 9899-911, 2015.

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.