

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA E LIMNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E MEIO**  
**AMBIENTE**

**OSMAR LUIS SILVA VASCONCELOS**

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM**  
**PRAIAS DE MACROMARÉ: UMA PROPOSIÇÃO DE**  
**METODOLOGIA**

**SÃO LUÍS**  
**2024**

OSMAR LUIS SILVA VASCONCELOS

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM  
PRAIAS DE MACROMARÉ: UMA PROPOSIÇÃO DE  
METODOLOGIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente (PRODEMA) da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento e Ambiente.

**Orientador(a):** Prof. Dr. Jorge Luiz Silva Nunes

**Coorientadora:** Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra

SÃO LUÍS

2024

**OSMAR LUIS SILVA VASCONCELOS**

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM  
PRAIAS DE MACROMARÉ: UMA PROPOSIÇÃO DE  
METODOLOGIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente (PRODEMA) da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento e Ambiente.

Aprovada em: 28/03/2024

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Jorge Luiz Silva Nunes (orientador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

1ª Examinadora Profa. Dra. Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo

---

2º Examinador Prof. Dr. Leonardo Gonçalves de Lima  
Universidade Federal do Maranhão

---

1º Suplente Prof. Dr. Nivaldo Magalhães Piorski  
Universidade Federal do Maranhão

---

2ª Suplente Profª. Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues  
Instituto Oswaldo Cruz

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por permitir a conclusão de uma etapa importante na minha vida pessoal e profissional.

Aos meus pais Osvaldo Luis Vasconcelos e Alcenir Santos Silva, e ao meu irmão, Wenderson Santos Vasconcelos pelo incentivo aos meus estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Luiz Silva Nunes e a toda a sua equipe do laboratório de organismos aquáticos, da Universidade Federal do Maranhão, por me orientar e me proporcionar uma vivência na escrita científica, melhorei muito durante esse tempo com ele.

Agradeço a Profa Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra, por ter me recebido de volta ao laboratório de microbiologia de alimentos e água da Universidade Estadual do Maranhão, local onde sou recebido desde o estágio curricular técnico em 2010, com retorno na graduação em 2014, na especialização em 2020 e agora encerrando mais um ciclo no mestrado em 2024. Obrigado a toda equipe do laboratório por ter me auxiliado execução dos resultados do capítulo 1 desta pesquisa.

Agradeço a doutora Dália Rodrigues e a toda a sua equipe por permitir que o capítulo 2 de nossa pesquisa fosse concretizada junto ao Laboratório de Enterobactérias – LABENT do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Agradeço aos meus colegas de turma pelo companheirismo multidisciplinar. Agradeço também a todos os professores e funcionários do Prodema pelo conhecimento que eu adquiri durante esses dois anos e utilizei em algum momento durante a execução e elaboração deste manuscrito, tenham certeza.

Aos meus queridos colaboradores Prof. Dr. Jamerson Aguiar, Profa. Dra. Luciana Bastos, Ma Greiciene de Jesus e a Esp. Maria Célia Fonseca pelo apoio e conhecimento compartilhado.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite e sugestões pertinentes desde a qualificação, obrigado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA por ter oportunizado bolsa de pesquisa.

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Vasconcelos, Osmar.

Avaliação da contaminação microbiológica em praias de macromaré : uma proposição de metodologia / Osmar

Vasconcelos. - 2024.

77 f.

Coorientador(a) 1: Nancylene Bezerra.

Orientador(a): Jorge Nunes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2024.

1. Coliformes. 2. E. coli. 3. Enterococos. 4. Vibrio spp.. 5. Zona costeira. I. Bezerra, Nancylene. II. Nunes, Jorge. III. Título.

*“A vida nem sempre precisa ser um eterno combate”*

## RESUMO

O ambiente costeiro sofre um gradual impacto ambiental que é provocado por ações antrópicas cada vez mais aceleradas e as praias não fazem parte de uma exceção. As legislações brasileiras minimizam os riscos que os banhistas e demais frequentadores das praias podem correr. Objetivamos com esta pesquisa, avaliar os níveis de contaminantes microbiológicos em distintos micro-habitats costeiros comumente negligenciados pelos órgãos fiscalizadores. Nosso local de estudo situa-se na praia do Olho D'água, próximo a foz do Rio Pimenta, na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil. Os micro-habitats Água Superficial do mar (AS), Água Intersticial (AI) e Sedimento (S) foram avaliados durante seis meses, englobando períodos de baixa e alta pluviosidade. Utilizamos o método do substrato cromogênico para detecção de coliformes totais, *E. coli* e enterococos; e o método molecular (PCR) para detecção de *Vibrio* spp. e de seus genes de virulência. Para os dados abióticos, analisamos temperatura, salinidade, pH e pluviosidade. Os dados foram submetidos à análise de variância multivariada permutacional em uma matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis e de Jaccard. Para os microrganismos do grupo coliformes e enterococos, os resultados foram significativos durante o período de alta pluviosidade, com níveis de contaminações em AS, AI e S acima do estabelecido pela legislação brasileira. Para *Vibrio* spp., os resultados não mostraram diferença significativa entre os períodos e micro-habitats. Foram detectadas trinta cepas, sendo *V. harveyi*, *V. orientalis*, *V. rumoiensis*, *V. fluvialis* e *V. cincinnatiensis* recorrentes em ambos os períodos. Os parâmetros abióticos parecem não ter influenciado na dinâmica de *Vibrio* spp., com exceção da pluviosidade. É necessário que o sedimento, seja levado em consideração nos boletins de qualidade sanitária, pois atua como *hot spot* de microrganismos em ascensão patogênica. As duas metodologias apresentaram eficiência na detecção de microrganismo possivelmente patogênicos, contudo devem ser utilizadas em conjunto, pois uma complementa a outra e para que seja averiguado o real risco que os micro-habitats possam oferecer aos usuários de praias.

**Palavras-chave:** Coliformes. *E. coli*. Enterococos. *Vibrio* spp.. Zona costeira.

## ABSTRACT

The coastal environment suffers a gradual environmental impact caused by anthropic actions that is increasingly accelerated, beaches are no exception. Brazilian legislation minimizes the risks that bathers and other beachgoers may face. The objective of this research is to evaluate the levels of microbiological contaminants in different microhabitats commonly neglected by regulatory bodies. Our study site is located on Olho D'água beach, close to the mouth of the Pimenta River, in the capital of Maranhão. The microhabitats Sea Surface Water (SW), Interstitial Water (IW) and Sediment (S) were evaluated for six months (low and high rainfall). We used the chromogenic substrate method to detect total coliforms, *E. coli* and Enterococci; and the molecular method (PCR) to identify the species and virulence genes of *Vibrio* spp.. For abiotic data, we analyzed temperature, salinity, pH and rainfall. The data were subjected to permutational multivariate analysis of variance in a Bray-Curtis and Jaccard dissimilarity matrix. For microorganisms from the coliform and enterococci groups, the results were significant during the period of high rainfall, with contamination levels in SW, IW and S above those established by Brazilian legislation. For *Vibrio* spp., the results were insignificant between periods and microhabitats. Thirty strains were identified with some recurrent species in both periods. Abiotic parameters do not appear to have influenced the dynamics of *Vibrio* spp., with the exception of rainfall. It is necessary that the sediment is taken into account in health quality bulletins, as it acts as a hot spot for pathogenic microorganisms. Both methodologies were efficient in detecting possibly pathogenic microorganisms, however, they must be used, as one complements the other and so that the real risk that microhabitats may pose to beach users can be ascertained.

**Keywords:** Coliforms. *E. coli*. Enterococci. *Vibrio* spp.. Coastal zone.



## SUMÁRIO

<b>I.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....</b>	<b>13</b>
<b>II.</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>15</b>
<b>III.</b>	<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>25</b>
	RESUMO .....	25
1.	INTRODUÇÃO .....	26
2.	METODOLOGIA .....	29
3.	RESULTADOS E DISCUSÃO .....	31
4.	CONCLUSÃO .....	37
	AGRADECIMENTOS .....	37
	REFERÊNCIAS .....	37
<b>IV.</b>	<b>CAPITULO 2 .....</b>	<b>42</b>
	RESUMO .....	42
1.	INTRODUÇÃO .....	42
1.	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	44
2.	RESULTADOS E DISCUSÃO .....	47
3.	CONCLUSÃO .....	54
	REFERÊNCIAS .....	55
<b>IV.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>81</b>

## I. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este documento apresenta os resultados obtidos no projeto intitulado, AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM PRAIAS DE MACROMARÉ: UMA PROPOSIÇÃO DE METODOLOGIA, em formato de artigo científico (manuscrito) para fins de exame de dissertação do curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente.

A motivação do projeto de pesquisa consiste no negligenciamento de informações acerca dos potenciais riscos à saúde causados por microrganismos nas praias em função da contaminação e poluição ambiental provenientes de um ineficiente sistema de tratamento de esgoto. Contudo, as informações disponibilizadas quanto à qualidade das praias dão a entender que apenas as atividades de banho devem ser evitadas em locais classificados como impróprio, portanto deixando subentendido que a praia pode ser utilizada de diversas formas. Desta forma, buscamos verificar se fazer apenas as análises estabelecidas pela legislação vigente são suficientes para determinar a balneabilidade de uma praia.

Portanto, trazemos como o cerne deste manuscrito a realização de um experimento científico que teve como objetivo avaliar diferentes micro-habitats e a sua microbiota, além da água do mar que é usada de forma padrão para a maioria dos testes de balneabilidade. Como micro-habitats adicionais usamos o sedimento e a água intersticial para a análise da qualidade ambiental por meio da microbiota. Os microrganismos foram avaliados por meio de substratos enzimáticos cromogênicos Colilert® para análises de Coliformes Totais e *Escherichia coli*, Enterolert® para análises de enterococos. Para pesquisa de bactérias da família *Vibrionaceae* foi utilizado meio de cultura específico e PCR (Reação Cadeia Polymerase) para detecção a nível de gênero, espécie e virulência.

Posto isso, o objetivo do presente manuscrito é comparar a qualidade sanitária dos micro-habitats de uma praia amazônica com influência de macromarés, com verificações qualitativas das bactérias supracitadas na água superficial (água do mar), água intersticial e sedimento (areia).

O formato do documento apresentado está estruturado com a exposição em tópicos daquilo que foi preparado para fins da dissertação, tais como a **Fundamentação teórica**, que

descreve o cenário da legislação e estudos versados sobre a balneabilidade de praia; **Capítulo 1**, que consiste no manuscrito que descreve o experimento sobre a qualidade sanitária de micro-habitats por meio da análise quali-quantitativa de Coliformes totais, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.; **Capítulo 2**, que consiste no manuscrito que descreve o experimento sobre a qualidade sanitária de micro-habitats por meio de pesquisa com bactérias do gênero *Vibrio* spp. **Considerações Finais**, que exibem os resultados mais relevantes do experimento e sugestões sobre a necessidade de ampliar a avaliação da qualidade ambiental e sanitária das praias; por fim, as **Referências**, que enumeram os trabalhos consultados e citados ao longo do presente documento.

O Capítulo 1 foi submetido e está formatado nas normas Holos (1807-1600), vinculada à Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN), classificada com Qualis A1 pela CAPES (2017-2020) e Fator de Impacto (JCR: 2022) 0,1. O Capítulo 2 segue a estrutura estabelecida pela Environmental Microbiology (1462-2912) da Applied Microbiology International vinculada a editora Wiley, classificada com Qualis A1 pela CAPES (2017-2020) e Fator de Impacto (JCR: 2022) 5,1.

## II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O ambiente costeiro possui grande valor para a sociedade, principalmente devido às suas utilidades econômicas tais como comércio, turismo, recreação, etc. No entanto, as pressões ocorridas nesses ecossistemas em função do desenvolvimento das cidades, acarretam aumentos nos desequilíbrios ambientais, bem como a poluição e contaminação ambiental resultante da deficiência dos serviços de saneamento (Pereira *et al.*, 2016; Rêgo; Soares-Gomes; Silva, 2018).

A praia corresponde a um dos ambientes costeiros que mais reflete às ações antrópicas, pois é impactada diretamente por lançamento de resíduos sólidos (Andrades *et al.*, 2020) e, indiretamente, pelo despejamento de esgotos sem tratamento, ou tratamento insuficiente (Silva *et al.*, 2019). Apesar disso, as praias possuem como definição e direito constitucional: “são bens públicos, sendo assegurado, livre e franco acesso a elas e ao mar, ressalvados os trechos considerados de interesse da segurança nacional ou incluídos em áreas protegidas por legislação específica” asseguradas na Lei 7.661/88 (Brasil, 2004).

Além disso, normas nacionais e internacionais para o monitoramento da qualidade das águas de consumo e recreação normalmente utilizam bactérias de origem fecal, porém é relevante a adição de outros microrganismos que possam ser utilizados como bioindicadores de contaminação antrópica (Lugo; Lugo; Puente, 2021). É importante associar a balneabilidade das praias não somente aos padrões estabelecidos, referentes à qualidade das águas superficiais, mas também as análises microbiológicas da areia, de resíduos sólidos produzidos pelos frequentadores e/ou os transportados pelas correntes marítimas e ventos (Souza; Silva, 2015).

Em revisão cienciométrica realizada por Costa e Costa (2020), relataram que a água superficial do mar foi a mais investigada para verificação da balneabilidade costeira (70,9%), seguidos de água associada ao sedimento (15,7%), sedimento (2,2%), água subterrânea e sedimentos (0,7%), dentre outros compartimentos de uma praia (10%). Esses dados revelam a que há poucas investigações a nível internacional sobre os potenciais patógenos encontrados nos sedimentos e água localizada no interstício.

## Métodos para determinação de balneabilidade

Há um debate científico sobre os métodos tradicionais que envolvem meios de cultura e técnicas modernas, como a molecular (qPCR) para identificação de microrganismos indicadores de qualidade das águas balneares da União Europeia (Oliver *et al.*, 2014). Esse debate está relacionado a rapidez dos métodos moleculares quando comparados aos métodos tradicionais; se somente a *E. coli* é capaz de indicar se o ambiente costeiro é adequado para banho e recreação; e como realizar uma regularização de novos métodos moleculares (Oliver *et al.*, 2014). Contudo, apesar de serem mais rápidos no diagnóstico da qualidade sanitária, ainda não representam uma realidade, principalmente em países em desenvolvimento que não possuem tecnologia associada a falta de interesse da gestão pública.

Hodiernamente, a análise dos microrganismos indicadores baseiam-se nas observações em meios de cultura, provas bioquímicas, imunológicas, moleculares, e uso de microscopia (Gunda; Mitra, 2016). Os métodos tradicionais como os tubos múltiplos, membrana filtrante, substratos enzimáticos, PCR e combinações desses métodos são os mais utilizados para avaliar os índices de contaminação de uma praia, sendo o Brasil o país de clima tropical com maior número de pesquisas publicadas em revistas com fator de impacto (Costa; Costa, 2020; Dufour, 2021). A pesquisa ainda relata que variáveis ambientais como temperatura, pH, salinidade e precipitação são comumente associadas para determinar a balneabilidade de uma praia.

A técnica dos tubos múltiplos foi empregada por Duham em 1898, no qual consistia no emprego de pequenos tubos de vidros invertidos colocados dentro de tubos maiores contendo meio de cultura líquido para verificação de formação de gás (Dufour, 2021). Mais tarde em 1915, MaCrady formulou uma tabela para a contagem da densidade de bactérias de origem fecal no sistema de Número Mais Provável (NMP) (Dufour, 2021).

Os meios de cultura comumente utilizados para determinação de coliformes totais e termotolerantes são Caldo Lauril Sulfato de Sódio, Caldo E.C. e Caldo Verde Brilhante sequenciados em tubos inoculados com 1,0 mL da amostra analisada (Silva; Cavalli; Oliveira, 2006). Essa mesma técnica pode ser utilizada para análise de água potável, de ambiente e alimentos.

O método da membrana filtrante foi descoberto em 1950 e popularizado para análise de coliformes em água de praia somente em 1980, em substituição a técnica de tubos múltiplos (Dufour, 2021). O método consiste no uso de filtros com poros de abertura com 0,22 ou 0,45  $\mu\text{m}$  no qual são depositados volumes entre 100 e 1000 mL da amostra diluída, a função da membrana é reter os microrganismos existentes na amostra (Gandra *et al.*, 2017).

O processo da filtração é realizado com auxílio de bomba a vácuo, frascos de Kitasato e funil de Buchsen e, após o processo, as membranas seguem para placas contendo agar de crescimento bacteriano, incubadas em temperatura ideal para crescimento bacteriano ou fúngico e contagem das Unidades Formadoras de Colônias - UFC (Gandra *et al.*, 2017; Lescreck *et al.*, 2016). Entretanto, apesar do método da Membrana Filtrante ser o mais usual, Kemper *et al.* (2023), reiteram que não há uma conformidade nos métodos para monitoramento da balneabilidade relacionados a *E. coli* em nível internacional.

Desenvolvido nos anos 1970, os substratos cromogênicos enzimáticos são métodos comerciais baseado nas reações de atividades enzimáticas ( $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glucuronidase) capazes de detectar a presença ou ausência de coliformes e *E. coli* entre 18-24 horas (Maheux *et al.*, 2015). Para enterococos, o método fundamenta-se no metabolismo de 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -glicosídeo pela enterococcus  $\beta$ glucosidase em fluorescente 4-metil-umbeliferil, também capaz de detectar a presença ou ausência em 24 horas (Peperzak; Van Bleijswijk, 2021). Esse método inovou o sistema baseado em Número Mais Provável por apresentar cartelas Quanti-Tray/2000 contendo variados poços que mudam de coloração e apresentam fluorescência quando exposto a luz UV (Dufour, 2021; Peperzak; Van Bleijswijk, 2021).

Em comparação ao método da membrana filtrante, Ramoutar (2020) verificou em águas marinhas tropicais localizadas em Trinidad e Tobago diferença insignificante nos resultados entre o uso de substratos para detecção de coliformes totais, *E. coli* (Colilert<sup>®</sup>) e enterococos (Enterolert<sup>®</sup>). Em investigação de águas balneares e potável no Sul da Suécia, Eckner (1998), concluíram que os meios enzimáticos para detecção de coliformes, *E. coli* e *Enterococcus* spp. possuíam qualidade igual ou superior aos métodos convencionais de monitoramento que utilizam tubos múltiplos e membrana filtrante. Os substratos possuem a vantagem de serem mais ágeis, dispensarem testes confirmativos quando a leitura da amostra for positiva, o que os torna cada vez mais atrativos (Zhang *et al.*, 2015; Ramoutar,

2020) e como desvantagem, o alto custo no mercado.

#### O método molecular

O método molecular e variações desse método para avaliar a balneabilidade de praias, foram apresentados em 2005 e apontados como uma forma mais célere e atual, desenvolvidos e em desenvolvimento, para a determinação de microrganismos, com resultados obtidos em cerca de 3 horas (Dufour, 2021). O método molecular surgiu como alternativa aos métodos tradicionais e aos substratos cromogênicos enzimáticos, uma vez que dependem de mais tempo e não há substratos específicos para todos os gêneros de bactérias encontradas em ambiente costeiro contaminados.

A Reação Cadeia Polimerase (PCR) começou a ser desenvolvida no início dos anos 1980, considerada de fácil manuseio, configuração e reduzido custo (Green; Sambrook, 2019). O método possui versátil uso como clonagem de genes, alelotipagem, sequenciamento genético, mutagênese *in vitro*, identificação mutagênica, dentre outras funções em contínuo desenvolvimento (Green; Sambrook, 2019).

Na literatura científica são encontrados diversos estudos que relatam o uso de análises moleculares para identificação e origem de microrganismos presentes na água do mar, sedimentos e organismos aquáticos encontrados no ecossistema da praia, dentre eles *E. coli*, vírus entéricos e *Vibrio* spp. (Oliva *et al.*, 2016; Hughes *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017).

Utilizando PCR para identificar e rastrear genes de bactérias indicadoras de contaminação fecal em uma praia localizada em Portugal, Valério *et al.* (2022), detectaram genes de *E. coli* e enterococos na areia proveniente de aves, ruminantes e, com constância, de cães. Em pesquisa com as mesmas bactérias em uma praia nos EUA, Russell *et al.* (2013), identificaram marcadores genéticos provenientes de seres humanos e aves na areia, água intersticial e água do mar, prevalecendo enterococos na areia e *E. coli* na água intersticial quando comparados a água do mar. Também é possível detectar as principais espécies patogênicas do gênero *Vibrio* simultaneamente e de maneira mais rápida por PCR em organismos aquáticos (Xu *et al.*, 2017).

Com o uso de marcadores genéticos para rastreamento de contaminantes é possível propor medidas de gestão que visem minimizar a exposição aos riscos de contaminação aos usuários das praias (Toubiana *et al.*, 2021), visto que é possível tomar conhecimento de qual micro-habitat surge e qual a fonte contaminadora.

Na literatura ainda é possível encontrar pesquisas que utilizam métodos e modelos matemáticos baseados em previsões para determinar a balneabilidade de praias (Bonamano *et al.*, 2015; Choi; Lee, 2020; Panda, 2020). Ademais, kits *mobiles* para detecção de contaminação fecal acoplados a smartphones já estão presentes no mercado, que podem apresentar resultados de contaminação entre 35 segundos e 30 minutos, dependendo da concentração de bactérias no ambiente (Gunda *et al.*, 2014; Gunda; Mitra, 2016), contudo os trabalhos contemporâneos até o momento concentram-se principalmente em estudos qualitativos e quantitativos de *E. coli*.

#### Coliformes totais e *Escherichia coli*

Os coliformes totais são constituídos por bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos ou aeróbios, não esporulados, oxidase negativos e fermentadores de lactose (Borbolla-Vazquez *et al.*, 2020). O grupo coliforme pode ser sub-classificado em coliformes totais e coliformes termotolerantes (antigos coliformes fecais), estes últimos apresentam menor número de espécies em relação aos coliformes totais (Mishra *et al.*, 2018).

Podem ser encontrados naturalmente no ambiente sem necessariamente representar perigo a saúde, contudo sua presença requer análise das instalações hidrosanitárias para descobrir a origem e rota dessas bactérias (Akyala; Olufemi; Adebola, 2014). Constatada a ineficiência dos coliformes totais em assegurar contaminação de origem fecal, foram sugeridas *E. coli* e *Enterococcus* spp. como bactérias indicadores de contaminação em água potável e de recreação, sucessivamente (Solaiman *et al.*, 2020).

Todavia ocorrem mudanças em cada país nas definições estabelecidas em legislações nacionais. No Brasil recomenda-se o uso de *E. coli* ou *Enterococcus* spp. para avaliar a qualidade da água superficial de praias. Para o estabelecimento de índices de contaminação na areia de praias, somente Portugal e a cidade do Rio de Janeiro, Brasil disponibilizam normas que estipulam o quantitativo máximo de bactérias de origem fecal (Krepsky *et al.*, 2020).

A bactéria *Escherichia coli* é a principal representante dos coliformes termotolerantes e, normalmente tem sido utilizada nas análises de contaminação direta de origem fecal. Sua presença no sistema digestório de animais, incluindo o homem, aliado à sua capacidade de oxidar a lactose à temperaturas de 44,5°C em curto período de 24 horas, facilita o seu uso



como uma importante ferramenta para a avaliação da qualidade ambiental (Amaral *et al.*, 2003; Miquelante; Kolm, 2011).

É possível classificar *E. coli* em cinco grupos quanto à sua virulência: enteroinvasiva (ECEI), enteropatogênica (ECEP), enterohemorrágica (ECEH), enterotoxigênica (ECET) e enteroagregativa (ECEA) que podem causar doenças intestinais e extra-intestinais como infecções urinárias (Meng *et al.*, 2012; Vila *et al.*, 2016). Por outro lado, tem sido notória as alterações mutagênicas que a *E. coli* está sofrendo em decorrência do uso de medicamentos microbianos, administrados tanto em humanos quanto nos animais (Gomes *et al.*, 2016; Vila *et al.*, 2016; Poirel *et al.*, 2018).

Além disso, os estudos conduzidos sobre as bactérias enteropatogênicas têm mostrado expressiva aderência quanto ao contexto sanitário de águas salinas, além de auxiliarem na complementação das análises de coliformes presentes no ambiente e nos estudos de qualidade ambiental (Hagler *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2011). Neste sentido, há grande preocupação com as doenças diarreicas nos países desprovidos de sistemas de tratamento sanitários eficientes (Teklehaimanot *et al.*, 2015), porque despejam altas cargas microbianas enteropatogênicas em corpos d'água de usos múltiplos (uso recreacional, consumo e fins agrícolas) e resultam em sérios riscos de saúde pública e coletiva, como os casos de promoção de óbito em crianças e mulheres gestantes (Soltan, 2001; Jafari *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2016).

Há um grande consenso em vários meios, principalmente dentro da administração pública, de que o mar atua como dispersante de coliformes termotolerantes, podendo ter sua densidade diminuída ao longo da costa. Embora esse tipo de argumento seja usado em várias instâncias de competências que são negligentes quanto a este problema flagrante, certamente não condiz com este pensamento ultrapassado; pois se os níveis de contaminação estiverem demasiadamente elevados é óbvio que esse efeito poderá ser totalmente o contrário.

É preciso entender que a dispersão dos microrganismos pode ter amplo alcance considerando apenas processos oceanográficos naturais como as ações de correntes, ventos e ondas, bem como organismos que usam estes ambientes a exemplo das aves migratórias (Palmgren *et al.*, 1997; Kinzelman *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2009; Alm *et al.*, 2018). Outro aspecto agravante condiz nas mudanças climáticas que podem alterar os níveis de

contaminação em função do regime pluviométrico de algumas regiões e conseqüentemente na distribuição de aves migratórias (Steele *et al.*, 2018), ou até mesmo na presença de macroalgas com carga microbiana provenientes de localidades contaminadas (Abreu *et al.*, 2016; Nafsin *et al.*, 2022).

### *Enterococcus* spp

Os *Enterococcus* spp. são bactérias Gram-positivas resistentes, comensais, gastrointestinais e que podem ser encontrados em diversos de ambientes (Selleck; Van Tyne; Gilmore, 2019). São eliminados pelas fezes e transmitidas por várias formas, compreendendo água, alimentos e rações contaminados (Byappanahalli *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2020; Cattoir, 2022). Dentre os ambientes no qual podem ser encontrados enterococos, são mencionados na literatura científica hospitais, praias, solo, água potável, água para agricultura e rios (Halliday; Ralston; Gast, 2015; Ben Said *et al.*, 2016; Chacón *et al.*, 2018). Tais pesquisas concentram-se principalmente em enterococos provenientes e disseminados de ambientes hospitalares.

Os animais aquáticos, aves, mamíferos, humanos, insetos, água e solo atuam como hospedeiros que contribuem para que essas bactérias adquiram genes de resistência a antibióticos capazes de causar infecção em humanos (Graham; Stack; Rea, 2020; Lebreton *et al.*, 2017; Cattoir, 2022). Em associação às características do clima tropical, essas bactérias podem se proliferar muito além da fonte poluidora e se “naturalizarem” em ambiente ao qual não pertencem, tornando as estirpes virulentas de enterococos em um problema clínico de primeira urgência (Devane *et al.*, 2020; Ramos *et al.*, 2020).

Grande parte das bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* não são capazes de causar patologia. Contudo, em estudo realizado por Lebreton *et al.*, (2017), foram identificados 25 espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* incluindo as espécies que podem portar genes patogênicos, *E. faecalis* (V583 e MN1) e *E. faecium* (MB5571 e M7M2). Essas duas espécies são causadoras de enfermidades infecciosas enterocócicas, principalmente *E. faecalis*, altamente resistentes a vancomicina (Gao; Howden; Stinear, 2018).

No Brasil, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) menciona a utilização de *Enterococcus* spp. ou *E. coli* para indicar as condições de balneabilidade das praias (Brasil, 2001). Sendo o órgão fiscalizador responsável em optar pelo uso de uma ou

ambas as duas bactérias indicadoras de contaminação recomendadas. No entanto, devido as características versáteis de adaptação e sobrevivência ambiental, os Enterococos talvez sejam os microrganismos mais pertinentes, quando comparados a *E. coli*, para avaliar o risco a saúde pública em praias localizadas em clima tropical e subtropical.

Dentro do contexto científico internacional, ambas as bactérias têm sido utilizadas em conjunto nos estudos de qualidade ambiental na água superficial, intersticial, sedimentos, vegetação, aves, animais aquáticos e resíduos, dentre outros constituintes do ecossistema praias (Rodrigues *et al.*, 2016; Cloutier; Mclellan, 2017; Zampieri *et al.*, 2017; Suzuki *et al.*, 2021; Smith *et al.*, 2022). Entretanto há notório destaque ao gênero Enterococos devido ao seu potencial de resiliência, como já mencionado.

#### *Vibrio* spp.

Compreendendo atualmente mais de 190 espécies descritas, os vibrios são bactérias gram negativas, com formato de bastonetes, anaeróbias facultativas e de ocorrência natural em ambientes salinos e estuarinos (Jiang *et al.*, 2022). Constituem um gênero com alta capacidade adaptativa, com poucas espécies patogênicas, no entanto as patogênicas são responsáveis por doenças em humanos e animais (Canellas *et al.*, 2022).

Atualmente, sabe-se que cerca de 12 espécies do gênero são capazes de provocar infecções em humanos por veiculação hídrica ou pela ingestão de organismos aquáticos crus ou cozidos de forma inadequada. Dentre eles *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* e *V. vulnificus* (Baker-Austin *et al.*, 2018). Agente causadora da colera, *V. cholerae* provoca diarreia aguda com alta letalidade, transmissibilidade hídrica ou no contato com pessoas infectadas (sintomáticas ou assintomáticas), presente principalmente em países em desenvolvimento (Broeck; Horvath; De Wolf, 2007).

Encontradas associadas principalmente a frutos do mar, *V. parahaemolyticus* é responsável por diarreias no qual a transmissibilidade aos humanos é de origem alimentar dado pelo consumo de mariscos, camarões e peixes contaminados, além de causarem danos econômicos uma vez constatada sua presença nesses alimentos (Wang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019).

Devido ao potencial de patogenicidade a humanos e organismos aquáticos, *V. alginolyticus* vem adquirindo cada vez mais relevância, pois essa bactéria pode conter genes de virulência provenientes de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* que desencadeia sério

quadro de infecção (Hernández-Robles *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2016).

A bactéria *V. vulnificus* é considerada uma das principais bactérias de origem alimentar, ficando à frente de microrganismos mais conhecidos como a *Salmonella*, *E. coli*, *Clostridium botulinum* (Oliver, 2015). É encontrada principalmente em ostras, que devido a sua capacidade de filtrar poluentes contidos na água contaminada, bioacumulam essas bactérias servindo como um hospedeiro do patógeno que, ao serem ingeridas cruas ou mal preparadas, desencadeiam infecções no novo hospedeiro (Oliver, 2015).

Em estudo em uma praia na China, foi constatado que os enterococos podem não indicar com exatidão o risco a exposição de banhistas, sendo recomendado o uso de outras bactérias como *Vibrio parahaemolyticus* para monitoramento rotineiro de praias (Ming *et al.*, 2020). O contato com a água contaminada em uma praia na Itália, levou um banhista idoso a adquirir celulite infecciosa cutânea, que possui *V. parahaemolyticus* como agente causal (Guillod; Ghitti; Mainetti, 2019). Ademais, também foram encontradas *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mitis* e *Morganella morganii* na mesma infecção, destacando uma possível relação de mutualismos desses microrganismos.

Em investigações realizadas em dez praias recreativas na Alemanha, durante dois anos, foram constatadas que a densidade de *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* nos sedimentos foram três vezes superior à água do mar, ressaltando o importante papel ecológico dos sedimentos como fonte de inóculo para o gênero (Böer *et al.*, 2013). No Brasil, foram identificadas vinte espécies de víbrios em água de praias fortemente impactadas com despejo sanitário, do qual dezoito possuíam potencial patogênico com maior ocorrência para *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *V. mediterranei* (Canellas *et al.*, 2021).

Na China foram relatadas ocorrência de 60 cepas de víbrios nas águas de oito praias, dentre elas: *V. harveyi* (18), *V. campbellii* (14), *V. owenii* (5), *V. coralliilyticus* (3), *V. sinaloensis* (3), *V. mediterranei* (3), *V. ponticus* (2), *V. orientalis* (2), *V. alginolyticus* (2), *V. aestivus* (2), *V. tubiashii* (2), *V. alfarensis* (1), *V. parahaemolyticus* (1), *V. hangzhouensis* (1) e *V. rotiferianus* (1) (Huang *et al.*, 2022). No mesmo experimento foram inoculadas espécies virulentas de *V. harveyi* (JSW-YELLOW) e *V. alginolyticus* (MEDF7) em alevinos de *Danio rerio*, houve mortalidade de todos os peixes decorridos 24h de aplicação.

As espécies de *Vibrio* em ambiente salino, incluindo as patogênicas, podem ter sua dispersão promovida a longas distâncias, aderidas a microplásticos (De Tender *et al.*, 2015; Kirstein *et al.*, 2016). Foram identificados patótipos de *E. coli* (44) e cepas do gênero víbrio (59), das quais foram confirmadas por PCR *V. cholerae* (12), *V. vulnificus* (5) e *V. mimicus* (1) colonizando micro-resíduos de plástico em uma praia brasileira (Silva *et al.*, 2019). Esses dados sugerem que as bactérias pesquisadas são capazes de criar biofilmes e serem transportadas para micro-habitats das praias onde não há contaminação.

Outra fonte de contaminação por *E. coli*, *Enterococcus* spp. e *Vibrio* ssp., que podem chegar aos micro-habitats da praia são os navios. Em estudo com oito navios em Singapura, foi contada a presença dessas três bactérias em água de lastro provenientes de outros países, com abundância de *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. alginolyticus*, apresentando grau de resistência antimicrobiana (Ng *et al.*, 2018). Vale ressaltar que a legislação brasileira não faz recomendação de uso e nem de pesquisas para quantificar e qualificar as espécies do gênero *Vibrio* em águas de praia e sedimentos, apenas de *E. coli* ou *Enterococcus* ssp., embora a literatura internacional afirme que apenas esses dois microrganismos talvez não sejam capazes de indicar com clareza o real grau de contaminação.

Nesse contexto, as análises que visem a detecção de patógenos nos sedimentos e na água intersticial se fazem tão necessárias quanto na água superficial do mar, de forma a estabelecer e validar novas políticas para qualificar a balneabilidade de praias.

### III. CAPÍTULO 1

## MICRO-HABITATS POTENCIAIS PARA A CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS DE ORIGEM FECAL EM UMA PRAIA AMAZÔNICA DE MACROMARÉ

O. L. S. VASCONCELOS<sup>1\*</sup>, L. S. BASTOS<sup>2</sup>, J. A. SANTOS<sup>3</sup>, M. C. C. FONSECA<sup>2</sup>, G. S. JESUS<sup>2</sup>, N. P. C. BEZERRA<sup>2</sup>, J. L. S. NUNES<sup>1</sup>

Universidade Federal do Maranhão<sup>1</sup>, Universidade Estadual do Maranhão<sup>2</sup>, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão<sup>3</sup>

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8418-6743>\*

[osmarluisvasconcelos@gmail.com](mailto:osmarluisvasconcelos@gmail.com)\*

### RESUMO

O objetivo da pesquisa foi verificar se os níveis de contaminação na água intersticial e no sedimento da praia estão na mesma magnitude da água do mar e/ou nos níveis previstos pela legislação. As coletas foram realizadas na praia do Olho D'Água, localizada em São Luís/MA, com três coletas em período seco e três em período chuvoso. Para as análises quali-quantitativas de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. utilizou-se o método de substrato enzimático cromogênico. Os dados foram submetidos à análise de variância multivariada permutacional em uma matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis. A quantidade de coliformes totais, *E.coli* e *Enterococcus* spp. não foram diferentes entre os micro-habitats estudados. Contudo houve diferença significativa nas densidades de microrganismos entre os micro-habitats no período chuvoso. Constatamos níveis de contaminação acima dos limites estabelecidos na legislação brasileira nos micro-habitats em período chuvoso. Nossos resultados apontam que é necessário considerar diferentes micro-habitats para o monitoramento da qualidade ambiental em praias.

**Palavras-chave:** Coliformes, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, Saúde única, Saneamento.

## POTENTIAL MICROHABITATS FOR CONTAMINATION BY FECAL BACTERIA ON AN AMAZONIAN MACROTIDAL BEACH

### ABSTRACT

Therefore, the goal of the research was to verify whether the levels of contamination in the interstitial water and sediment of the beach are of the same magnitude as the seawater and/or at the levels provided for by the legislation. The samples were obtained from Olho D'Água beach, located in São Luís/MA, with three samples collected during the dry season and three during the rainy season. The qualitative and quantitative analysis of total coliform, *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. used the chromogenic enzyme substrate method. The data was submitted to permutational multivariate analysis of variance in a Bray-Curtis dissimilarity matrix. Total coliforms, *E.coli* and *Enterococcus* spp. did not differ between the microhabitats studied. However, there was a significant difference in the densities of microorganisms between the microhabitats during the rainy season. Levels of contamination by microorganisms above the limits established by brazilian legislation were found in the microhabitats. These results indicate that it is necessary to consider different microhabitats when monitoring the environmental quality of beaches.

**KEYWORDS:** Coliforms, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, Single health, Sanitation.

### 1 INTRODUÇÃO

A Ilha do Maranhão apresenta potencial para o turismo e lazer, devido aos fatores culturais e naturais. Apesar de sua faixa litorânea cênica, composta por várias praias, esse ecossistema tem sido impactado negativamente por diversas ações antrópicas, principalmente pela redução de ambientes naturais devido ao uso e ocupação do solo, a diminuição da qualidade ambiental pela poluição e contaminação, além de outros problemas associados aos processos de desenvolvimento das cidades conduzidos pelo crescimento populacional (Aretano *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2020; Reis; Santos, 2020). A vigilância da qualidade de corpos hídricos é uma maneira de preservar esse tipo de ambiente, pois podem auxiliar na mitigação da poluição e evitar maiores problemas ambientais, sociais e econômicos decorrentes de contaminações (Baucke, Zambão; Serbent, 2016; Silva *et al.*, 2019).

A temática sobre balneabilidade em praias evidencia a alta relevância social, ambiental e econômica, tendo em vista que a degradação do ambiente reflete sobre questões de saúde pública e coletiva (Andrade *et al.*, 2012) que podem sobrecarregar o Sistema Único de Saúde (SUS) por doenças relacionadas à poluição hídrica. A balneabilidade de uma praia refere-se à qualidade daquele local proporcionar atividades de turismo e lazer. Normalmente é analisada de forma quali-quantitativa em monitoramentos por meio da contagem da densidade de microrganismos do grupo coliformes (Brasil, 2000). Entretanto, poucas pesquisas científicas têm-se voltado para esta temática no Brasil, embora sejam comumente direcionadas a estudos de microrganismos presentes na água e na areia de praias, bem como os impactos das atividades antrópicas sobre esses ecossistemas e à saúde humana (Berg; Guercio; Ulbricht, 2013; Campos; Cunha, 2015; Andrades *et al.*, 2020).

Os estudos que envolvem a contaminação de água superficial e da areia em praias localizadas na Ilha do Maranhão demonstram preocupação sanitária em função da não conformidade dos resultados com os valores aceitáveis contidos nas normas brasileiras de balneabilidade (Ferreira *et al.*, 2021; Rosa *et al.*, 2021). Provavelmente, a deficiência nos serviços de saneamento básico, coloca São Luís entre as 20 piores cidades com índice de saneamento básico do Brasil (Brasil, 2022). A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 274/2000 estabelece critérios para avaliar a balneabilidade das praias como locais próprios e impróprios para banho ou recreação, esses critérios consideram o número de bactérias termotolerantes, tais como *Escherichia coli* ou *Enterococcus spp.* a cada 100 mL de água analisada (Brasil, 2000).

Contudo, a mesma resolução se abstém da análise da água intersticial e do sedimento das praias, pois está limitada apenas a avaliações de microrganismos de origem fecal presentes exclusivamente na água superficial das praias, desconsiderando outras áreas em que os frequentadores comumente utilizam. Dessa forma, é importante ressaltar que muitos dos frequentadores não fazem uso do banho de mar como forma de evitar a sua contaminação, porém desconhecem que o sedimento e a água intersticial podem estar contaminados e desencadear doenças, destacando a importância da inserção de novos micro-habitats a serem analisados para definir a balneabilidade de uma praia.



Portanto, os potenciais riscos à saúde dos frequentadores são ofuscados pelas informações divulgadas principalmente para o banho, já que o comprometimento ambiental e sanitário das praias é generalizado e a imprescindibilidade para o estudo de outros parâmetros de qualidade ambiental é evidente. A pesquisa avaliou três micro-habitats comumente utilizados por frequentadores para aferir a qualidade sanitária, considerando os níveis de contaminação por microrganismos potencialmente patogênicos em praias de macromaré. Além disso, objetivou-se verificar se os níveis de contaminação na água intersticial e no sedimento da praia estão na mesma magnitude da água do mar e/ou nos níveis previstos pela legislação.

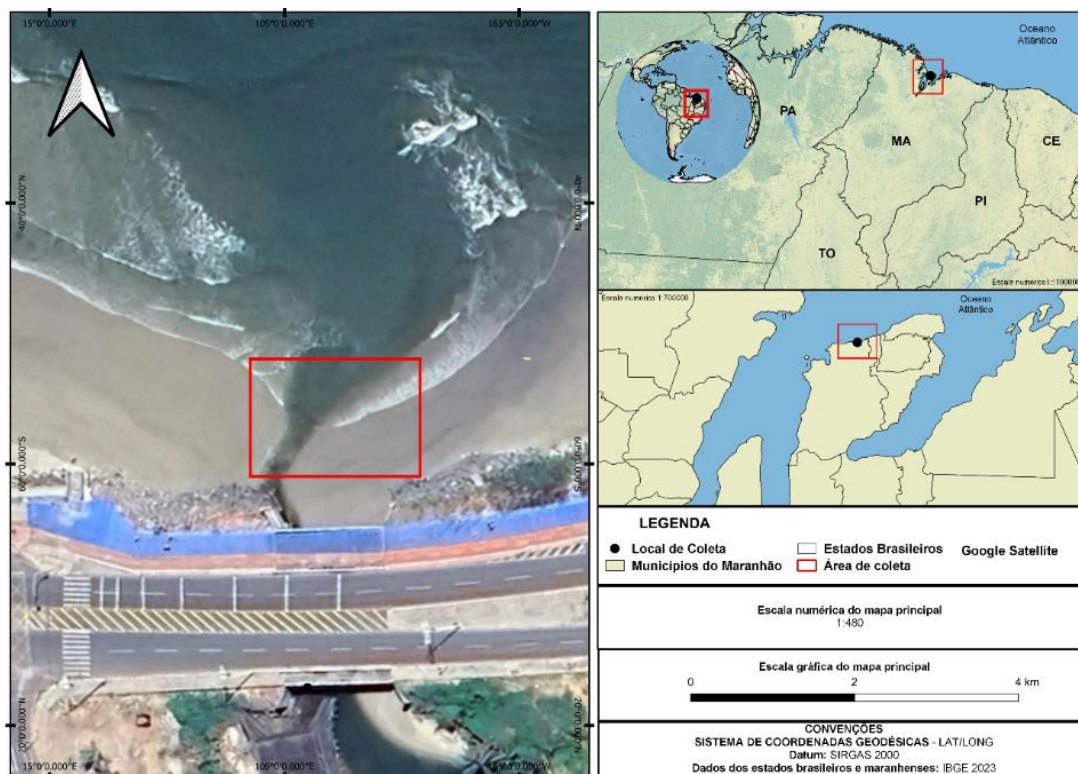
## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Área de estudo**

O litoral maranhense possui grande extensão, com diversas feições geológicas no qual é possível notar a predominância de estuários e manguezais como os ambientes costeiros (Lessa *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2008). A abrangência do Delta do Parnaíba, Lençóis, Golfão e Reentrâncias maranhenses permite compreender os domínios fisiográficos de cada compartimento do litoral maranhense, que possui como importante descritor a presença de macromarés (Souza Filho, 2005; Azevedo *et al.*, 2008).

A área de estudo da pesquisa foi executada na praia do Olho d'Água, situada a cerca de 10 km do centro de São Luís, localizada ao norte da região metropolitana da Ilha do Maranhão (Figura 1). Possui larga faixa de areia com textura fina e branca, com formação de dunas que podem chegar a 10 m de altura nos primeiros seis meses do ano. Considerada uma praia urbana, com forte desenvolvimento imobiliário e pressão demográfica, a praia do Olho d'Água foi escolhida devido ao grande volume de usuários e pelo histórico dos níveis de contaminação acima dos padrões de balneabilidade estabelecidos pela legislação (Brasil, 2000).

Figura 1. Localização da praia do Olho D'água, Ilha do Maranhão.



As amostragens foram realizadas na praia com a maré vazante próxima ao horário de baixamar durante seis meses, consistindo três coletas no período de chuva e três coletas no período de seca. Considerando o ambiente de praia, realizamos as amostragens de três micro-habitats: Água Superficial do Mar (AS), Água Intersticial (AI) e Sedimento (S). Desta forma, as amostragens dos micro-habitats referentes à AS, AI e S foram realizadas na foz do Rio Pimenta.

As amostras de AS foram coletadas na profundidade de um metro, sendo colhidas em frascos de vidro esterilizados, no volume de 100 mL de água. Para as amostras dos micro-habitats S e AI foram delimitadas uma área de 1m<sup>2</sup> para obtenção de cinco sub-réplicas (4 pontos nas laterais e 1 ponto central), homogêneas e retirada uma amostra composta (Cetesb, 2011). Para a amostragem no micro-habitat S foi considerada a profundidade de 5 cm para retirada de 20 g por subponto, totalizando 100 g de amostra composta. Enquanto, para amostragem do micro-habitat AI utilizou-se o mesmo método de coleta de S, com uma

profundidade de cerca de 15 cm com uso de seringas estéreis para sucção de 20 mL por subponto da água intersticial e posterior homogeneização, totalizando 100 mL de amostra.

Durante as coletas, as amostras foram mantidas refrigeradas em caixa isotérmica com gelo reciclável. Ao término da coleta, todas as amostras foram imediatamente transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água, localizado no Centro de Ciências Agrárias na Universidade Estadual do Maranhão para processamento e análises. Todos os procedimentos de amostragem em campo seguiram as recomendações do Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (Cetesb, 2011).

Em ambiente laboratorial, as amostras de AS e AI tiveram uma alíquota de 10 mL retirada para ser inserida em frascos esterilizados contendo 90 mL de água destilada estéril, com fator de diluição de 10 vezes. Uma unidade dos substratos enzimáticos cromogênicos Enterolert<sup>®</sup> e Colilert<sup>®</sup> foram adicionadas as amostras diluídas e o frasco foi agitado até a homogeneização completa, conforme recomendação do fabricante.

Para análise do micro-habitat S foram pesados  $25 \pm 0,2$  g da amostra úmida e adicionada a 225 mL de água destilada estéril (Silva *et al.*, 2021). Em seguida, a amostra foi homogeneizada e deixada em repouso por 15 minutos, decorrido o tempo de decantação foram retiradas duas alíquotas de 100 mL do sobrenadante para uma nova homogeneização com os substratos inseridos.

Por fim, as amostras foram inseridas nas cartelas do sistema Quanti-Tray/2000 (IDEXX, Inc.) e lacradas em seladora (IDEXX, Inc.). As cartelas lacradas foram incubadas em estufa bacteriológica em temperatura de 35°C (DP  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) para a análise de coliformes totais e *Escherichia coli*, enquanto para as análises de *Enterococcus* spp. as cartelas foram incubadas a temperatura 37°C (DP  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ), ambas as cartelas permaneceram durante 24 horas na estufa bacteriológica.

Para a quantificação das bactérias foram consideradas apenas as amostras positivas, para coliformes totais os poços das cartelas apresentaram coloração amarela, enquanto as amostras positivas para *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. apresentaram fluorescência quando foram submetidas à luz ultravioleta. As quantidades de poços positivos foram verificadas quanto ao valor de Número Mais Provável (NMP)/100 mL, de acordo com tabela fornecida pelo fabricante.

Os dados quantitativos foram investigados quanto as diferenças na ocorrência de Número Mais Provável (NMP) entre os micro-habitats e entre os períodos seco e chuvoso por

meio de uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) em uma matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis, com prévia transformação logarítmica ( $\log[x]$ ). Foi utilizado o pacote estatístico R program versão 4.3.0 para a análise dos dados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As maiores concentrações médias de microrganismos encontradas nos micro-habitats estudados corresponderam ao período chuvoso. Os coliformes totais apresentaram as maiores densidades médias na água superficial do mar (AS) e água intersticial (AI), enquanto para *E. coli* e *Enterococcus* spp. tiveram as maiores densidades na água da superfície do mar (AS) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de densidade média de microrganismos associados aos micro-habitats durante o período chuvoso.

<b>Micro-habitats</b> <b>/Microrganismos</b>	Coliformes Totais (NMP/100 mL)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/100 mL)	<i>Enterococcus</i> spp. (NMP/100 mL)
<b>AS</b>	2.419 x 10 <sup>4</sup>	5.487 x 10 <sup>3</sup>	8.842 x 10 <sup>3</sup>
<b>AI</b>	2.419 x 10 <sup>4</sup>	1.411 x 10 <sup>3</sup>	1.757 x 10 <sup>3</sup>
<b>S</b>	1.613 x 10 <sup>4</sup>	2.753 x 10 <sup>3</sup>	1.195 x 10 <sup>3</sup>

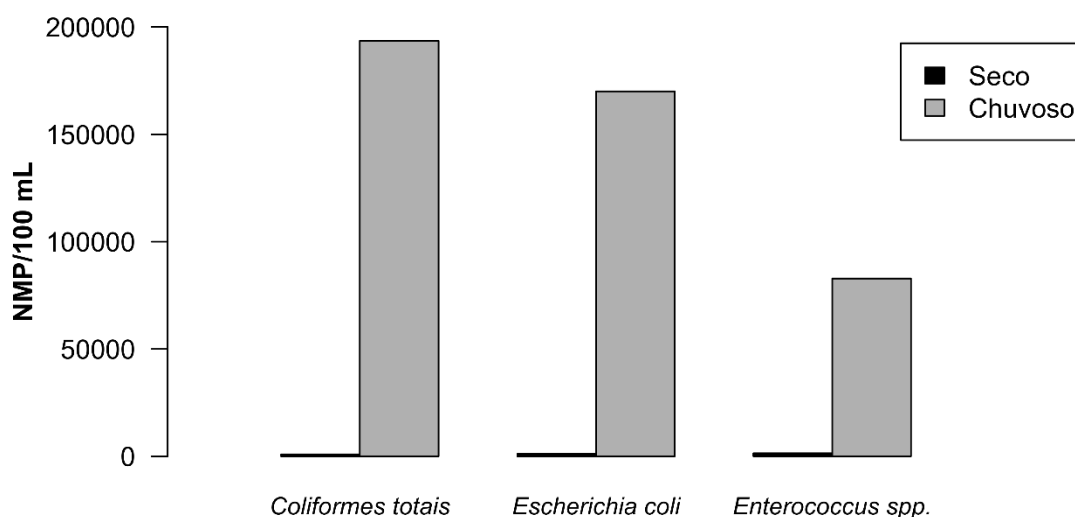
Legenda: AS (Água Superficial do Mar); AI (Água Intersticial); S (Sedimento); NMP (Número Mais Provável).

As bactérias do grupo coliformes e grupo *Enterococcus* spp. são mais frequentes no período chuvoso, principalmente nos dias após chuvas (Arnold *et al.*, 2017) e resultados semelhantes foram constatados em nossos estudos. No mesmo estudo, também foi feita associação positiva dos microrganismos com doenças agudas em surfistas que fizeram uso da água superficial do mar nas suas atividades recreativas e na prática do surfe (Arnold *et al.*, 2017). A relação do aumento da concentração de microrganismo com as chuvas ocorre em função das deficiências em infraestruturas sanitárias provenientes do escoamento de esgoto que

são drenadas ao mar junto com o volume de água precipitada após as chuvas intensas juntamente com o aumento das águas fluviais (Ackerman & Weisberg, 2003; Carney *et al.*, 2019).

A ocorrência de coliformes totais, *E. coli* e *Enterococcus* spp. não foram diferentes entre os micro-habitats estudados (PERMANOVA: Pseudo-F = 0,2657; df =2, 15; p = 0,856), mas apresentaram valores diferentes entre os períodos seco e chuvoso (PERMANOVA: Pseudo-F = 35,922; df =1, 16; p = 0,001, Figura. 2).

Figure 2: Somatório das densidades de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. em diferentes períodos sazonais nos micro-habitats.



Durante o período seco foram observados valores médios de  $<10^2$  NMP/100 mL para coliformes totais, *E. coli* e *Enterococcus* spp. presentes em todos os três micro-habitats, embora tenham sido encontrados valores individuais de  $3,1 \times 10^2$  e  $4,1 \times 10^2$  NMP/100 mL para *Enterococcus* spp nos micro-habitats AI e S, no período seco. Os sedimentos localizados em praias naturalmente contêm microrganismos alóctones, mas também podem apresentar inclusive as bactérias do grupo coliformes (Whitman *et al.*, 2014).

As oscilações na densidade de microrganismos como coliformes totais, *E. coli* e *Enterococcus* spp. podem fornecer informações sobre a qualidade ambiental de praias tropicais devido a sua praticidade de manuseio para deferir tais perturbações sanitárias resultantes de sazonalidades temporais e cargas poluidoras, porém as metodologias utilizadas podem

apresentar resultados falso-positivos quando comparados a outros métodos convencionalmente utilizado para detecção de microrganismos em ambientes (Ramoutar, 2020).

A densidade de *Enterococcus* spp. no período seco pode estar relacionada a maior resistência que esse grupo de bactérias possui quando relacionados ao grupo coliformes em ambiente de praia, pois resultados similares já foram encontrados em uma praia localizada na China (Zhang *et al.*, 2013). A plasticidade fisiológica de *Enterococcus* spp., persistência a cloração e ressecamento, confere taxas de sobrevivência em ambientes aquáticos mais elevados que a *E. coli* (Byappanahalli *et al.*, 2012).

A presença de *Enterococcus* spp. nos micro-habitats S e AI, mesmo em período seco, também já foi verificada em estudos realizados em uma praia de Maceió e descritos em revisão de literatura sobre o ambiente praial (Davino; Melo; Filho, 2015; Whitman *et al.*, 2014). Ambos ambientes que apresentaram contaminação por esse grupo de microrganismos podem estar associados ao lançamento de esgoto não tratado e contaminação advinda do lençol freático e da lavagem dos sedimentos pela coluna d'água da maré.

Os rios urbanos podem ser fonte de contaminação para os micro-habitats das praias, maximizando seus efeitos em períodos de elevada pluviosidade por carrear microrganismos patogênicos (coliformes totais e *E. coli*), visto que esses corpos hídricos também são afetados negativamente pelo desenvolvimento desestruturado das cidades (McGinnis *et al.*, 2018).

Próximo a foz do Rio Pimenta está situada uma estação elevatória de tratamento de efluentes que possui funcionalidade muito aquém do seu propósito, pois é comum o aparecimento do fenômeno da “Língua Negra”, caracterizado por uma mancha escura proveniente da foz do rio, drenada para o ambiente praial e que se contrasta com a tonalidade da cor comumente encontrada na água do mar (Gomes Filho; Rêgo; Maciel, 2021) que contribui para a sustentação dos resultados de contaminação encontrados em nossa pesquisa.

Na penúltima amostragem foi observado, *in loco*, o aumento no volume da drenagem do Rio Pimenta durante o momento que chovia na região, bem como mudança na coloração da água. Talvez a coloração apresentada tenha componentes de materiais em suspensão, mas é mais possível que tenha havido transbordamento da estação elevatória para o tratamento de esgoto localizado próximo da foz.

Quando comparados os micro-habitats Sedimento vs Água Intersticial, observou-se predomínio de *E. coli* no sedimento, enquanto coliformes totais e *Enterococcus* spp. tiveram

maior frequência em AI. Isso pode ocorrer porque *E. coli* e *Enterococcus* spp. utilizam o sedimento como substrato natural, o que pode contribuir para a contaminação de outros micro-habitats adjacentes como a água intersticial e a água superficial (Byappanahalli; Roll; Fujoka, 2012). Considerando que duas coletas realizadas no período chuvoso foram efetuadas após um dia chuvoso, a pluviosidade pode ter ocasionado disseminação desses microrganismos de um micro-habitat para o outro por meio da percolação da água. O número de coliformes presentes em sedimentos de praia pode ser elevado rapidamente em decorrência de intensas chuvas e os grãos de areia mais finos tendem a reter uma densidade maior de *E. coli* (Tamai *et al.*, 2023; Vogel *et al.*, 2017).

Ao serem comparados os micro-habitats Sedimento vs Água Superficial, foram encontrados resultados que demonstraram a contaminação mais elevada em AS por todos os microrganismos pesquisados, principalmente por coliformes totais. O sedimento pode apresentar níveis superiores de contaminação por bactérias de origem fecal quando correlacionado a água superficial, sobretudo por coliformes totais, tendo em vista que esse grupo de microrganismos foram identificados até as camadas de 15 cm de profundidade ao passo que *E. coli* foi encontrada somente em camadas superiores em estudo realizado em área costeira do Golfo Pérsico (Karbadehi *et al.*, 2017).

Densidades elevadas de coliformes podem ser encontradas na areia em contraste com água do mar em período de baixa mar, contudo níveis elevados de enterococos na água do mar também podem ser encontrados durante o período de preamar, estando os níveis de contaminação por esse gênero de bactérias correlacionado com o ciclo de maré, ocorrendo condições mais favoráveis de umidade ao desenvolvimento microbiano dentro desta zona (Bonilla *et al.*, 2007; Shibata *et al.*, 2004).

A correlação inversa encontrada na nossa pesquisa pode ser justificada pelo período chuvoso, no qual pode ter ocorrido lixiviação da microbiota presente nas camadas superficiais dos sedimentos e transportados até a água superficial do mar. Há um consenso na literatura científica no qual o sedimento é apontado como um reservatório de patógenos ativos de origem fecal e que podem ser carreados para outros micro-habitats da praia (Hartz *et al.*, 2008). Apesar de serem encontrados em níveis de densidade mais elevados na água superficial do mar, a *E. coli* e o *Enterococcus* spp. apresentam taxa de sobrevivência superior nos sedimentos quando comparados a água do mar (Feng *et al.*, 2013).

Quanto a comparação entre os micro-habitats Água Superficial vs Água Intersticial, a mesma magnitude na densidade de coliformes totais foi observada. A densidade de *E. coli* e *Enterococcus* spp. encontradas em AS foram 3.900 e 5.000 vezes maior do que o encontrado em AI, respectivamente. Os resultados deste trabalho evidenciam que esses microrganismos presentes em AI apresentaram densidades que podem ter sido carregados para água superficial do mar.

A difusão de AI para a AS é um dos principais meios de translocação de *Enterococcus* spp para outros micro-habitats, sendo esse gênero e *E. coli* os mais indicados para avaliar ambientes praias contaminados por esgotos quando comparados aos coliformes totais (Feng *et al.*, 2013; Ramoutar, 2020). Os efluentes ao entrarem em contato com o aflente, tem parte de sua carga orgânica decantada e outra parte permanece em suspensão na coluna d'água, a ação das ondas podem atuar como dispersante desses microrganismos patogênicos para outros micro-habitats (Ishii *et al.*, 2007).

Os aquíferos podem ser fonte de inóculo de microrganismos patogênicos proveniente de rupturas no sistema hidráulico sanitário e transportados para outros micro-habitats, sendo necessário o monitoramento da água retida no interstício (Domínguez *et al.*, 2014; Davino; Melo; Filho, 2015). Considerando a estação elevatória de tratamento localizada próxima à foz do rio e o período de alta pluviosidade, infere-se que a contaminação pelos microrganismos encontrados nos micro-habitats pode ter origem no aumento do nível do rio, em contaminação diretamente cruzada.

Características como taxa de sobrevivência relativamente alta e carga superficial negativa fazem com que *E. coli* tenha grande motilidade em camadas inferiores do solo, percorrendo grandes distâncias até alcançarem as águas subterrâneas (Foppen; Schijven, 2006). Tais características podem ter favorecido a contaminação de AI, visto que as amostragens foram realizadas em baixamar e a preamar pode ter contribuído para disseminação da contaminação por essa bactéria nos demais micro-habitats pesquisados.

Para avaliar a balneabilidade de uma praia, a Resolução Conama 274/2000 estabelece o quantitativo máximo de 2.000 bactérias de *E. coli* ou 400 bactérias de enterococos em 100 mL de água recreacional. Os resultados obtidos nessa pesquisa demonstram que todos os micro-habitats investigados estão contaminados durante o período chuvoso, embora a AS tenha



apresentado níveis mais elevados de *E. coli* e *Enterococcus* spp..

Os micro-habitats S e AI também apresentaram elevada densidade desses microrganismos muito além dos limites estabelecidos na Resolução Conama 274/2000 para AS. A legislação brasileira não faz menção a tolerância desses microrganismos em S e AI, contudo a mesma faz recomendações para que seja avaliado o micro-habitat sedimento para futuras modificações na Resolução, sem considerar outro micro-habitat importante como o interstício. Por outro lado, nossos resultados apresentam resultados robustos que consideram a água intersticial (AI) é fonte de microrganismos contaminantes que podem ser disseminados para AS e S.

As bactérias de origem entérica, encontradas em praias, podem causar infecções agudas quando o usuário sofre lesões perfurocortantes, atuando como porta de entrada para esses microrganismos patogênicos (Kueh *et al.*, 1992). Ademais, a ingestão involuntária promovida pelo contato com partes do corpo humano como boca, olhos, nariz, ouvidos e genitálias também atuam como locais de entrada para micróbios potencialmente nóxios e que podem afetar vários sistemas do corpo humano (Gargano *et al.*, 2017).

Em 2021, São Luís contava com 61,7% da população sem acesso ao tratamento de esgoto, neste mesmo ano, 267 pessoas foram internadas por sofrerem de alguma doença de veiculação hídrica, com dois óbitos (Brasil, 2022). Nossos resultados mostraram elevada densidade dos microrganismos nos três micro-habitats investigados que podem causar surtos endêmicos e agravar ainda mais o atual quadro de casos de internações clínicas por infecções.

Apesar da Resolução Conama 274/2000 não fazer referência aos coliformes totais, vale ressaltar a sua importância tendo em vista a elevada densidade encontrada em todos os micro-habitats. A sua presença pode indicar constância de outros micróbios potencialmente patogênicos pertencentes ou associados a esse grupo, representando assim, também um risco aos usuários que utilizam a praia nas proximidades da foz do Rio Pimenta.

#### 4. CONCLUSÃO

Nossos resultados apresentaram diferentes graus de densidade de microrganismos usados em estudos de monitoramento ambiental com fins de balneabilidade na área estudada;

Obtivemos níveis de contaminação por microrganismos acima dos limites estabelecidos na legislação brasileira nos três micro-habitats estudados durante o período chuvoso;

Os micro-habitats considerados neste estudo apresentaram diferença significativa quanto à densidade de microrganismos em período chuvoso utilizados para fins de avaliação ambiental de praias;

Ressaltamos a necessidade de considerar diferentes micro-habitats para os monitoramentos da qualidade ambiental em praias, pois tanto o sedimento quanto a água intersticial apresentaram densidades de microrganismos quando relacionados com a água do mar;

Os boletins de balneabilidade ou avisos de qualidade da praia devem fazer referência ao uso da areia da praia, bem como da água intersticial para os usuários das praias a fim de prevenir enfermidades e custos com serviço médico, principalmente para usuários imunossuprimidos por apresentarem maior suscetibilidade a infecção por microrganismos patogênicos, além de crianças, idosos e mulheres em período gestacional.

#### AGRADECIMENTOS

A CAPES (código 001) pela concessão da bolsa de mestrado e a Universidade Estadual do Maranhão e a Universidade Federal do Maranhão pelo apoio laboratorial na execução da pesquisa.

#### REFERÊNCIAS

ACKERMAN, Drew; WEISBERG, Stephen B. Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches. **Journal of water and health**, v. 1, n. 2, p. 85-89, 2003.

ALVES, L. S.; MACHADO, B. B. N.; OLIVEIRA, D. F. Balneabilidade das praias do litoral de Salvador-BA: investigação da interferência da precipitação nas densidades de *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 8, n. 4, 2020.

ARETANO, R. *et al.* Coastal dynamics vs beach users attitudes and perceptions to enhance environmental conservation and management effectiveness. **Marine pollution bulletin**, v. 123, n. 1-2, p. 142-155, 2017.

ARNOLD, Benjamin F. *et al.* Acute illness among surfers after exposure to seawater in dry- and wet-weather conditions. **American Journal of Epidemiology**, v. 186, n. 7, p. 866-875, 2017.

ANDRADE, M. P *et al.* Avaliação da Balneabilidade das praias do Município de Santos/SP nos últimos dez anos, Revista Ceciliana v. 4 n 1 p. 55-59, 2012.

ANDRADES, R. *et al.* Anthropogenic litter on Brazilian beaches: baseline, trends and recommendations for future approaches. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 151, p. 110842, fev. 2020.

AZEVEDO, Andrea Christina Gomes de; FEITOSA, Fernando A. Nascimento; KOENING, Maria Luise. Distribuição espacial e temporal da biomassa fitoplanctônica e variáveis ambientais no Golfão Maranhense, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 870-877, 2008.

BAUCKE, A. S.; ZAMBÃO, P. Hüther; SERBENT, M. P. Microbiological monitoring for assessment of bathing in a beach at North of Santa Catarina. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 20, n. 1, p. 62-72, 2016.

BERG, C. H.; GUERCIO, M. J.; ULBRICHT, V. R. Indicadores de balneabilidade: a situação brasileira e as recomendações da world health organization. **International Journal of Knowledge Engineering and Management (IJKEM)**, v. 2, n. 3, p. 83-101, 2013.

BONILLA, Tonya D. *et al.* Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. **Marine pollution bulletin**, v. 54, n. 9, p. 1472-1482, 2007.

BRASIL. Resolução CONAMA. Resolução nº 274, de 29 de Novembro de 2000. Seção 1, páginas 70 – 71. Define critérios de balneabilidade das águas brasileiras. Publicada no **Diário Oficial da União**, nº 18 de 25 de Janeiro de 2001.

BRASIL, Instituto Trata. **Ranking do Saneamento 2022**. 2022. Indicadores do Sistema

Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS). Disponível em: <https://tratabrasil.org.br/pt/estudos/ranking-do-saneamento/itb/ranking-do-saneamento-2022>. Acesso em: 28 jun. 2022.

BYAPPANAHALLI, Muruleedhara N. *et al.* Enterococos no ambiente. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 4, pág. 685-706, 2012.

BYAPPANAHALLI, Muruleedhara N.; ROLL, Bruce M.; FUJIOKA, Roger S. Evidence for occurrence, persistence, and growth potential of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's soil environments. **Microbes and environments**, v. 27, n. 2, p. 164-170, 2012.

CARNEY, Richard L. *et al.* Urban beaches are environmental hotspots for antibiotic resistance following rainfall. **Water Research**, v. 167, p. 115081, 2019.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. (2011). Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidas. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 326p.

DAVINO, Aline Mendonça Cavalcante; MELO, Milena Bandeira de; CAFFARO FILHO, Roberto Augusto. Assessing the sources of high fecal coliform levels at an urban tropical beach. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1019-1026, 2015.

Domínguez B. E.S. *et al.* Enterococci presence in interstitial water in intertidal areas of sandy beaches from Veracruz-Boca del Rio, Gulf of México. 2015.

GOMES FILHO, Gunnar Braga; RÊGO, Joherbert Carlos Lima; MACIEL, Rafael Ferreira. Georreferenciamento da microbacia do Rio Pimenta em São Luis - MA. Avaliação de Impactos Ambientais em Bacias de Drenagem Urbana. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 4, p. 85-100, 2021.

FERREIRA, L. T. *et al.* Qualidade microbiológica da água da praia do Araçagi-São Luís-MA, Brasil. **Revista Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás-RRS-FESGO**, v. 4, n. 01, p. 39-49, 2021.

HARTZ, A. *et al.* Survival potential of *Escherichia coli* and enterococci in subtropical beach sand: implications for water quality managers. **Journal of environmental quality**, v. 37, n. 3, p. 898-905, 2008.

FENG, Zhixuan *et al.* Modeling sediment-related enterococci loading, transport, and inactivation at an embayed nonpoint source beach. **Water Resources Research**, v. 49, n. 2, p. 693-712, 2013.

FOPPEN, J. W. A.; SCHIJVEN, J. F. Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions. **Water Research**, v. 40, n. 3, p. 401-426, 2006.

GARGANO, J. W. *et al.* Mortality from selected diseases that can be transmitted by water—United States, 2003–2009. **Journal of water and health**, v. 15, n. 3, p. 438-450, 2017.

ISHII, Satoshi *et al.* Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of *Escherichia coli* in Lake Superior. **Environmental science & technology**, v. 41, n. 7, p. 2203-2209, 2007.

KARBASDEHI, Vahid Noroozi *et al.* Indicator bacteria community in seawater and coastal sediment: the Persian Gulf as a case. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 15, p. 1-15, 2017.

KUEH, C. S. W.; KUTARSKI, P.; BRUNTON, M. Contaminated marine wounds—the risk of acquiring acute bacterial infection from marine recreational beaches. **Journal of Applied Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 412-420, 1992.

LESSA, Rosângela *et al.* **Biodiversidade de elasmobrânquios do Brasil**. MMA, 1999. Programa Nacional da Diversidade Biológica (PRONABIO), Ministério do Meio Ambiente (MMA), Recife.

MCGINNIS, Shannon *et al.* Human Bacteroides and total coliforms as indicators of recent combined sewer overflows and rain events in urban creeks. **Science of the total environment**, v. 630, p. 967-976, 2018.

RAMOUTAR, Sheldon. The use of Colilert-18, Colilert and Enterolert for the detection of faecal coliform, *Escherichia coli* and Enterococci in tropical marine waters, Trinidad and Tobago. **Regional Studies in Marine Science**, v. 40, p. 101490, 2020.

ROSA, F. C. *et al.* Identificação de fungos patogênicos em areia da praia do Calhau, São Luís – MA, litoral nordeste do Brasil. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 12, n. 1, p. 336-346, 2021.

REIS, N. S. S.; SANTOS, P. V. C. J. Caracterização das condições de manutenção e dos usos da zona costeira do Município de São Luís (MA): A educação Ambiental como alternativa de amenização de impactos. **Revista Brasileira De Educação Ambiental (RevBEA)**, v. 15, n. 5, p. 333-344, 2020.

SHIBATA, Tomoyuki *et al.* Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. **Water research**, v. 38, n. 13, p. 3119-3131, 2004.

SILVA, Neusely da *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 6ª ed. São Paulo : Blucher, 2021. 561p.

SILVA, J. C. *et al.* Condições de balneabilidade da Praia do Jacaré, em Cabedelo, PB, a partir da densidade de coliformes termotolerantes como bioindicador de qualidade da água. **Acta Scientia**, v. 1, n. 1, 2019.

SOUZA FILHO, Pedro Walfir Martins. Costa de manguezais de macromaré da Amazônia: cenários morfológicos, mapeamento e quantificação de áreas usando dados de sensores remotos. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 23, p. 427-435, 2005.

TAMAI, Soichiro *et al.* Growth and Decay of Fecal Indicator Bacteria and Changes in the Coliform Composition on the Top Surface Sand of Coastal Beaches during the Rainy Season. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1074, 2023.

VOGEL, Laura J. *et al.* Evaluation of methods to sample fecal indicator bacteria in foreshore sand and pore water at freshwater beaches. **Water research**, v. 121, p. 204-212, 2017.

ZHANG, Weiwei *et al.* Effects of rainfall on microbial water quality on Qingdao No. 1 Bathing Beach, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 66, n. 1-2, p. 185-190, 2013.

WHITMAN, Richard L. *et al.* Microbes in beach sands: integrating environment, ecology and public health. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 13, p. 329-368, 2014.

#### IV. CAPÍTULO 2

### FATORES AMBIENTAIS QUE INFLUENCIAM A DISTRIBUIÇÃO DE *Vibrio* spp. EM MICRO-HABITATS DE UMA PRAIA AMAZÔNICA

### ENVIRONMENTAL FACTORS THAT INFLUENCE THE DISTRIBUTION OF *Vibrio* spp. IN MICRO-HABITATS OF AN AMAZONIAN BEACH

Osmar Luis Silva Vasconcelos<sup>1\*</sup>

Jamerson Aguiar Santos<sup>2</sup>

Dália dos Prazeres Rodrigues<sup>3</sup>

Jorge Luiz Silva Nunes<sup>4</sup>

Universidade Federal do Maranhão<sup>1,4</sup>, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão<sup>2</sup>  
Instituto Oswaldo Cruz<sup>3</sup>

Correspondência:\*

[osmarluisvasconcelos@gmail.com](mailto:osmarluisvasconcelos@gmail.com)\*

#### RESUMO

As áreas costeiras vêm sofrendo cada vez mais com forte impacto ambiental causado pelo desenvolvimento econômico. Objetivamos investigar os fatores ambientais que influenciam a distribuição de *Vibrio* spp. em diferentes micro-habitats de uma praia de macromarés. As coletas foram realizadas na praia do Olho D'Água, localizada em São Luís/MA, com três coletas em período de baixa pluviosidade e três em período alta pluviosidade. Para as análises qualitativas, identificação das espécies e genes de virulência utilizamos técnicas moleculares. Os parâmetros abióticos pluviosidade, temperatura, salinidade e pH dos micro-habitats sedimento, água intersticial e água superficial foram avaliados com resultados apresentados em médias. Os dados foram submetidos à análise de variância multivariada permutacional em uma matriz de dissimilaridade de Jaccard. A presença de *Vibrio* spp. não foi diferente entre os micro-habitats estudados e nem durante os períodos sazonais. Contudo houve maior frequência no período de alta pluviosidade e o sedimento atuou como melhor substrato em ambos os períodos. Constatamos a presença de *V. cholera* e *V. parahaemolyticus* em diferentes períodos sazonais no sedimento, contudo sem genes de virulência. Nossos resultados apontam que é necessário considerar diferentes micro-habitats para o monitoramento da qualidade ambiental, pois a praia apresentou-se propícia ao desenvolvimento dessas bactérias.

## ABSTRACT

Coastal areas are increasingly suffering from strong environmental impacts caused by economic development. We aimed to investigate the environmental factors that influence the distribution of *Vibrio* spp. in different microhabitats of a macrotidal beach. The collections were carried out on Olho D'Água beach, located in São Luís/MA, with three collections during low rainfall periods and three during high rainfall periods. For qualitative analyses, identification of species and virulence genes, we use molecular techniques. The abiotic parameters rainfall, temperature, salinity and pH of the sediment, interstitial water and surface water microhabitats were evaluated with results presented as averages. Data were subjected to permutational multivariate analysis of variance in a Jaccard dissimilarity matrix. The presence of *Vibrio* spp. it was not different between the microhabitats studied or during seasonal periods. However, there was a greater frequency in the period of high rainfall and the sediment acted as the best substrate in both periods. We found the presence of *V. cholera* and *V. parahaemolyticus* in different seasonal periods in the sediment, however without virulence genes. Our results indicate that it is necessary to consider different microhabitats for monitoring environmental quality, as the beach is conducive to the development of these bacteria.

## 1 INTRODUÇÃO

A Ilha de Maranhão é considerada um dos principais destinos turísticos da região Nordeste do Brasil. É contemplada por uma extensa faixa litorânea composta por praias urbanas e não-urbanas. No entanto, a qualidade sanitária desse ambiente pode se tornar um potencial risco aos banhistas e frequentadores das praias pela contaminação provenientes de esgoto não tratado, negligenciados pela legislação brasileira e órgãos fiscalizadores.

A balneabilidade das praias brasileiras é regida pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 274/2000 que estabelece critérios para avaliar a qualidade sanitária das praias como locais próprios e impróprios para banho ou recreação, esses critérios consideram o número de bactérias termotolerantes, tais como *Escherichia coli* ou *Enterococcus* spp. a cada 100 mL de água analisada (Brasil, 2000).

A resolução seguiu modelos internacionais que utilizam *E. coli* como principal indicadora de contaminação fecal. Todavia, essa bactéria é utilizada desde o início do século 1900, permanecendo um hiato internacional que não amplia para a avaliação de outras bactérias



indicadoras da qualidade de águas recreacionais e nem de sedimentos.

Doenças como gastroenterite, febre tifóide, cólera e disenteria possuem como principal veículo transmissor a água contaminada, que exerce importante relevância na ocorrência de endemias e epidemias no mundo (Aram; Saalidong; Osei Lartey. 2021). Essas patologias têm como agente transmissores bactérias associadas a esgoto não tratado destinado clandestinamente a corpos d'água como rios e praias, uma vez que são encontradas em fezes de humanos e animais.

O gênero *Vibrio* é de ocorrência natural em ambientes estuarinos e salinos, embora grande parte das bactérias pertencentes a este gênero não apresentam virulência, 12 espécies são descritas como agentes de infecção capazes de causar patologias em seres humanos e animais aquáticos utilizados na alimentação (Canellas *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2022).

Com exceção de Portugal e a cidade do Rio de Janeiro, Brasil, não há normas internacionais que estabelecem a qualidade sanitária da areia (Krepsky *et al.*, 2020). Para a água localizada no interstício das praias há uma lacuna ainda maior, com a inexistência de recomendações para qualquer tipo de verificação de microrganismos. Esses locais comumente ignorados pelos órgãos internacionais, também são muito utilizados por frequentadores de praias, que são prejudicados pela falta de informação.

Por serem bactérias adaptadas aos mais variados ambientes, principalmente marinhos (Sampaio *et al.*, 2022), os víbrios merecem especial atenção dos programas de monitoramento ambiental das praias, pois podem também adquirir resistência ao ambiente e a antibióticos cada vez maior devido a sazonalidade e mudanças climáticas. Neste sentido, objetivamos investigar os fatores ambientais que influenciam a distribuição de *Vibrio* spp. em diferentes microhabitats de uma praia de macromarés.

## **2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

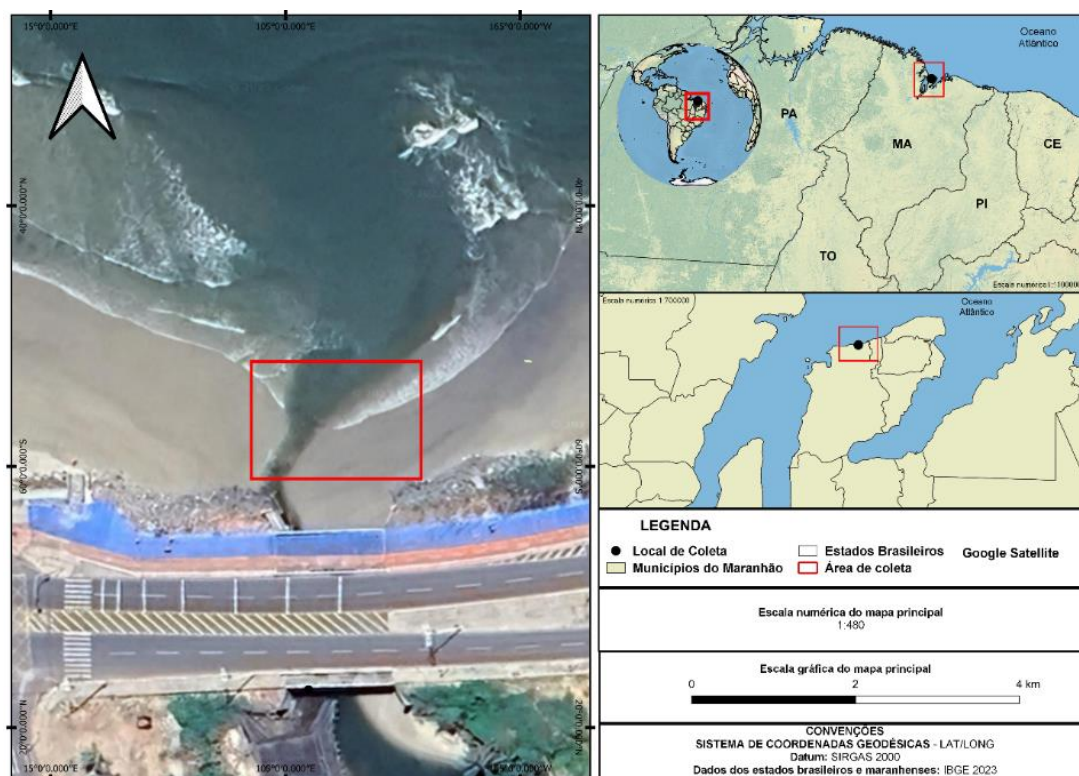
### **Local de estudo**

O litoral do Maranhão se estende por uma vasta área, apresentando uma variedade de formações geológicas onde se destaca a predominância de manguezais e estuários como principais ambientes costeiros (Lessa *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2008). A vasta extensão que engloba o Delta do Parnaíba, os Lençóis Maranhenses, o Golfão e as Reentrâncias Maranhenses proporcionam uma compreensão dos diferentes campos fisiográficos de cada região do litoral

maranhense, destacando a presença significativa de macromarés como um fator descritivo importante. (Souza Filho, 2005; Azevedo *et al.*, 2008).

A área de estudo da investigação foi conduzida na Praia do Olho d'Água, localizada a aproximadamente 10 km ao norte do centro de São Luís, na região metropolitana de São Luis, Maranhão. (Figura 1). Apresenta uma extensa faixa composta de areia fina e branca, onde dunas podem se formar alcançando até 10 metros de altura no primeiro semestre do ano. A praia do Olho d'Água foi escolhida devido ao grande número de frequentadores e as descrições históricas nos níveis de contaminação que excediam os padrões de balneabilidade estabelecidos em legislação (Brasil, 2000).

Figura 1. Localização da praia do Olho D'água, Ilha do Maranhão.



### Coleta das amostras

Ao longo de seis meses, as amostras foram coletadas na praia em maré vazante, divididas em três coletas realizadas em período de baixa pluviosidade e três em alta pluviosidade. As coletas foram feitas nos micro-habitats: Água Superficial do Mar (AS), Água Intersticial (AI) e Sedimento (S). Todas as amostragens dos micro-habitats AS, AI e S foram realizadas na região próxima à foz do Rio Pimenta. Para o micro-habitat AS foram coletados

100 mL a uma profundidade de um metro. Para as amostras de S e AI, demarcamos 1m<sup>2</sup> no qual retiramos 20 gramas de S a uma profundidade de 5 cm e 20 mL de AI em cerca de 15 cm de profundidade. S e AI foram extraídos de cinco sub-pontos com auxílio de espátulas e seringas estéreis. Em seguida, foram homogeneizadas formando 100 gramas (S) e 100 mL (AI) de amostras compostas. Todas as amostragens seguiram as recomendações da Cetesb (2011)

#### Parâmetros bacteriológicos

Após coletadas, as amostras foram submetidas a fricção com auxílio de *swabs* esterilizados da marca Transystem<sup>TM</sup> por cerca de três minutos e acondicionadas em meio de transporte Cary Blair. Para cada micro-habitat foram utilizados quatro *swabs* e, logo em seguida, transportados em temperatura ambiente até o Laboratório de Enterobactérias – LABENT/FIOCRUZ.

Em ambiente laboratorial, os *swabs* foram inoculados em solução salina alcalina a 1%, agitado por 15 minutos com auxílio de um bastão magnético e, em seguida, foram inoculados alíquotas da solução em placas de Petri contendo meio de cultura ágar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS) e incubados em estufa a 35°C durante 18 horas (Vieira *et al.*, 2011).

Para identificação bioquímica foi utilizado o método proposto por Noguerola e Blanch (2008). A extração do DNA bacteriano e detecção dos genes de virulência foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Vieira *et al.* (2011) utilizando PCR multiplex. Foram avaliados genes de virulência para *Vibrio cholerae* (ctx AB, rfb O1, tcp, zot, ace, rtx, tox, omp W, hly A e omp U) e *Vibrio parahaemolyticus* (tdh e trh).

#### Parâmetros ambientais

Os parâmetros pH, temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido foram verificados *in loco*, no momento da coleta, utilizando um medidor multiparâmetro da marca Hanna<sup>®</sup>. Para medir os parâmetros, a sonda com o sensor foi introduzida nas amostras dos micro-habitats e a leitura realizada após estabilização do aparelho.

Para a coleta dos dados de precipitação pluviométrica, consultamos os dados mensais disponibilizados pelo Laboratório de Meteorologia localizado no Núcleo Geoprocessamento (NUGEO/UEMA).

## Análise dos dados

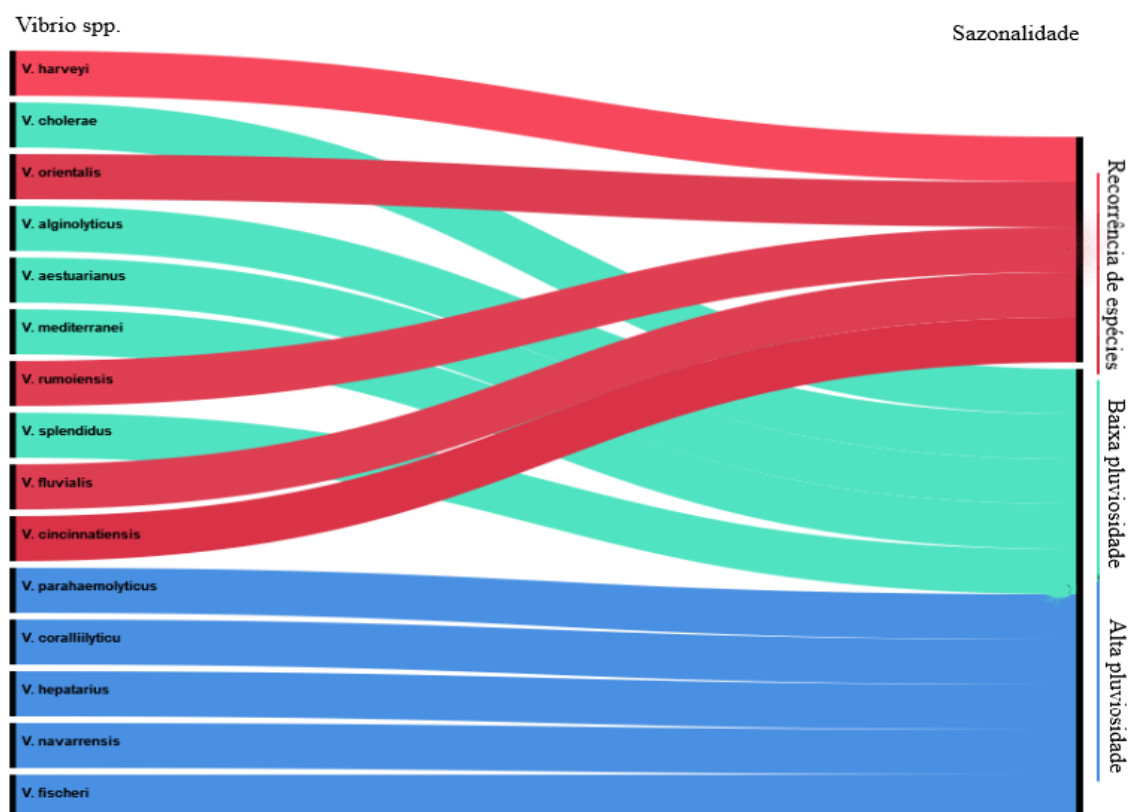
Os dados qualitativos foram investigados quanto a presença/ausência nos períodos de baixa e alta pluviosidade entre os micro-habitats por meio de uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) em uma matriz de dissimilaridade de Jaccard. Foi utilizado o pacote estatístico R program versão 4.3.0 para a análise dos dados. Para os dados abióticos de temperatura, salinidade, pH e pluviosidade foram utilizados médias e desvio padrão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ocorrência de *Vibrio* spp. não foi diferente entre os micro-habitats estudados (PERMANOVA: Pseudo-F = 0.7953;  $df = 2, 9$ ;  $p = 0,351$ ) e nem entre os períodos de baixa e alta pluviosidade (PERMANOVA: Pseudo-F = 1,7599;  $df = 1, 10$ ;  $p = 0,062$ ).

No total, foram identificadas 30 cepas de *Vibrio* spp., distribuídas em 10 espécies no período de baixa pluviosidade e em 10 espécies no período de alta pluviosidade. Em ambos os períodos foram encontradas 5 espécies recorrentes: *V. harveyi*, *V. orientalis*, *V. rumoiensis*, *V. fluvialis* e *V. cincinnatiensis* (Figura 2).

**Figura 2.** Distribuição de *Vibrio* spp. nos períodos de baixa e alta pluviosidade.



As médias trimestrais de precipitação variaram de  $51\pm 46$  mm, para o período de baixa pluviosidade e,  $551\pm 112$  mm para o período de alta pluviosidade. Esses dados demonstram que, mesmo com a variação nos índices de pluviosidade, houve espécies que se apresentaram adaptadas e presentes tanto no baixo quanto no alto período de chuvas. Este gênero possui elevada versatilidade, além de serem considerados autóctones no ambiente aquático. Todavia, os fatores ambientais e antropogênicos podem alterar a sua dinâmica populacional e a patogenicidade (Osunla; Okoh, 2017; Montánchez; Kaberdin, 2020).

No presente estudo, características inerentes ao gênero como adaptação ambiental, taxas frequentes de mutação genética e alta motilidade (Percival; Williams, 2014; Plágaro; Pearman; Kaberdin, 2019; Montánchez; Kaberdin, 2020), certamente tornaram possível a presença de cinco espécies nos dois períodos distintamente avaliados.

Condições ambientais favoráveis a proliferação de *Vibrio* spp. é apontada na literatura científica como fatores que contribuem para a importância de surtos sazonais, incluindo *Vibrio cholerae*, principal representante do gênero, (Huq *et al.*, 2005; Orruño; Kaberdin; Arana, 2017). As médias observadas nos micro-habitats durante os meses de nosso estudo confirmam que o clima tropical é favorável para a presença do gênero (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros abióticos analisados e médias nos micro-habitats.

Parâmetros	Micro-habitat		
	Sedimento	Água Intersticial	Água Superficial
Temperatura	$30,0\pm 0,2$	$29,3\pm 0,1$	$28,9\pm 0,6$
Salinidade (PSU)	$3,1\pm 0,6$	$13,9\pm 1,1$	$26,0\pm 3,5$
pH	$7,8\pm 0,3$	$7,3\pm 0,0$	$7,6\pm 0,0$

Algumas espécies patogênicas de *víbrio*, como *V. parahaemolyticus*, são encontradas com maior frequência na região costeira da América do Sul banhada pelo oceano Pacífico do que na costa banhada pelo oceano Atlântico (Raszl *et al.*, 2016). Esse fato pode estar associado ao fenômeno oceanográfico chamado ressurgência no Atlântico Sul, no qual as águas frias emergem a superfície, tornando as águas superficiais mais frias (Coe *et. al.*, 2007).

Em nossos resultados não foram encontradas grandes variações nas temperaturas dos micro-habitats entre si e em relação a média anual da região ( $>26^{\circ}\text{C}$ ). Essas temperaturas

exercem forte influência no *hotspot* do gênero no ecossistema natural marinho. Pois, as temperaturas acima de 15°C são relatadas como ideais para o desenvolvimento do gênero e surgimento de surtos de doenças provocadas por espécies de *Vibrio* patogênicas (Taylor *et al.*, 2018). Algumas espécies de *Vibrio* spp. não sofrem impactos negativos com o aumento de temperatura, a exemplo de *V. cholerae* (4-37°C), *V. fischeri* (8-34°C), *V. parahaemolyticus* (4-48°C) e *V. splendidus* (10-22°C), ao passo que *V. harvey* (26-30°C) possui maior sensibilidade a temperaturas mais elevadas (Sheikh *et al.*, 2022).

As espécies patogênicas *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* aqui identificadas, confirmam que o fator temperatura é importante para seus crescimentos, isso deixa um sinal de alerta claro para as mudanças climáticas que podem gerar surtos destas espécies em ambiente natural (Baker-Austin *et al.*, 2017).

Embora as amostragens tenham sido realizadas próximo a foz do Rio Pimenta em períodos sazonais diferentes, esse fator parece não ter provocado alteração na média da salinidade da água do mar, sendo classificada como uma região polihalinas (18,0 - 30,0) (Mitsch; Gosselink, 2015). Nossos resultados, assemelham-se ao encontrado por Kim e Chong (2017), no qual afirmam que *Vibrio* spp. criam biofilmes em taxas de salinidade próxima e até mesmo superior a água do mar.

Fatores ambientais como temperatura e salinidade estão relacionados e comumente são mencionados em investigações com *Vibrio* spp., como descrito por López-Cervantes *et al.* (2021), no qual analisaram diferentes temperaturas (28, 30 e 33 °C) e proporções de NaCl (20, 30 e 35 PSU), concluindo que *V. parahaemolyticus* tem sua expressão gênica virulenta favorecida mais pela concentração de sais do que pela temperatura, embora ambas sejam pertinentes. Cepas de *V. fischer* também são persistentes as mudanças de salinidade no ambiente, provocadas pela sazonalidade e fluxos de águas (Soto *et al.*, 2009).

Nossos resultados mostraram que valores de pH entre neutro e alcalino foram propícios para o desenvolvimento de espécies de vibrios nos micro-habitats analisados. A faixa de pH entre 7,5 e 8,3 é ideal para o crescimento de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* (Whitaker *et al.*, 2010; Escobar *et al.*, 2015)

Apesar de terem seu desenvolvimento cessado em pH ácido no estômago, ainda sim podem afetar pessoas portadoras da doença celíaca, esofagite ou que foram submetidas a procedimentos cirúrgicos de remoção do estômago, visto que nesses casos há uma desregulação

no pH (5,7 - 6,8) tornando-as susceptíveis a colonização de patógenos gastrointestinais (Beasley *et al.*, 2015). Ressaltamos que os vibrios presentes no ambiente pesquisado podem ser ingeridos involuntariamente ou terem acesso aos organismos por outras portas de entradas (narinas, olhos, ouvidos, etc.), encontrando um novo hospedeiro susceptível.

No período de baixa pluviosidade, houve predominância de *Vibrio* spp. no micro-habitat sedimento (58,3%), seguido da água intersticial (25%) e água superficial (16,7%). As espécies mais recorrentes foram *V. harveyi* (28,5%) e *V. orientalis* (28,5%). Em nossos resultados notamos que não há recorrência de uma mesma espécie em um mesmo micro-habitat (Tabela 2).

**Tabela 2.** Frequência de *Vibrio* spp. em período de baixa pluviosidade.

<i>Vibrio</i> spp.	Micro-habitat			Total
	Sedimento	Água Intersticial	Água Superficial	
<i>V. harveyi</i>	2	-	-	2
<i>V. cholerae</i>	1	-	-	1
<i>V. orientalis</i>	2	-	-	2
<i>V. alginolyticus</i>	1	-	-	1
<i>V. aestuarianus</i>	1	-	-	1
<i>V. mediterranei</i>	-	1	-	1
<i>V. rumoiensis</i>	-	1	-	1
<i>V. splendidus</i>	-	1	-	1
<i>V. fluvialis</i>	-	-	1	1
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	-	1	1
Total	7	3	2	12

Os nossos resultados apresentam maior distribuição e riqueza de *Vibrio* spp. no sedimento, assim como encontrado por Wang *et al.* (2019) em pesquisa nas praias da China quando comparado com a água do mar. A relação encontrada de *Vibrio* spp. no sedimento foi três vezes superior a água do mar, em estudo realizado na Itália (Vezzuli *et al.*, 2009). Ressaltamos que os estudos relacionando a presença de *Vibrio* spp. em micro-habitats distintos de praias ainda são incipientes e que necessitam ser estudados para maior compreensão do ecossistema marinho.

A maior frequência das bactérias no sedimento pode ser explicada pelo teor de matéria orgânica concentrada nesse micro-habitat, considerada como superior a água do mar (Hedges; Keil, 1995). Fatores hidrodinâmicos como amplitudes de marés, ação de ondas e regime de marés também influenciam na deposição de matéria orgânica nos sedimentos (Incera *et al.*, 2003), pois as bactérias utilizam o carbono presente para desenvolverem seu metabolismo.

A temperatura mais elevada do sedimento em relação a água intersticial e do mar encontrada em nosso estudo também pode ter favorecido a maior concentração de *Vibrio* spp.. O sedimento é capaz de reter e estabilizar mais calor que serve para desenvolvimento microbiano, além de aporte nutricional quando comparados a água superficial do mar (Malavé-Llamas *et al.*, 2021).

Encontramos no sedimento, uma cepa de *V. cholerae* (não O1 e não O139) ompW não toxicogênica. Não obstante, mesmo não portadora de genes de virulência, ainda sim são capazes de ocasionar diarreia com menor gravidade quando comparadas a cólera (O1 e O139) (Islam *et al.*, 2020; Bhandari *et al.*, 2021; Brasil, 2023). Todavia, pesquisas mais recentes avaliam possíveis mutações genéticas de não O1 e não O139 (Biswas *et al.*, 2022), uma vez que as pressões atópicas podem favorecer cada vez mais o surgimento de genes mutacionais, além de se adaptarem aos micro-habitats mais favoráveis para se desenvolverem.

Hodiernamente, *V. harveyi* e *V. alginolyticus* são consideradas representantes em ascensão patogênica do gênero com número de notificações em humanos aumentando, principalmente *V. alginolyticus*. A principal forma de contágio dessas espécies é relatada pelo contato com águas costeiras, causando lesões e bolhas hemorrágicas na pele (Akram; Stevens; Konecny, 2015; Slifka; Newton; Mahon, 2017).

Não incomum, é possível encontrar objetos perfurocortantes como conchas e fragmentos de resíduos sólidos imersos na água do mar ou enterrados no sedimento. Esses objetos podem servir como facilitadores para a entrada no organismo humano de *Vibrio* spp. patogênicos e negligenciáveis, principalmente em crianças, que costumam utilizar mais a área de sedimento para recreação. Portanto, o sedimento em período de baixa pluviosidade requer especial atenção dos frequentadores pela presença da maior riqueza de espécies de *Vibrio* spp.

Dentre nossos resultados encontramos frequência de *V. splendidus*, *V. mediterranei* e *V. rumoiensis* no micro-habitat água intersticial, semelhante ao encontrado por Narracci, Acquaviva e Cavallo (2014). Infecções que atacam e causam patologias em organismos



aquáticos em camarões, ostras e berbigões, também podem ser transmitidas por *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus* e *V. aestuarianus* (Abraham; Palaniappan, 2004; Parizadeh *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2021), encontrados em nosso estudo em diferentes micro-habitats.

Apesar de ainda não representarem um perigo a saúde pública, muitas espécies do gênero encontrados em nosso local de investigação podem ser carregadas pelo regime de maré ou pela vazão do rio para regiões mais distantes, onde são capazes de encontrar e/ou infectar organismos aquáticos causando impacto negativo na economia e ecologia local.

Situados no micro-habitat água superficial, *Vibrio fluvialis* e *V. cincinnatiensis* também possuem perspectivas de se tornarem microrganismos causadores de doenças, com eventuais surtos. A infecção por *V. fluvialis* é facilitada pelo contato com a água superficial do mar contaminada, enquanto a infecção por *V. cincinnatiensis* não é relatada pelo contato em nenhum micro-habitat, pois essa espécie dificilmente é encontrada em ambiente salino ou estuarino (Igbinsosa; Okoh, 2010), que nos desperta a atenção da sua presença quanto a sua origem. Ambas conseguem causar diarreia em pessoas idosas imunossuprimidas, embora os casos sejam raros (Wuthe; Aleksic; Hein, 1993; Kunitomo *et al.*, 2022).

No período de alta pluviosidade, houve predominância de *Vibrio* spp. no micro-habitat sedimento (44,5%), seguido da água intersticial (33,3%) e água superficial (22,2%), semelhante ao ocorrido no período de baixa pluviosidade. As espécies mais recorrentes foram *V. fluvialis* (27,8%), seguindo *V. rumoiensis*, *V. parahaemolyticus*, *V. coralliilyticus* e *V. hepatarius*, com 11,1% de ocorrência cada.

Em nossos resultados notamos que houve recorrência de uma mesma espécie em um mesmo micro-habitat e que 50% (5) das espécies de víbrios encontradas no período de baixa pluviosidade, recorrentes no período de alta pluviosidade (Tabela 3).

**Tabela 3.** Frequência de *Vibrio* spp. em período de alta pluviosidade.

Vibrio spp.	Micro-habitat			Total
	Sedimento	Água Intersticial	Água Superficial	
<i>V. harveyi</i>	1	-	-	1
<i>V. rumoiensis</i>	-	1	1	2
<i>V. orientalis</i>	1	-	-	1
<i>V. navarrensis</i>	-	1	-	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	-	-	2
<i>V. coralliilyticus</i>	1	-	1	2
<i>V. fischeri</i>	-	1	-	1
<i>V. hepatarius</i>	-	1	1	2
<i>V. fluvialis</i>	2	2	1	5
<i>V. cincinnatiensis</i>	1	-	-	1
Total	8	6	4	18

Ainda que cinco espécies tenham sido recorrentes em ambos os períodos, percebemos diferenças na distribuição das bactérias nos micro-habitats. Notadamente as espécies *V. harveyi* e *V. orientalis* tiveram frequência reduzida no sedimento; *V. rumoiensis* possivelmente apresentou fluxo migratório do sedimento para a água intersticial e superficial; houve motilidade de *V. fluvialis* da água superficial para o sedimento e água intersticial, onde multiplicaram a sua frequência nesses dois micro-habitats; e *V. cincinnatiensis* se translocaram completamente da água superficial para o sedimento, possivelmente pelo regime de marés.

Essa dinâmica na predileção de *Vibrio* spp. pelos micro-habitats em nossa investigação pode ser atribuída ao aumento na vazão do Rio Pimenta provocada pela alta pluviosidade. Outro fator que pode justificar, é o extravasamento em uma unidade de tratamento de esgoto localizada próximo a área de estudo, posto que a temperatura, pH e salinidade não apresentaram variação durante os períodos investigados.

As espécies encontradas apresentaram comportamento peculiar nos micro-habitats, se concentrando gradualmente no sedimento, provavelmente percoladas para o interstício e lixiviadas para a água superficial do mar. Esse padrão sugere que as bactérias foram transportadas pelo aumento do fluxo do rio, influenciado pela alta pluviosidade e pela granulometria do sedimento.

Entre as espécies identificadas, *V. fluvialis* apresentou comportamento versátil, onipresente em todos os micro-habitats. Atenção particular deve ser dada a nossa constatação, pois esta espécie foi identificada também no período de baixa pluviosidade, em menor frequência e em apenas um micro-habitat. São capazes de sobreviver por um ano sem inalterar seus fatores de virulência (Amel *et al.*, 2008).

Duas cepas de *V. parahaemolyticus* foram encontradas no sedimento, contudo negativas para os genes de virulência *tdh* e *trh*, entretanto, sua presença, requer cuidado. Podem sobreviver no sedimento até que as condições de temperatura estejam favoráveis para colonizarem a água do mar em busca de um hospedeiro, geralmente frutos do mar (De Paola *et al.*, 1990).

Várias espécies do gênero não possuem caráter de patogenicidade, a exemplo de *V. rumoiensis*, *V. navarrensis*, *V. coralliilyticus*, *V. fischeri* e *V. hepatarius*, encontradas em distintos micro-habitats em nosso estudo. Porém, *V. rumoiensis* tem constantes alterações genômicas que permitem adaptação; *V. navarrensis* seja associada a poluição direta por esgoto; *V. coralliilyticus*, relacionada a declínio infeccioso de corais; *V. hepatarius*, relacionado a infecções raras em peixes; e *V. fischeri* relacionado positivamente em estudos biológicos (Santos *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2020; Christensen; Tepavčević; Visick, 2020; Canellas *et al.* 2021; Bagci *et al.*, 2023).

#### 4. CONCLUSÃO

Não houve diferença estatística entre os parâmetros abióticos estudados entre os períodos de alta e baixa pluviosidade. Apesar da presença de várias espécies de vibrios nos três micro-habitats estudados, a riqueza de espécies encontrada no sedimento, nos dois períodos, mostrou esse ser o ambiente mais recorrente para cinco espécies. O período de alta pluviosidade parece ter maior presença de *Vibrio* spp, com o Rio Pimenta sendo a sua mais provável fonte de contaminação.

O registro das espécies *V. fluvialis*, *V. harveyi* e *V. cincinnatiensis*, consideradas como patógenos emergentes com raros casos de infecção em humanos não podem ser negligenciadas nos monitoramentos da qualidade ambiental por estarem relacionadas a enfermidades com várias espécies de organismos aquáticos, bem como espécies ameaçadas e corais.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, T. Jawahar; PALANIAPPAN, R. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 81-90, 2004.

AKRAM, Ayesha; STEVENS, Robert P.; KONECNY, Pamela. Photobacterium damsela and *Vibrio harveyi* hand infection from marine exposure. **Med J Aust**, v. 203, n. 5, p. 224-5, 2015.

AMEL, Ben Kahla-Nakbi; AMINE, Besbes; AMINA, Bakhrout. Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. **Microbiological Research**, v. 163, n. 3, p. 323-328, 2008.

ARAM, Simon Appah; SAALIDONG, Benjamin M.; OSEI LARTEY, Patrick. Comparative assessment of the relationship between coliform bacteria and water geochemistry in surface and ground water systems. *Plos one*, v. 16, n. 9, p. e0257715, 2021.

BAĞCI, Kemal *et al.* *Vibrio* hepatarius septicemia with subacute enteritis in common guitarfish, *Rhinobatos rhinobatos*. **Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences**, v. 8, n. 2, p. 211-217, 2023.

CANELLAS, Anna Luiza Bauer *et al.* O gênero *Vibrio*: conceitos atuais e novas perspectivas. **Revista da Biologia**, v. 22, n. 1, p. 14-31, 2022.

CANELLAS, Anna LB *et al.* *Vibrio* species in an urban tropical estuary: Antimicrobial susceptibility, interaction with environmental parameters, and possible public health outcomes. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1007, 2021.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. (2011). Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 326p.

COE, Heloisa H. G *et al.* Peculiaridades ecológicas da região de Cabo Frio. **Revista Tamoios**, v. 3, n. 2, 2007.

CHRISTENSEN, David G.; TEPAVČEVIĆ, Jovanka; VISICK, Karen L. Genetic manipulation

of *Vibrio fischeri*. **Current protocols in microbiology**, v. 59, n. 1, p. e115, 2020.

BAĞCI, Kemal *et al.* *Vibrio hepatarius* septicemia with subacute enteritis in common guitarfish, *Rhinobatos rhinobatos*. **Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences**, v. 8, n. 2, p. 211-217. 2023.

BAKER-AUSTIN, Craig *et al.* Non-cholera vibrios: the microbial barometer of climate change. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 1, p. 76-84, 2017.

BEASLEY, DeAnna E. *et al.* The evolution of stomach acidity and its relevance to the human microbiome. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0134116, 2015.

BHANDARI, Murari *et al.* Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae*—a review. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v. 89, p. 104726, 2021.

BISWAS, Quoelee *et al.* Genetic and mutational analysis of virulence traits and their modulation in an environmental toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strain, VCE232. **Microbiology**, v. 168, n. 2, p. 001135, 2022.

BRASIL. Resolução CONAMA. Resolução nº 274, de 29 de Novembro de 2000. Seção 1, páginas 70 – 71. Define critérios de balneabilidade das águas brasileiras. Publicada no **Diário Oficial da União**, nº 18 de 25 de Janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Doenças Transmissíveis. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/colera/situacao-epidemiologica/arquivos/nota-tecnica-no-68-2023-cgzv-dedt-svsa-ms/view>. Acesso em: 17 de jan. 2024

DE PAOLA, Angelo *et al.* Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and oysters. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 8, p. 2299-2302, 1990.

GARCIA, Céline *et al.* *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov., pathogenic to the edible cockles *Cerastoderma edule* in France, and establishment of *Vibrio aestuarianus* subsp. *aestuarianus* subsp. nov. and *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 004654, 2021.

HEDGES, John I.; KEIL, Richard G. Sedimentary organic matter preservation: an assessment

and speculative synthesis. **Marine chemistry**, v. 49, n. 2-3, p. 81-115, 1995.

HUQ, Anwar *et al.* Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4645-4654, 2005.

IGBINOSA, Etinosa O.; OKOH, Anthony I. *Vibrio fluvialis*: an unusual enteric pathogen of increasing public health concern. **International journal of environmental research and public health**, v. 7, n. 10, p. 3628-3643, 2010.

INCERA, M. *et al.* Temporal and spatial variability of sedimentary organic matter in sandy beaches on the northwest coast of the Iberian Peninsula. Estuarine, **Coastal and Shelf Science**, v. 58, p. 55-61, 2003.

ISLAM, M. Sirajul *et al.* Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae*. **Vaccine**, v. 38, p. A52-A62, 2020.

ESCOBAR, Luis E. *et al.* A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions. **Acta Tropica**, v. 149, p. 202-211, 2015.

JIANG, Chunqi *et al.* *Vibrio* Clade 3.0: new Vibrionaceae evolutionary units using genome-based approach. **Current microbiology**, v. 79, p. 1-15, 2022.

KIM, Lan Hee; CHONG, Tzyy Haur. Physiological responses of salinity-stressed *Vibrio* sp. and the effect on the biofilm formation on a nanofiltration membrane. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 3, p. 1249-1258, 2017.

KREPSKY, Natascha *et al.* Dry sand quality: the case study of a touristic beach from Rio de Janeiro, Brazil. **Fronteiras**, v. 9, p. 32-52, 2020.

KUNITOMO, Kotaro *et al.* Skin and soft tissue infections and bacteremia caused by *Vibrio cincinnatiensis*. **IDCases**, v. 29, p. e01564, 2022.

KUEH, C. S. W.; KUTARSKI, P.; BRUNTON, M. Contaminated marine wounds—the risk of acquiring acute bacterial infection from marine recreational beaches. **Journal of Applied Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 412-420, 1992.

LÓPEZ-CERVANTES, Gabriela *et al.* Temperature and salinity modulate virulence and PirA gene expression of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND. **Aquaculture International**, v. 29, n. 2, p. 743-756, 2021.

MALAVÉ-LLAMAS, Karlo *et al.* Evaluation of Monitored and Unmonitored Bacteria in Recreational Beaches in Puerto Rico: Underlining the Environmental Factors that Affect Beach Quality. **EC Microbiology**, v. 17, p. 86-95, 2021.

MITSCH, William J.; GOSSELINK, James G. **Wetlands**. John Wiley & Sons, 2015.

MONTÁNCHEZ, Ixaso; KABERDIN, Vladimir R. *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. **Marine environmental research**, v. 154, p. 104850, 2020.

NARRACCI, M.; ACQUAVIVA, M. I.; CAVALLO, R. A. Mar Piccolo of Taranto: *Vibrio* biodiversity in ecotoxicology approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 3, p. 2378-2385, 2014.

ORRUÑO, M.; KABERDIN, V. R.; ARANA, I. Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp.: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1-7, 2017.

OSUNLA, Charles A.; OKOH, Anthony I. *Vibrio* pathogens: A public health concern in rural water resources in sub-Saharan Africa. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 10, p. 1188, 2017.

PARIZADEH, Leila *et al.* Ecologically realistic model of infection for exploring the host damage caused by *Vibrio aestuarianus*. **Environmental microbiology**, v. 20, n. 12, p. 4343-4355, 2018.

PERCIVAL, Steven L.; WILLIAMS, David W. *Vibrio*. In: Microbiology of waterborne diseases. **Academic Press**, 2014. p. 237-248.

PLÁGARO, Ander Hernández; PEARMAN, Peter B.; KABERDIN, Vladimir R. Defining the transcription landscape of the Gram-negative marine bacterium *Vibrio harveyi*. **Genomics**, v.

111, n. 6, p. 1547-1556, 2019.

RASZL, S. M. *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1201-1222, 2016.

SAMPAIO, Ana *et al.* *Vibrio* spp.: Life strategies, ecology, and risks in a changing environment. **Diversity**, v. 14, n. 2, p. 97, 2022.

SANTOS, Eidy de O *et al.* Genomic and proteomic analyses of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* reveal a diverse virulence repertoire. **The ISME journal**, v. 5, n. 9, p. 1471-1483, 2011.

SLIFKA, KM Jacobs; NEWTON, A. E.; MAHON, B. E. *Vibrio alginolyticus* infections in the USA, 1988–2012. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 7, p. 1491-1499, 2017.

SOUZA FILHO, Pedro Walfir Martins. Costa de manguezais de macromaré da Amazônia: cenários morfológicos, mapeamento e quantificação de áreas usando dados de sensores remotos. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 23, p. 427-435, 2005.

SOTO, William *et al.* Salinity and temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse ecological niches. **Microbial ecology**, v. 57, p. 140-150, 2009.

SHEIKH, H. I. *et al.* Temperature upshift mostly but not always enhances the growth of *Vibrio* species: A systematic review. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, p. 959830, 2022.

TANAKA, Mami *et al.* Genomic characterization of closely related species in the Rumoiensis clade infers ecogenomic signatures to non-marine environments. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 8, p. 3205-3217, 2020.

TAYLOR, Marsha *et al.* Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* associated with consumption of raw oysters in Canada, 2015. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 9, p. 554-559, 2018.

VEZZULLI, Luigi *et al.* Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy). **Microbial ecology**, v. 58, p. 808-818, 2009.



VIEIRA, Regine H. S. F *et al.* Kanagawa-negative, tdh-and trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. **Current microbiology**, v. 63, p. 126-130, 2011.

VEZZULLI, Luigi *et al.* Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy). **Microbial ecology**, v. 58, p. 808-818, 2009.

WANG, Xiaolei *et al.* Spatial heterogeneity of *Vibrio* spp. in sediments of Chinese marginal seas. **Applied and environmental microbiology**, v. 85, n. 10, p. e03064-18, 2019.

WHITAKER, W. Brian *et al.* Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4720-4729, 2010.

WUTHE, Hanns-Herbert; ALEKSIĆ, Stojanka; HEIN, Wolfgang. Contribution to some phenotypical characteristics of *Vibrio cincinnatiensis*. Studies in one strain of a diarrhoeic human patient and in two isolates from aborted bovine fetuses. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 279, n. 4, p. 458-465, 1993.

XU, Xiaojin *et al.* The complete genome sequence of *Vibrio aestuarianus* W-40 reveals virulence factor genes. **Microbiology open**, v. 7, n. 3, p. e00568, 2018.

## V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados apresentam diferentes graus de concentração de microrganismos usados em estudos de monitoramento ambiental com fins de balneabilidade de praias em diversos locais no Brasil;

Os nossos resultados apontam que é necessário considerar diferentes micro-habitats para os monitoramentos da qualidade ambiental em praias, pois tanto o sedimento quanto a água intersticial apresentaram concentrações de microrganismos quando relacionados com a água do mar;

Obtivemos níveis de contaminação por microrganismos acima dos limites preconizados pela legislação brasileira nos três microhabitats estudados para *E. coli* e *Enterococcus* spp. Os micro-habitats considerados neste estudo apresentaram diferença significativa quanto ao quantitativo de coliformes totais, *E. coli* e *Enterococcus* spp. em período chuvoso;

Embora não haja menção sobre *Vibrio* spp. na legislação atual para determinar a balneabilidade de praias, nossos resultados mostraram a presença de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* foram identificadas em um micro-habitat importante, comumente ignorado nas legislações de esfera nacional, estadual e municipal;

Relatamos a presença de patógenos emergentes das *Vibrio* spp. em distintos micro-habitats analisados, além de espécies que podem ocasionar danos econômicos e ecológicos;

As condições climáticas da região são propícias para o desenvolvimento e evolução genética dos microrganismos avaliados, em especial o micro-habitat sedimento, no qual houve mais ocorrência em ambos os períodos avaliados;

O método molecular utilizado no estudo foi eficiente para detecção de genes de virulência das espécies de maior importância global, servindo como um dos fatores chave para rápida identificação e investigação do ponto de origem da contaminação para que medidas rápidas de contenção de possíveis epicentros de surtos sejam tomadas.

O método do substrato cromogênico foi eficiente na detecção de microrganismos indicadores de contaminação fecal, contudo não precisam a espécie e não indicam genes de virulência, sendo indicados mais para avaliar a qualidade ambiental.

Ambos os métodos devem ser utilizados complementarmente em conjunto por apresentarem vantagens específicas;

Os boletins de balneabilidade ou avisos de qualidade da praia devem fazer referência ao uso da areia da praia, bem como da água intersticial para os usuários das praias a fim de prevenir possíveis surtos e custos com serviço médico;

Em trabalhos futuros, destacamos que mais coletas de amostras devam ser realizadas para que tenhamos uma maior dimensão dos fatores que influenciam a dinâmica e a ecologia desses microrganismos nos micro-habitats investigados. Marcadores genéticos também devem ser utilizados para rastrear a origem de todos os microrganismos em nossa pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, T. Jawahar; PALANIAPPAN, R. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 81-90, 2004.

ABREU, R. *et al.* Sediment characteristics and microbiological contamination of beach sand—A case-study in the archipelago of Madeira. **Science of the total environment**, v. 573, p. 627-638, 2016.

ACKERMAN, Drew; WEISBERG, Stephen B. Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches. **Journal of water and health**, v. 1, n. 2, p. 85-89, 2003.

AKRAM, Ayesha; STEVENS, Robert P.; KONECNY, Pamela. Photobacterium damsela and *Vibrio harveyi* hand infection from marine exposure. **Med J Aust**, v. 203, n. 5, p. 224-5, 2015.

ALM, E. W. *et al.* Potential for gulls to transport bacteria from human waste sites to beaches. **Science of the total environment**, v. 615, p. 123-130, 2018.

ALVES, L. S.; MACHADO, B. B. N.; OLIVEIRA, D. F. Balneabilidade das praias do litoral de Salvador-BA: investigação da interferência da precipitação nas densidades de *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 8, n. 4, 2020.

AKYALA, Ishaku A.; OLUFEMI, Ajumobi; ADEBOLA, Olayinka. Implication of coliforms as a major public health problem in Nigeria. *Journal of public health and epidemiology*, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2014.

AMARAL, L.A. Do; NADER-FILHO, A.; ROSSI-JUNIOR, O.D.; FERREIRA, F.L.A.; BARROS, L.S.S. Drinking water in rural farms as a risk factor to human health. **Revista Saúde Pública**, v.37, n.4, p. 510-514, 2003.

AMEL, Ben Kahla-Nakbi; AMINE, Besbes; AMINA, Bakhrouf. Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. **Microbiological Research**, v. 163, n. 3, p. 323-328, 2008.

ANDRADE, M. P *et al.* Avaliação da Balneabilidade das praias do Município de Santos/SP nos

últimos dez anos, Revista Ceciliana v. 4 n 1 p. 55-59, 2012.

ANDRADES, R. *et al.* Anthropogenic litter on Brazilian beaches: baseline, trends and recommendations for future approaches. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 151, p. 110842, fev. 2020.

ARETANO, R. *et al.* Coastal dynamics vs beach users attitudes and perceptions to enhance environmental conservation and management effectiveness. **Marine pollution bulletin**, v. 123, n. 1-2, p. 142-155, 2017.

ARNOLD, Benjamin F. *et al.* Acute illness among surfers after exposure to seawater in dry- and wet-weather conditions. **American Journal of Epidemiology**, v. 186, n. 7, p. 866-875, 2017.

ARAM, Simon Appah; SAALIDONG, Benjamin M.; OSEI LARTEY, Patrick. Comparative assessment of the relationship between coliform bacteria and water geochemistry in surface and ground water systems. *Plos one*, v. 16, n. 9, p. e0257715, 2021.

AZEVEDO, Andrea Christina Gomes de; FEITOSA, Fernando A. Nascimento; KOENING, Maria Luise. Distribuição espacial e temporal da biomassa fitoplanctônica e variáveis ambientais no Golfão Maranhense, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 870-877, 2008.

BAĞCI, Kemal *et al.* *Vibrio* hepatarius septicemia with subacute enteritis in common guitarfish, *Rhinobatos rhinobatos*. **Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences**, v. 8, n. 2, p. 211-217, 2023.

BAKER-AUSTIN, Craig *et al.* *Vibrio* spp. infections. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2018.

BAUCKE, A. S.; ZAMBÃO, P. Hüther; SERBENT, M. P. Microbiological monitoring for assessment of bathing in a beach at North of Santa Catarina. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 20, n. 1, p. 62-72, 2016.

BEASLEY, DeAnna E. *et al.* The evolution of stomach acidity and its relevance to the human microbiome. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0134116, 2015.

BEN SAID, Leila *et al.* Prevalence, antimicrobial resistance and genetic lineages of

Enterococcus spp. from vegetable food, soil and irrigation water in farm environments in Tunisia. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 5, p. 1627-1633, 2016.

BERG, C. H.; GUERCIO, M. J.; ULBRICHT, V. R. Indicadores de balneabilidade: a situação brasileira e as recomendações da world health organization. **International Journal of Knowledge Engineering and Management (IJKEM)**, v. 2, n. 3, p. 83-101, 2013.

BHANDARI, Murari *et al.* Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae*—a review. Infection, **Genetics and Evolution**, v. 89, p. 104726, 2021.

BISWAS, Quoelee *et al.* Genetic and mutational analysis of virulence traits and their modulation in an environmental toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strain, VCE232. **Microbiology**, v. 168, n. 2, p. 001135, 2022.

BÖER, Simone I. *et al.* Temporal and spatial distribution patterns of potentially pathogenic *Vibrio* spp. at recreational beaches of the German North Sea. **Microbial ecology**, v. 65, p. 1052-1067, 2013.

BONAMANO, S. *et al.* Modeling the dispersion of viable and total *Escherichia coli* cells in the artificial semi-enclosed bathing area of Santa Marinella (Latium, Italy). **Marine Pollution Bulletin**, v. 95, n. 1, p. 141-154, 2015.

BONILLA, Tonya D. *et al.* Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. **Marine pollution bulletin**, v. 54, n. 9, p. 1472-1482, 2007.

BORBOLLA-VAZQUEZ, Jessica *et al.* Total and faecal coliforms presence in cenotes of Cancun; Quintana Roo, Mexico. **BioRisk**, v. 15, p. 31-43, 2020.

BROECK, Davy Vanden; HORVATH, Caroline; DE WOLF, Marc JS. *Vibrio cholerae*: cholera toxin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 10, p. 1771-1775, 2007.

BRASIL. Resolução CONAMA. Resolução nº 274, de 29 de Novembro de 2000. Seção 1, páginas 70 – 71. Define critérios de balneabilidade das águas brasileiras. Publicada no **Diário Oficial da União**, nº 18 de 25 de Janeiro de 2001.

BRASIL. **Decreto Presidencial nº 5.300**, 7 de dezembro de 2004, Regulamenta a Lei Federal nº 7.661, de 16 de maio de 1988, que institui o Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro, dispõe de regras de uso e ocupação da zona costeira e estabelece critérios de gestão da orla marítima e dá outras providências.

BRASIL, Instituto Trata. **Ranking do Saneamento 2022**. 2022. Indicadores do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS). Disponível em: <https://tratabrasil.org.br/pt/estudos/ranking-do-saneamento/itb/ranking-do-saneamento-2022>. Acesso em: 28 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Doenças Transmissíveis. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/colera/situacao-epidemiologica/arquivos/nota-tecnica-no-68-2023-cgzv-dedt-svsa-ms/view>. Acesso em: 17 de jan. 2024

BYAPPANAHALLI, Muruleedhara N. *et al.* Enterococos no ambiente. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 4, pág. 685-706, 2012.

BYAPPANAHALLI, Muruleedhara N.; ROLL, Bruce M.; FUJIOKA, Roger S. Evidence for occurrence, persistence, and growth potential of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's soil environments. *Microbes and environments*, v. 27, n. 2, p. 164-170, 2012.

CAMPOS, J. S.; CUNHA, H. F. A. Análise comparativa de parâmetros de balneabilidade em Fazendinha, Macapá-AP. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 5, n. 4, p. 110-118, 2015.

CANELLAS, Anna LB *et al.* *Vibrio* species in an urban tropical estuary: Antimicrobial susceptibility, interaction with environmental parameters, and possible public health outcomes. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1007, 2021.

CANELLAS, Anna Luiza Bauer *et al.* O gênero *Vibrio*: conceitos atuais e novas perspectivas. **Revista da Biologia**, v. 22, n. 1, p. 14-31, 2022.

CARNEY, Richard L. *et al.* Urban beaches are environmental hotspots for antibiotic resistance following rainfall. **Water Research**, v. 167, p. 115081, 2019.

CATTOIR, Vincent. The multifaceted lifestyle of enterococci: genetic diversity, ecology and risks for public health. *Current Opinion in Microbiology*, v. 65, p. 73-80, 2022.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Relatório de Qualidade das Águas Salinas e Salobras no Estado de São Paulo 2014**. São Paulo: CETESB. (Série Relatórios). 2015.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 326p. 2011.

CHACÓN, Luz *et al.* Enterococci as a key parameter for water quality index: Purires River, Costa Rica. *Journal of Water and Health*, v. 16, n. 6, p. 1007-1017, 2018.

CHOI, K. W.; LEE, JOSEPH HW. Daily beach water quality forecast: 3D deterministic model vs statistical model. In: **22nd Congress of the International Association for Hydro-Environment Engineering and Research-Asia Pacific Division, IAHR-APD 2020: "Creating Resilience to Water-Related Challenges"**. 2020.

CHRISTENSEN, David G.; TEPAVČEVIĆ, Jovanka; VISICK, Karen L. Genetic manipulation of *Vibrio fischeri*. *Current protocols in microbiology*, v. 59, n. 1, p. e115, 2020.

CLOUTIER, Danielle D.; MCLELLAN, Sandra L. Distribution and differential survival of traditional and alternative indicators of fecal pollution at freshwater beaches. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 83, n. 4, p. e02881-16, 2017.

COE, Heloisa H. G *et al.* Peculiaridades ecológicas da região de Cabo Frio. *Revista Tamoios*, v. 3, n. 2, 2007.

COSTA, Cibele Rodrigues; COSTA, Monica Ferreira da. Revisão de metodologias do monitoramento microbiológico da qualidade da água em praias recreativas. *Revista Brasileira de Meio Ambiente*, v. 8, n. 3, 2020.

DAVINO, Aline Mendonça Cavalcante; MELO, Milena Bandeira de; CAFFARO FILHO, Roberto Augusto. Assessing the sources of high fecal coliform levels at an urban tropical beach. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, p. 1019-1026, 2015.



DE PAOLA, Angelo *et al.* Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and oysters. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 8, p. 2299-2302, 1990.

DE TENDER, Caroline A. *et al.* Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 16, p. 9629-9638, 2015.

DEVANE, Megan L. *et al.* Fecal indicator bacteria from environmental sources; strategies for identification to improve water quality monitoring. **Water Research**, v. 185, p. 116204, 2020.

DOMINGUEZ B. E.S. *et al.* Enterococci presence in interstitial water in intertidal areas of sandy beaches from Veracruz-Boca del Rio, Gulf of México. 2015.

DUFOUR, Al. A short history of methods used to measure bathing beach water quality. **Journal of microbiological methods**, v. 181, p. 106134, 2021.

ECKNER, Karl F. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 8, p. 3079-3083, 1998.

ESCOBAR, Luis E. *et al.* A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions. **Acta Tropica**, v. 149, p. 202-211, 2015.

FERREIRA, L. T. *et al.* Qualidade microbiológica da água da praia do Araçagi-São Luís-MA, Brasil. **Revista Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás-RRS-FESGO**, v. 4, n. 01, p. 39-49, 2021.

FENG, Zhixuan *et al.* Modeling sediment-related enterococci loading, transport, and inactivation at an embayed nonpoint source beach. **Water Resources Research**, v. 49, n. 2, p. 693-712, 2013.

FOPPEN, J. W. A.; SCHIJVEN, J. F. Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions. **Water Research**, v. 40, n. 3, p. 401-426, 2006.

GANDRA, Janine Aparecida Correia Durães *et al.* Análise comparativa entre os métodos microbiológicos membrana filtrante e espalhamento na recuperação de escherichia coli K12 em

solução salina propositalmente contaminada. **Revista Unimontes Científica**, v. 19, n. 1, p. 14-24, 2017.

GAO, Wei; HOWDEN, Benjamin P.; STINEAR, Timothy P. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. **Current opinion in microbiology**, v. 41, p. 76-82, 2018.

GARCIA, Céline *et al.* *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov., pathogenic to the edible cockles *Cerastoderma edule* in France, and establishment of *Vibrio aestuarianus* subsp. *aestuarianus* subsp. nov. and *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 004654, 2021.

GARGANO, J. W. *et al.* Mortality from selected diseases that can be transmitted by water—United States, 2003–2009. **Journal of water and health**, v. 15, n. 3, p. 438-450, 2017.

GOMES, Tânia AT *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 3-30, 2016.

GOMES FILHO, Gunnar Braga; RÊGO, Joherbert Carlos Lima; MACIEL, Rafael Ferreira. Georreferenciamento da microbacia do Rio Pimenta em São Luís - MA. Avaliação de Impactos Ambientais em Bacias de Drenagem Urbana. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 4, p. 85-100, 2021.

GRAHAM, Ken; STACK, Helena; REA, Rosemary. Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications—a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 22, p. 3836-3861, 2020.

GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. Polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2019, n. 6, p. pdb. top095109, 2019.

GUILLOD, Caroline; GHITTI, Francesca; MAINETTI, Carlo. *Vibrio parahaemolyticus* induced cellulitis and septic shock after a sea beach holiday in a patient with leg ulcers. **Case reports in dermatology**, v. 11, n. 1, p. 94-100, 2019.

GUNDA, Naga Siva Kumar *et al.* Mobile Water Kit (MWK): a smartphone compatible low-cost water monitoring system for rapid detection of total coliform and *E. coli*. **Analytical**

**Methods**, v. 6, n. 16, p. 6236-6246, 2014.

GUNDA, Naga Siva Kumar; MITRA, Sushanta K. Rapid water quality monitoring for microbial contamination. **The Electrochemical Society Interface**, v. 25, n. 4, p. 73, 2016.

HAGLER, A.N. *et al.* Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. **The Science of the total environment**, Amsterdam, v. 58, n.1-2, p.151-160, 1986.

HALLIDAY, Elizabeth; RALSTON, David K.; GAST, Rebecca J. Contribution of sand-associated enterococci to dry weather water quality. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 1, p. 451-458, 2015.

HARTZ, A. *et al.* Survival potential of *Escherichia coli* and enterococci in subtropical beach sand: implications for water quality managers. **Journal of environmental quality**, v. 37, n. 3, p. 898-905, 2008.

HEDGES, John I.; KEIL, Richard G. Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis. **Marine chemistry**, v. 49, n. 2-3, p. 81-115, 1995.

HERNÁNDEZ-ROBLES, Marcos F. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance in environmental strains of *Vibrio alginolyticus*. **Int. Microbiol**, v. 19, n. 4, p. 191-198, 2016.

HUANG, Ziwei *et al.* Pathogenicity and antibiotic resistance analysis of *Vibrio* species found in coastal water at mainly beach of Shenzhen, China. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, p. 980593, 2022.

HUGHES, B. *et al.* Cross-comparison of human wastewater-associated molecular markers in relation to fecal indicator bacteria and enteric viruses in recreational beach waters. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 8, p. e00028-17, 2017.

HUQ, Anwar *et al.* Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4645-4654, 2005.

IGBINOSA, Etinosa O.; OKOH, Anthony I. *Vibrio fluvialis*: an unusual enteric pathogen of increasing public health concern. **International journal of environmental research and**

**public health**, v. 7, n. 10, p. 3628-3643, 2010.

INCERA, M. *et al.* Temporal and spatial variability of sedimentary organic matter in sandy beaches on the northwest coast of the Iberian Peninsula. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 58, p. 55-61, 2003.

ISHII, Satoshi *et al.* Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of *Escherichia coli* in Lake Superior. *Environmental science & technology*, v. 41, n. 7, p. 2203-2209, 2007.

ISLAM, M. Sirajul *et al.* Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae*. *Vaccine*, v. 38, p. A52-A62, 2020.

JAFARI, F. *et al.* Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals. *Journal of infection*, v. 58, n. 1, p. 21-27, 2009.

JIANG, Chunqi *et al.* *Vibrio* Clade 3.0: new Vibrionaceae evolutionary units using genome-based approach. *Current microbiology*, v. 79, p. 1-15, 2022.

KANG, Chang-Ho *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Vibrio alginolyticus* isolated from oyster in Korea. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, p. 21106-21112, 2016.

KARBASDEHI, Vahid Noroozi *et al.* Indicator bacteria community in seawater and coastal sediment: the Persian Gulf as a case. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v. 15, p. 1-15, 2017.

KEMPER, Merel A. *et al.* A membrane filtration method for the enumeration of *Escherichia coli* in bathing water and other waters with high levels of background bacteria. *Journal of Water and Health*, v. 21, n. 8, p. 995-1003, 2023.

KIM, Lan Hee; CHONG, Tzyy Haur. Physiological responses of salinity-stressed *Vibrio* sp. and the effect on the biofilm formation on a nanofiltration membrane. *Environmental Science & Technology*, v. 51, n. 3, p. 1249-1258, 2017.

KINZELMAN, J. *et al.* Non-point source pollution: determination of replication versus

persistence of *Escherichia coli* in surface water and sediments with correlation of levels to readily measurable environmental parameters. **Journal of water and health**, v. 2, n. 2, p. 103-114, 2004.

KIRSTEIN, Inga V. *et al.* Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. **Marine environmental research**, v. 120, p. 1-8, 2016.

KREPSKY, Natascha *et al.* Dry sand quality: the case study of a touristic beach from Rio de Janeiro, Brazil. *Fronteiras*, v. 9, p. 32-52, 2020.

KUNITOMO, Kotaro *et al.* Skin and soft tissue infections and bacteremia caused by *Vibrio cincinnatiensis*. **IDCases**, v. 29, p. e01564, 2022.

LEBRETON, François *et al.* Tracing the enterococci from Paleozoic origins to the hospital. **Cell**, v. 169, n. 5, p. 849-861. e13, 2017.

LESCRECK, Marina Camargo *et al.* Análise da qualidade sanitária da areia das praias de Santos, litoral do estado de São Paulo. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, p. 777-782, 2016.

LESSA, Rosângela *et al.* **Biodiversidade de elasmobrânquios do Brasil**. MMA, 1999. Programa Nacional da Diversidade Biológica (PRONABIO), Ministério do Meio Ambiente (MMA), Recife.

LI, Lingzhi *et al.* Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. **Microbiological Research**, v. 222, p. 43-51, 2019.

LÓPEZ-CERVANTES, Gabriela *et al.* Temperature and salinity modulate virulence and PirA gene expression of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND. **Aquaculture International**, v. 29, n. 2, p. 743-756, 2021.

LUGO, J. L.; LUGO, E. R.; PUENTE, M. de la. A systematic review of microorganisms as indicators of recreational water quality in natural and drinking water systems. **Journal of Water and Health**, v. 19, n. 1, p. 20-28, 2021.

MAHEUX, Andrée F. *et al.* Comparison of four  $\beta$ -glucuronidase and  $\beta$ -galactosidase-based commercial culture methods used to detect *Escherichia coli* and total coliforms in

water. **Journal of water and health**, v. 13, n. 2, p. 340-352, 2015.

MALAVÉ-LLAMAS, Karlo *et al.* Evaluation of Monitored and Unmonitored Bacteria in Recreational Beaches in Puerto Rico: Underlining the Environmental Factors that Affect Beach Quality. **EC Microbiology**, v. 17, p. 86-95, 2021.

MENG, Jianghong *et al.* Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Food microbiology: Fundamentals and frontiers**, p. 287-309, 2012.

MIQUELANTE, A.F.; KOLM, H.E. Indicadores microbiológicos de poluição fecal na desembocadura da gamboa olho d'água, Paraná: subsídio para o monitoramento da balneabilidade no Brasil. **Revista Publicatio UEPG: ciências biológicas e da saúde**, v.17, n.1, p. 21-35, 2011.

MING, Hongxia *et al.* Enterococci may not present the pollution of most enteric pathogenic bacteria in recreational seawaters of Xinghai bathing Beach, China. **Ecological Indicators**, v. 110, p. 105938, 2020.

MISHRA, Meerambika *et al.* Multi-drug resistant coliform: water sanitary standards and health hazards. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 311, 2018.

MCGINNIS, Shannon *et al.* Human Bacteroides and total coliforms as indicators of recent combined sewer overflows and rain events in urban creeks. **Science of the total environment**, v. 630, p. 967-976, 2018.

MITSCH, William J.; GOSSELINK, James G. **Wetlands**. John wiley & sons, 2015.

MONTÁNCHEZ, Itxaso; KABERDIN, Vladimir R. *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. **Marine environmental research**, v. 154, p. 104850, 2020.

NAFSIN, N. *et al.* *Escherichia coli* and *enterococci* bacteria in Lake Michigan Beach sand. **Environmental Engineering Science**, v. 39, n. 1, p. 3-14, 2022.

NG, Charmaine *et al.* Microbial water quality and the detection of multidrug resistant *E. coli* and antibiotic resistance genes in aquaculture sites of Singapore. **Marine pollution bulletin**, v. 135, p. 475-480, 2018.

NARRACCI, M.; ACQUAVIVA, M. I.; CAVALLO, R. A. Mar Piccolo of Taranto: *Vibrio* biodiversity in ecotoxicology approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 3, p. 2378-2385, 2014.

OLIVER, David M. *et al.* Opportunities and limitations of molecular methods for quantifying microbial compliance parameters in EU bathing waters. **Environment International**, v. 64, p. 124-128, 2014.

OLIVER, James D. The biology of *Vibrio vulnificus*. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec. ve-0001-2014, 2015.

OLIVA, Marcelo Santos de *et al.* Detection of virulence and antibiotic resistance genes in environmental strains of *Vibrio* spp. from mussels along the coast of Rio de Janeiro State, Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 24, p. 906-913, 2016.

ORRUÑO, M.; KABERDIN, V. R.; ARANA, I. Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp.: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1-7, 2017.

OSUNLA, Charles A.; OKOH, Anthony I. *Vibrio* pathogens: A public health concern in rural water resources in sub-Saharan Africa. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 10, p. 1188, 2017.

PALMGREN, Helena *et al.* Enteropathogenic bacteria in migrating birds arriving in Sweden. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 29, n. 6, p. 565-568, 1997.

PANDA, Uma Sankar *et al.* Bathing water quality forecast for Chennai coastal waters. **Journal of Coastal Research**, v. 89, n. SI, p. 111-117, 2020.

PARIZADEH, Leila *et al.* Ecologically realistic model of infection for exploring the host damage caused by *Vibrio aestuarianus*. **Environmental microbiology**, v. 20, n. 12, p. 4343-4355, 2018.

PEPERZAK, Louis; VAN BLEIJSWIJK, Judith. False-positive enterococci counts in seawater with the IDEXX Enterolert-E most probable number technique caused by *Bacillus*

licheniformis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 9, p. 10654-10660, 2021.

PERCIVAL, Steven L.; WILLIAMS, David W. *Vibrio*. In: Microbiology of waterborne diseases. **Academic Press**, 2014. p. 237-248.

PEREIRA, L. C. C. *et al.* Maranhão beach systems, including the human impact on São Luís Beaches. In: **Brazilian Beach Systems**. Springer, Cham, 2016. p. 125-152.

PHILLIPS, M. C. *et al.* Relationships between sand and water quality at recreational beaches. **Water research**, v. 45, n. 20, p. 6763-6769, 2011.

PLÁGARO, Ander Hernández; PEARMAN, Peter B.; KABERDIN, Vladimir R. Defining the transcription landscape of the Gram-negative marine bacterium *Vibrio harveyi*. **Genomics**, v. 111, n. 6, p. 1547-1556, 2019.

POIREL, Laurent *et al.* Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 6.4. 14, 2018.

RAMOS, Sónia *et al.* Enterococci, from harmless bacteria to a pathogen. *Microorganisms*, v. 8, n. 8, p. 1118, 2020.

RAMOUTAR, Sheldon. The use of Colilert-18, Colilert and Enterolert for the detection of faecal coliform, *Escherichia coli* and Enterococci in tropical marine waters, Trinidad and Tobago. **Regional Studies in Marine Science**, v. 40, p. 101490, 2020.

RASZL, S. M. *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1201-1222, 2016.

REIS, N. S. S.; SANTOS, P. V. C. J. Caracterização das condições de manutenção e dos usos da zona costeira do Município de São Luís (MA): A educação Ambiental como alternativa de amenização de impactos. **Revista Brasileira De Educação Ambiental (RevBEA)**, v. 15, n. 5, p. 333-344, 2020.

RÊGO, J. C. L.; SOARES-GOMES, A.; DA SILVA, F. S. Loss of vegetation cover in a tropical island of the Amazon coastal zone (Maranhão Island, Brazil). **Land Use Policy**, v. 71, p. 593-



601, 2018.

RODRIGUES, Vanessa FV *et al.* Detection and risk assessment of diarrheagenic *E. coli* in recreational beaches of Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 109, n. 1, p. 163-170, 2016.

ROSA, F. C. *et al.* Identificação de fungos patogênicos em areia da praia do Calhau, São Luís – MA, litoral nordeste do Brasil. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 12, n. 1, p. 336-346, 2021.

RUSSELL, Todd L. *et al.* A coupled modeling and molecular biology approach to microbial source tracking at Cowell Beach, Santa Cruz, CA, United States. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 18, p. 10231-10239, 2013.

SAMPAIO, Ana *et al.* *Vibrio* spp.: Life strategies, ecology, and risks in a changing environment. **Diversity**, v. 14, n. 2, p. 97, 2022.

SANTOS, Eidy de O *et al.* Genomic and proteomic analyses of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* reveal a diverse virulence repertoire. **The ISME journal**, v. 5, n. 9, p. 1471-1483, 2011.

SELLECK, Elizabeth M.; VAN TYNE, Daria; GILMORE, Michael S. Pathogenicity of enterococci. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 4, 2019.

SHEIKH, H. I. *et al.* Temperature upshift mostly but not always enhances the growth of *Vibrio* species: A systematic review. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, p. 959830, 2022.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 352-359, 2006.

SILVA, V. C. Da *et al.* Contaminação por *Enterococcus* da água das praias do município de São Luís, Estado do Maranhão. **Acta Scientiarum**. Technology, v. 30, n. 2, p. 187-192, 2008.

SILVA, A. C. da *et al.* Estudo hidrodinâmico, climático e bacteriológico associado às fontes pontuais de poluição ao longo do litoral de Fortaleza. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 14, n. 2, p. 83-90, 2009.

SILVA, J. C. *et al.* Condições de balneabilidade da Praia do Jacaré, em Cabedelo, PB, a partir da densidade de coliformes termotolerantes como bioindicador de qualidade da água. **Acta Scientia**, v. 1, n. 1, 2019.

SILVA, Neusely da *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 6ª ed. São Paulo : Blucher, 2021. 561p.

SLIFKA, KM Jacobs; NEWTON, A. E.; MAHON, B. E. *Vibrio alginolyticus* infections in the USA, 1988–2012. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 7, p. 1491-1499, 2017.

SOLAIMAN, Sultana *et al.* Longitudinal assessment of the dynamics of *Escherichia coli*, total coliforms, *Enterococcus* spp., and *Aeromonas* spp. in alternative irrigation water sources: a CONSERVE Study. *Applied and environmental microbiology*, v. 86, n. 20, p. e00342-20, 2020.

SOLTAN, Dalal Mohammad Mahdi. Diarrhea caused by enteropathogenic bacteria in children. **Arquivos de medicina iraniana**, n.4, v.4, 201-203 2001.

SOTO, William *et al.* Salinity and temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse ecological niches. **Microbial ecology**, v. 57, p. 140-150, 2009.

SOUZA, J. L. de; SILVA, I. R. Avaliação da qualidade ambiental das praias da ilha de Itaparica, Baía de Todos os Santos, Bahia. **Sociedade & Natureza**, v. 27, n. 3, p. 469-483, 2015.

SHIBATA, Tomoyuki *et al.* Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. **Water research**, v. 38, n. 13, p. 3119-3131, 2004.

SMITH, Hannah G. *et al.* Presence and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. and *Salmonella* sp. in 12 species of Australian shorebirds and terns. *Zoonoses and Public Health*, v. 69, n. 6, p. 615-624, 2022

SOUZA FILHO, Pedro Walfir Martins. Costa de manguezais de macromaré da Amazônia: cenários morfológicos, mapeamento e quantificação de áreas usando dados de sensores remotos. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 23, p. 427-435, 2005.

STEELE, Joshua A. *et al.* Quantification of pathogens and markers of fecal contamination during storm events along popular surfing beaches in San Diego, California. **Water research**,

v. 136, p. 137-149, 2018.

SUZUKI, Yoshihiro *et al.* Plant debris are hotbeds for pathogenic bacteria on recreational sandy beaches. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 11496, 2021.

TAYLOR, Marsha *et al.* Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* associated with consumption of raw oysters in Canada, 2015. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 9, p. 554-559, 2018.

TAMAI, Soichiro *et al.* Growth and Decay of Fecal Indicator Bacteria and Changes in the Coliform Composition on the Top Surface Sand of Coastal Beaches during the Rainy Season. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1074, 2023.

TANAKA, Mami *et al.* Genomic characterization of closely related species in the Rumoiensis clade infers ecogenomic signatures to non-marine environments. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 8, p. 3205-3217, 2020.

TEKLEHAIMANOT, G. Z. *et al.* Prevalence of enteropathogenic bacteria in treated effluents and receiving water bodies and their potential health risks. **Science of the Total Environment**, v. 518, p. 441-449, 2015.

TOUBIANA, Mylène *et al.* Monitoring urban beach quality on a summer day: Determination of the origin of fecal indicator bacteria and antimicrobial resistance at Prophète Beach, Marseille (France). **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 710346, 2021.

VALÉRIO, Elisabete *et al.* Microbial source tracking as a method of determination of beach sand contamination. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 13, p. 7934, 2022.

VEZZULLI, Luigi *et al.* Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy). **Microbial ecology**, v. 58, p. 808-818, 2009.

VIEIRA, Regine H. S. F *et al.* Kanagawa-negative, tdh-and trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. **Current microbiology**, v. 63, p. 126-130, 2011.

VILA, J. *et al.* *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **FEMS microbiology reviews**,

v. 40, n. 4, p. 437-463, 2016.

VOGEL, Laura J. *et al.* Evaluation of methods to sample fecal indicator bacteria in foreshore sand and pore water at freshwater beaches. **Water research**, v. 121, p. 204-212, 2017.

XU, Xiaojin *et al.* The complete genome sequence of *Vibrio aestuarianus* W-40 reveals virulence factor genes. **Microbiology open**, v. 7, n. 3, p. e00568, 2018.

XU, Yi-Gang *et al.* Simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay. **Food Control**, v. 71, p. 64-70, 2017.

WANG, Rongzhi *et al.* The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 144, 2015.

WANG, Xiaolei *et al.* Spatial heterogeneity of *Vibrio* spp. in sediments of Chinese marginal seas. **Applied and environmental microbiology**, v. 85, n. 10, p. e03064-18, 2019.

WHITAKER, W. Brian *et al.* Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4720-4729, 2010.

WHITMAN, Richard L. *et al.* Microbes in beach sands: integrating environment, ecology and public health. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 13, p. 329-368, 2014.

WUTHE, Hanns-Herbert; ALEKSIĆ, Stojanka; HEIN, Wolfgang. Contribution to some phenotypical characteristics of *Vibrio cincinnatiensis*. Studies in one strain of a diarrhoeic human patient and in two isolates from aborted bovine fetuses. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 279, n. 4, p. 458-465, 1993.

ZAMPIERI, Bruna Del Busso *et al.* Comparison of bacterial densities and resistance in different beach compartments: should water be our main concern. **O Mundo da Saúde**, v. 40, p. 461-482, 2017.

ZHANG, Weiwei *et al.* Effects of rainfall on microbial water quality on Qingdao No. 1 Bathing Beach, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 66, n. 1-2, p. 185-190, 2013.

ZHANG, Ya *et al.* Phenotypic and phylogenetic identification of coliform bacteria obtained using 12 coliform methods approved by the US Environmental Protection Agency. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 17, p. 6012-6023, 2015.

## APÊNDICES

## Modelo de Quadro-Sumário das Normas da Revista

<b>Artigo 1:</b> Potential microhabitats for contamination by fecal bacteria on an amazonian macrotidal beach	
<b>Revista</b>	Revista HOLOS
<b>ISSN</b>	1807-1600
<b>DOI</b>	10.15628
<b>Fator de impacto</b>	0,1
<b>Meio de divulgação</b>	Online
<b>Periodicidade</b>	Trimestral
<b>Site</b>	<a href="https://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/">https://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/</a>
<b>Qualis CAPES 2014</b>	A1

<b>Artigo 2:</b> Fatores ambientais que influenciam a distribuição de <i>Vibrio</i> spp. em micro-habitats de uma praia amazônica	
<b>Revista</b>	Environmental Microbiology
<b>ISSN</b>	1462-2920
<b>DOI</b>	10.15628
<b>Fator de impacto</b>	5,47
<b>Meio de divulgação</b>	Online
<b>Periodicidade</b>	Mensal
<b>Site</b>	<a href="https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/journal/14622920">https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/journal/14622920</a>
<b>Qualis CAPES 2014</b>	A1