



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL

Amanda Cechetto Machado Pacheco

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS PARA  
DETERMINAÇÃO DE BALNEABILIDADE**

Florianópolis

2024

Amanda Cechetto Machado Pacheco

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS PARA  
DETERMINAÇÃO DE BALNEABILIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Maria Elisa Magri, Dr<sup>a</sup>

Florianópolis

2024

Pacheco, Amanda Cechetto Machado

Avaliação de indicadores microbiológicos alternativos para determinação de balneabilidade / Amanda Cechetto Machado Pacheco ; orientadora, Maria Elisa Magri, 2024.

64 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Engenharia Sanitária e Ambiental. 2. Engenharia Sanitária e Ambiental. 3. Balneabilidade. 4. Indicadores fecais. 5. Bacteriófagos. I. Magri, Maria Elisa. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental. III. Título.

Amanda Cechetto Machado Pacheco

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS PARA  
DETERMINAÇÃO DE BALNEABILIDADE**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental.

Florianópolis, 2 de julho de 2024.



Prof. Bruno Segalla Pizzolatti, Dr.  
Coordenação do Curso

**Banca examinadora**



Prof.ª Maria Elisa Magri, Dr.ª  
Orientadora



M.Sc. Amanda Silva Nunes  
Universidade Federal de Santa Catarina



M. Sc. Juscelia Padilha  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, irmão, namorado e a todos que participaram e incentivaram essa longa jornada de minha formação.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que são o motivo de eu conseguir começar e terminar a graduação, obrigada por todos os esforços que não foram medidos para que eu tivesse uma boa formação desde o início, pelo amor incondicional, pela confiança em mim, pelo colo e o apoio. Vocês são tudo para mim, essa conquista é de vocês.

Ao Mário, que tenho a sorte de chamar de irmão, parceiro que muito me aconselhou e partilhou as angústias e alegrias nessa caminhada.

Ao meu namorado Vicente pelo carinho, incentivo, companheirismo, paciência e por sonhar (e realizar!) junto comigo. Sou muito grata e feliz por tê-lo em minha vida.

Um agradecimento especial a minha avó materna Edith, que não está mais aqui para comemarmos juntas. Obrigada por rezar e torcer por mim a cada prova e apresentação, obrigada por cada ligação carinhosa, por tudo. Sinto muito a sua falta.

Agradeço imensamente à Prof. Dr.<sup>a</sup> Maria Elisa Magri, minha querida orientadora que despertou meu interesse em suas aulas, deu-me a oportunidade e acreditou em mim.

Agradeço ao RReSSa e a todos os seus integrantes, que fizeram parte da minha formação também como pessoa. Vocês foram cruciais na minha jornada.

Agradeço em especial à M. Sc. Amanda Nunes e à M. Sc. Juscelia Padilha por fazerem parte da minha banca e dos meus dias. A paciência, parceria, cuidado e ensinamentos fizeram esse trabalho ser possível, obrigada de coração.

Por fim gostaria de agradecer a todos que fizeram parte da minha caminhada na graduação, aos professores que me incentivaram e aos meus amigos queridos.

## RESUMO

Com o crescimento populacional, tem-se também um maior consumo de água e maior geração de águas residuárias. Conseqüentemente, as zonas costeiras, que quase sempre serão corpo receptor dessas águas, estarão cada vez mais contaminadas e expondo banhistas a doenças, como gastroenterites e dermatites. Atualmente, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e Enterococos são os indicadores microbiológicos de balneabilidade utilizados. Sua capacidade de detectar a poluição fecal e patógenos em água do mar é limitada devido à falta de uma maior correlação com vírus e protozoários, assim como sua baixa resistência à temperatura, pH e salinidade. Por isso há necessidade de aprimorar os critérios de balneabilidade utilizados, com foco na inadequação dos indicadores microbiológicos tradicionais de balneabilidade em ambientes costeiros, e é interessante explorar a eficácia de indicadores microbiológicos alternativos virais, como bacteriófagos, a fim de aprimorar a segurança da saúde pública. Foram inoculadas duas bactérias em água do mar e água destilada e dois bacteriófagos da mesma forma em 12 beakers de 100 ml. Por meio de análises de detecção e enumeração de bactérias e bacteriófagos, através do cultivo em placas de ágar e da técnica de duplo ágar de Adams, respectivamente, foram determinados os valores de concentração dos microrganismos durante 16 dias em um ensaio de decaimento, além de análises de amostras brutas coletadas nas praias da Beira Mar e da Praia do Meio em Florianópolis, Santa Catarina. Os resultados obtidos no ensaio de decaimento foram satisfatórios, com uma taxa de decaimento (k) de 0,77/d para *Escherichia coli*; de 0,67/d para *Enterococcus faecalis*; de 0,42/d para os colifagos F-específicos (MS2) e de 0,40/d para os colifagos somáticos ( $\phi$ x-174). Para as comparações com as análises do IMA foram encontradas divergências importantes, como a não detecção de Enterococos na amostra que foi determinada imprópria a partir dos valores de *Escherichia coli*. Dois resultados que sugerem o uso dos colifagos somados aos indicadores tradicionais sendo a melhor opção para detecção da ampla gama de microrganismos de interesse sanitário.

Palavras-chave: Indicadores; Balneabilidade; Contaminação fecal; Vírus entéricos; Bacteriófagos.

## ABSTRACT

With population growth, there is an increase in water consumption and wastewater generation. Consequently, coastal zones, which are often receiving bodies for them, are becoming increasingly contaminated, exposing bathers to diseases such as gastroenteritis and dermatitis. Currently, thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and Enterococci are the fecal indicator bacteria (FIB) for determination of bathing water quality. Their ability to detect fecal pollution and pathogens in marine environments is limited due to lack of strong correlation with pathogens such as viruses and protozoa, as well as their low resistance to temperature, pH, and salinity. Then, it is essential to improve the criteria for water quality assessment, focusing on the inadequacy of FIB in coastal environments and exploring the effectiveness of alternative viral indicators, such as bacteriophages, to enhance public health safety. Two bacteria were inoculated into seawater and distilled water, and two bacteriophages were similarly inoculated, resulting in twelve 100ml Beckers. Through detection and enumeration analyses of bacteria and bacteriophages using agar plate culturing and Adams' double agar technique, respectively, the concentrations of microorganisms were determined over a 16 days of decay assay, besides raw sample analyses collected from *Beira Mar* and *Praia do Meio* beaches in *Florianópolis, Santa Catarina*. The results obtained from the assay were satisfactory, with a decay rate (k) of 0,77/d for *Escherichia coli*, 0,67/d for *Enterococcus faecalis*, 0,42/d for F-specific coliphages (MS2), and 0,40/d for somatic coliphages (øx-174). Comparing results with IMA analyses, important discrepancies were found, such as the non-detection of Enterococci in samples that were deemed unsafe based on *Escherichia coli* values. All the results suggest that using coliphages in addition to traditional indicators may be the best option for detecting a wide range of microorganisms of sanitary interest.

Keywords: Indicators; Bathing; Fecal contamination; Enteric Viruses; Bacteriophages.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Categorização de águas para banho .....	19
Figura 2 - Mapa de localização .....	28
Figura 3 – Imagens da Beira Mar Norte (a esquerda) e EPIs (a direita). .....	29
Figura 4 – Meios MSB (à esquerda) e TYGB (à direita). .....	30
Figura 5 – Ensaio de decaimento.....	32
Figura 6 – Mapa de Calor da Correlação de Pearson entre parâmetros .....	38
Figura 7 – Mapas de calor dos valores-p em duas escalas .....	39
Figura 8 – <i>Boxplot</i> das concentrações de <i>E. coli</i> e <i>E. faecalis</i> .....	40
Figura 9 - <i>Boxplot</i> das concentrações de Fagos MS2 e Fagos øx.....	41
Figura 10 – Gráficos das concentrações médias de cada microrganismo e seu controle nos dias de análise .....	42
Figura 11 – Gráficos das concentrações médias dos microrganismos nos dias de análise .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fórmula de 100 ml de meio TYGB .....	34
Tabela 2 – Fórmula de 100 ml de meio MSB.....	34
Tabela 3 – Valores de parâmetros obtidos por sonda.....	36
Tabela 4 – Reações características de sistemas biológicos e valores de ORP .....	37
Tabela 5 – Cálculo da taxa de decaimento para cada microrganismo.....	42
Tabela 6 – Cálculo da taxa de decaimento corrigida para cada microrganismo. ....	44
Tabela 7 – Médias das concentrações das bactérias, fagos e seus controles ao longo dos dias em log <sub>10</sub> UFC/ml (ou log <sub>10</sub> UFP/ml para os vírus) .....	45
Tabela 8 – Valores-P do teste de <i>Tukey</i> .....	45
Tabela 9 – Conversão dos limites para <i>Escherichia coli</i> e Enterococos determinados pela Resolução CONAMA N° 274/2000 .....	47
Tabela 10 – Concentrações obtidas nas análises das amostras dos Pontos 05 e 94. ....	47
Tabela 11 – Valores obtidos das análises do IMA para meses de outono de 2021-2024.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABNT** Associação Brasileira de Normas Técnicas
- IPCC** Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
- UNESCO** Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
- IMA** Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina
- IBGE** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ONU** Organização das Nações Unidas
- CONAMA** Conselho Nacional do Meio Ambiente
- CONSEMA** Conselho Estadual de Meio Ambiente
- INMETRO** Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial
- APHA** American Public Health Association (Associação Americana de Saúde Pública)
- AWWA** American Water Works Association (Associação Americana de Abastecimento e Tratamento de Água)
- WPCE** Water Pollution Control Engineering (Conferência de Engenharia de Controle de Poluição das Águas)
- WHO** World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)
- EPA** United States Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
- FUNASA** Fundação Nacional de Saúde
- TYGB** *Tryptone Yeast extract-Glucose Broth* – Caldo Extrato de levedura Triptona Glicose
- TYGA** *Tryptone Yeast extract-Glucose Agar* - Ágar Extrato de levedura Triptona Glicose
- TYGA SS** *Tryptone Yeast extract-Glucose Agar* – Meio Semissólido Ágar Extrato de levedura Triptona Glicose
- MSB** *Modified Scholten's Broth* – Caldo Scholten's Modificado
- MSA** *Modified Scholten's Agar* – Ágar Scholten's Modificado
- MSA SS** *Modified Scholten's Agar* – Meio Semissólido Ágar Scholten's Modificado
- TSB** *Trypticase Soy Broth* – Caldo Tripticaseína de Soja
- OD** Oxigênio Dissolvido
- ORP** Potencial de Oxidação/Redução
- SDT** Sólidos Dissolvidos Totais
- ppm** Partes por milhão
- UFC** Unidade Formadora de Colônias

**UFP** Unidade Formadora de Placas

**NMP** Número Mais Provável

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
3.1	LEGISLAÇÃO .....	18
3.2	INDICADORES MICROBIOLÓGICOS .....	20
<b>3.2.1</b>	<b>Indicadores atuais de balneabilidade.....</b>	<b>22</b>
3.2.1.1	<i>Coliformes totais.....</i>	22
3.2.1.2	<i>Coliformes termotolerantes .....</i>	22
3.2.1.3	<i>Escherichia coli .....</i>	22
3.2.1.4	<i>Enterococos .....</i>	23
<b>3.2.2</b>	<b>Indicadores alternativos de balneabilidade.....</b>	<b>23</b>
3.2.2.1	<i>Bacteriófagos.....</i>	23
<b>3.2.3</b>	<b>Ensaio de Decaimento.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL E PONTOS DE ESTUDO.....	27
4.2	CULTURA PARA INÓCULO.....	29
4.3	ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS .....	31
4.4	ENUMERAÇÃO DE VÍRUS.....	32
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
5.1	ANÁLISE DE PARÂMETROS .....	36
5.2	ENSAIO DE DECAIMENTO .....	40
5.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	44
5.4	COMPARAÇÃO COM DADOS DO IMA.....	46
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A projeção da Organização das Nações Unidas para o crescimento da população mundial no ano de 2030 é de 8,5 bilhões de habitantes, frente a marca de aproximadamente 7,8 bilhões em 2020 (ONU, 2022). Com o avanço da tecnologia, da ciência e a melhoria na qualidade de vida, o homem foi capaz de viver por mais tempo. Consequentemente, pôde utilizar maior quantidade de recursos naturais e gerar impactos cada vez maiores para o ambiente. O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas confirma que aumento da temperatura da superfície global e as mudanças climáticas extremas, cada vez mais recorrentes, foram grandemente influenciadas pelas atividades antrópicas (IPCC, 2019). Com o recorde populacional em 2024, a demanda de água é ainda maior e também a geração de águas residuárias.

Segundo o IPCC, em 2010 1,9 bilhão de pessoas, ou 28% da população mundial, residiam a uma distância de até 100 km das zonas costeiras. As ações antrópicas dessa magnitude em uma faixa relativamente pequena como o litoral, além do turismo comum nessas regiões, geram mudanças profundas na dinâmica ambiental costeira.

No mundo, 3,6 bilhões de pessoas não possuem acesso a saneamento adequado (UNESCO, 2024). A segunda maior causa de morte em crianças menores de cinco anos é a doença diarreica, com quase 1,7 bilhão de casos e 525 mil óbitos na infância por ano (BRASIL. Ministério da Saúde, 2022). As águas costeiras são frequentemente transformadas em corpo receptor de efluentes. Devido às ligações clandestinas de esgoto nas redes de drenagem pluvial, precipitação pluviométrica intensa com extravasamento de estações elevatórias de esgoto, lavagem de vias públicas, tratamentos ineficientes e saturação de solos contaminados (IMA, 2024), fontes pontuais ou difusas de poluição, banhistas e usuários são expostos a grandes riscos como as doenças de veiculação hídrica: gastroenterites, hepatites, infecções e dermatites. No final do ano de 2022 e início do ano de 2023, período de alta temporada, foi decretada uma epidemia de gastroenterite em Florianópolis e Balneário Camboriú, no estado de Santa Catarina, com mais de quinhentos e oitenta casos notificados.

A Lei Federal Nº 9.433/1997 estabeleceu a Política Nacional de Recursos Hídricos, determinando fundamentos, objetivos, diretrizes e instrumentos para a gestão dos recursos hídricos de forma integrada, ou seja, promovendo desenvolvimento e gestão coordenados da água, da terra e dos recursos relacionados, de forma a maximizar o bem-estar social e

econômico equitativamente e sem comprometer a sustentabilidade dos ecossistemas vitais (GWP, 2000), instituindo a preservação dos corpos d'água.

A capacidade de detectar a poluição fecal e patogênicos a partir dos indicadores citados na Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente Nº 274/2000 (CONAMA), lei que estabelece os critérios de balneabilidade, é bastante limitada devido à falta de uma correlação entre coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* com alguns patógenos, desconsiderando sua menor persistência em águas salinas, sensibilidade a mudanças de temperatura, pH e a radiação solar (Ballesté et al., 2021). Além disso, a carga viral mesmo sendo pequena, pode ter alta infectividade, sendo crucial sua avaliação e detecção. Alguns indicadores virais tem se mostrado promissores nessa questão, como os bacteriófagos, vírus que infectam bactérias. Esses são mais específicos e confiáveis em detectar a poluição fecal e a presença de patógenos, além de serem mais resistentes em ambientes salinos e aos tratamentos convencionais nas estações de tratamento.

Diante do contexto exposto, é evidente a importância das análises de qualidade das águas destinadas à recreação de contato primário de forma a garantir a segurança de saúde pública em todo país, que possui cerca de 11 mil quilômetros de litoral e mais de 2 mil praias (IBGE, 2021). Assim, propõe-se explorar a eficácia dos indicadores microbiológicos virais do tipo colifagos somáticos ( $\phi$ x-174) e colifagos RNA F-específicos (MS2), visando aprimorar os critérios atuais de balneabilidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o comportamento de bacteriófagos em água do mar ao explorar sua eficácia como indicador microbiológico alternativo viral, com foco na inadequação dos indicadores microbiológicos tradicionais de balneabilidade, a fim de aprimorar a segurança da saúde pública.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a persistência e a eficácia de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, colifagos somáticos ( $\phi$ x-174) e colifagos RNA F-específicos (MS2) em água do mar.
- Comparar dados de balneabilidade do Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina (IMA) com análises de detecção e enumeração de bacteriófagos em amostras coletadas em praias de Florianópolis, Santa Catarina.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LEGISLAÇÃO

A nível federal, a Lei Nº 9.433/1997 estabeleceu como um dos objetivos da Política Nacional de Recursos Hídricos a necessidade de “assegurar à atual e às futuras gerações a necessária disponibilidade de água, em padrões de qualidade adequados aos respectivos usos”. Conhecida como Lei das Águas, esta diz que a água é um bem de domínio público, é um recurso natural limitado, que possui valor econômico, entre outros fundamentos, e que a gestão dos recursos hídricos deve proporcionar o uso múltiplo das águas. A lei enquadra os corpos d’água em classes a depender do uso preponderante. Os usos se dividem em consuntivo, onde a água que for captada do curso natural retornará em parte ao curso do rio; e não consuntivo, onde toda a água captada retorna ao curso do rio. Entre os usos não consuntivos estão a navegação, a pesca, a geração de energia elétrica, o turismo e o lazer (BRASIL, 1997).

É importante evidenciar também a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente Nº 357/2005 (CONAMA), que dispõe sobre a classificação dos corpos d’água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Esta resolução estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências, define as águas como doces, salobras e salinas, e as classifica, segundo a qualidade necessária ao uso preponderante. Neste trabalho são estudadas as águas salinas de Classe 1, definidas como águas que podem ser destinadas à recreação de contato primário, que corresponde a exposição direta e prolongada à água, com elevada possibilidade de ingestão; à proteção das comunidades aquáticas; à aquicultura e à pesca (BRASIL, 2005). A Resolução CONAMA Nº 430/2011 complementa e altera a resolução anterior, devendo ser obedecida quando verificada a inexistência de outra legislação, norma, disposição de órgão ambiental ou diretriz de operadora de sistema de coleta e tratamento de esgoto sanitário, quanto ao lançamento indireto de efluentes no corpo receptor (BRASIL, 2011).

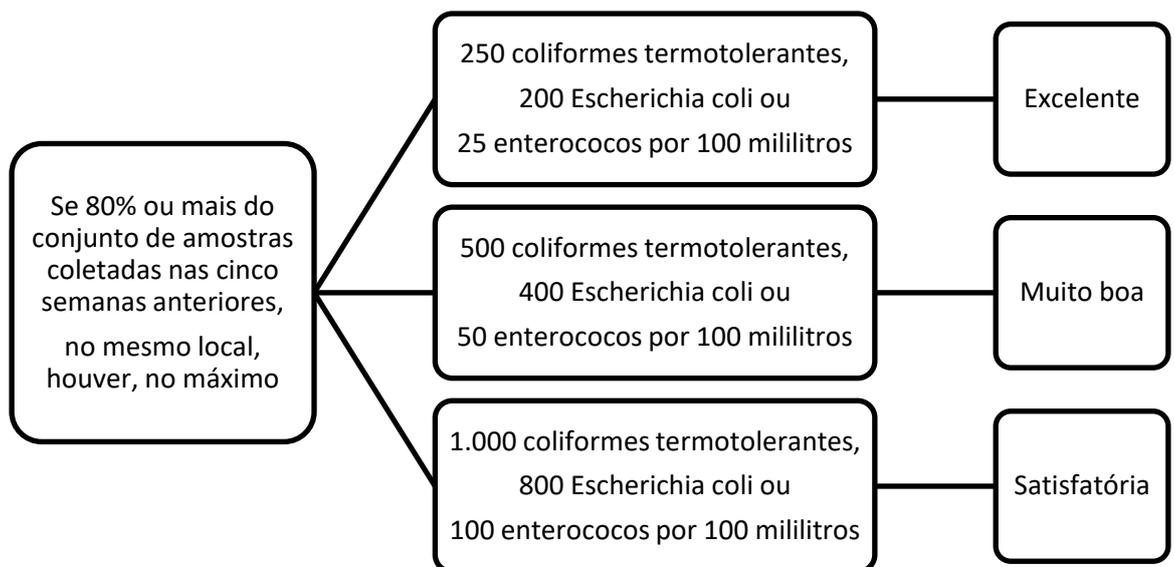
Em Santa Catarina, a Lei Nº 14.675/2009 institui o Código Estadual do Meio Ambiente, e declara que o órgão executor responsável por determinar a balneabilidade é o Instituto do Meio Ambiente (IMA). Há também as Resoluções do Conselho Estadual de Meio Ambiente Nº 181 e 182 de 2021 (CONSEMA), que estabelecem diretrizes aos padrões de lançamento de efluentes e de esgotos domésticos de sistemas de tratamento públicos e privados. A primeira determina tratamento especial se o efluente possuir despejos infectados com microrganismos

patogênicos ou se forem lançados em águas com recreação de contato primário ou irrigação. A segunda determina que se há lançamento de esgotos sanitários por Sistema de Disposição Oceânica, a bactéria *Escherichia coli* deve ser analisada mensalmente, e é um parâmetro de acompanhamento nos padrões de lançamento (BRASIL, 2021).

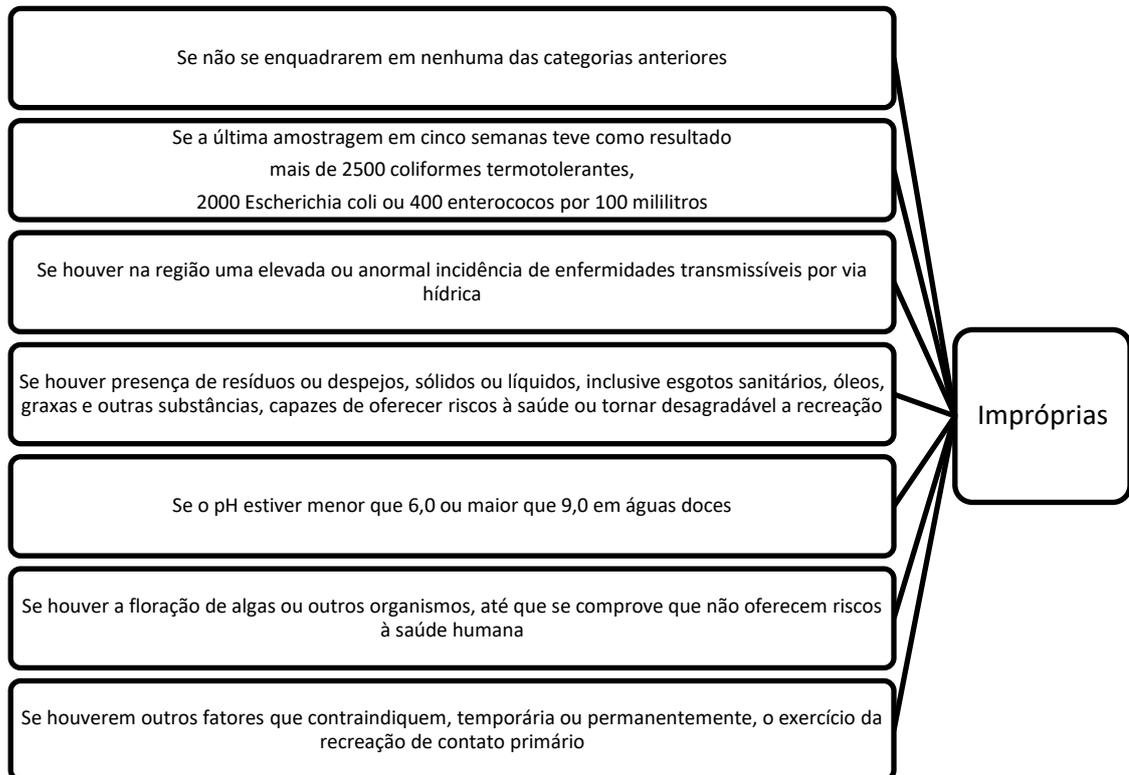
Para o presente trabalho é crucial a Resolução CONAMA Nº 274, de novembro de 2000, que considera águas salinas aquelas com salinidade igual ou superior a 30 ‰, e caracteriza-as, se destinadas à recreação de contato primário, em próprias e impróprias, sendo as próprias subdivididas em três categorias de acordo com a presença de alguns indicadores microbiológicos conforme Figura 1.

Dispõe também sobre os pontos de coleta, que devem ser onde há maior concentração de banhistas, e realizada em dias de maior público nas praias ou balneários. Os métodos de amostragem e análise das águas devem ser os especificados nas normas aprovadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO), ou no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* de APHA, AWWA & WPCE, última edição. Além disso, a coleta não deve conter sólidos como partículas grandes, detritos, folhas ou outro material acidental, e deve ser superficial, ou seja, feita entre 0 e 30 cm da lâmina d'água, em local que apresente a isóbata de 1 metro (BRASIL, 2000).

**Figura 1** - Categorização de águas para banho



Fonte: Adaptado de CONAMA Nº 274/2000.

**Figura 1 - Categorização de águas para banho**

Obs.: A análise de Enterococos é aplicada apenas às águas marinhas

Fonte: Adaptado de CONAMA Nº 274/2000.

### 3.2 INDICADORES MICROBIOLÓGICOS

Análises baseadas na presença de uma ampla gama de patógenos, como bactérias, vírus, protozoários e helmintos, os microrganismos de interesse sanitário, são bastante complicadas, demandam tempo, são economicamente inviáveis e podem necessitar de pessoal especializado ou laboratório de biossegurança. Além disso, só são analisados patógenos conhecidos e escolhidos, não detectando outros possíveis presentes (Li et al., 2021). Esses fatores levaram à utilização de indicadores.

Indicadores são, segundo Furtado (2009), unidades que podem ser medidas e utilizadas para construção de estatísticas, para caracterizar ou expressar efeitos e tendências. Em 1977, Ingram propôs o termo “microrganismo indicador” significando marcador, para um organismo que, se encontrado no meio, sugerisse a presença de um microrganismo patogênico similar (Forsythe, 2013).

Para ser um indicador ideal, de acordo com a World Health Organization (WHO), o microrganismo deve seguir alguns critérios como:

- Não ser patogênico;
- Estar sempre presente e em grande quantidade nas fezes dos animais homeotérmicos;
- Não se reproduzir no ambiente, apenas no intestino do hospedeiro;
- Ser tão persistente quanto os patógenos em água;
- Ter um maior número detectado no ambiente do que os patógenos que visa indicar;
- Resistir ao tratamento de água e esgoto da mesma forma que os patógenos fecais;
- Ser detectado por meio de métodos economicamente viáveis, rápidos e simples.

Coliformes totais, coliformes termotolerantes e enterococos são comumente encontrados no intestino de animais homeotérmicos e, por esse motivo, essas bactérias são atualmente utilizadas como indicadores microbiológicos de contaminação fecal em água (Burbano-Rosero, 2009). Estes organismos são celulares, diferentemente dos vírus que são formados por um capsídeo, ou cápsula proteica. Esta envolve o material genético dos vírus, característica que contribui para sua maior resistência às diversas variações ambientais ou processos de desinfecção a que forem sujeitas.

Devido as diferenças entre os microrganismos patogênicos, dificilmente um único indicador será representativo (Savichtcheva e Okabe, 2006). Além disso, vem sendo observado um aumento no número de doenças em decorrência de vírus, demonstrando ainda mais sua relevância (Hui, 2006). Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2015), no estudo de Sinclair (2009) foi constatado que, durante o período de 1951 a 2006, setenta e quatro por cento dos vinte e sete surtos virais registrados em águas destinadas a recreação excluindo piscinas, foram causados por Norovírus e Adenovírus. Outra questão importante é que a concentração de vírus patogênicos em águas que recebem contaminação fecal humana, mesmo com valores de indicadores bacterianos abaixo dos valores recomendados, ainda é alta o suficiente para causar doenças (EPA, 2023).

### 3.2.1 Indicadores atuais de balneabilidade

#### 3.2.1.1 *Coliformes totais*

Coliformes totais são bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, em forma de bastonetes, que fermentam lactose transformando em ácido e gás à uma temperatura de aproximadamente 37°C em até 48h e constituem quase 10% dos microrganismos entéricos (Li et al., 2021). Pertencem à família *Enterobacteriaceae*, composta por vários gêneros como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* e abrangem outros indicadores analisados para determinação de balneabilidade como os coliformes termotolerantes e a *Escherichia coli* (Castro, 2003).

O uso de coliformes como indicadores de balneabilidade é questionável por diversos motivos. Fernandes (2015) evidencia que, como não é possível determinar de onde a poluição fecal é proveniente, já que é encontrada nas fezes de animais homeotérmicos, no solo, em plantas, há baixa correlação entre o patógeno e a presença do indicador. A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) enuncia que, em sua maioria, não é comum a multiplicação fora do intestino, porém algumas específicas têm essa facilidade quando em água (Vieira et al., 1999). Outro fator é serem facilmente eliminados em processos de desinfecção (Hurst et al., 2007).

#### 3.2.1.2 *Coliformes termotolerantes*

Coliformes termotolerantes, antigamente chamados coliformes fecais, são bactérias presentes nas fezes humanas e de animais, mas não unicamente, já que bactérias dos gêneros *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* e *Citrobacter spp.* podem ser encontradas se reproduzindo em outros ambientes (EPA, 2015; Von Sperling, 2007). Diferenciam-se dos coliformes totais por fermentar a lactose em 24 horas a temperaturas médias de 45°C (FUNASA, 2013).

#### 3.2.1.3 *Escherichia coli*

Das bactérias utilizadas atualmente como indicadores de balneabilidade, a *Escherichia coli*, pertencente ao grupo dos coliformes termotolerantes, é especificamente proveniente de fezes de humanos e animais, diferentemente dos anteriores (EPA, 2015). Em um estudo para

averiguar a mortalidade infantil por diarreia, Theodor Escherich a isolou pela primeira vez em 1885 (Escherich e Bettelheim, 1989). São caracterizadas por possuírem enzimas  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glucoronidase, multiplicarem-se por volta dos 45°C, fermentarem lactose e manitol (CONAMA, 2000).

Um dos problemas no seu uso como indicador é o fato de que, mesmo com poucos tipos patogênicos, podem causar doenças, tendo maior risco para crianças, idosos ou imunodeprimidos (Nataro & Kaper, 1998 *apud* Castro, 2003; EPA, 2023); já encontrada se reproduzindo fora do intestino de animais (Solo-Gabriele et al., 2000) e sua quantificação não se configura como um dos métodos mais rápidos, além de sua persistência depender da origem do meio, da incubação e do tempo que foi coletada a amostra para análise (WHO).

#### 3.2.1.4 *Enterococos*

Os Enterococos são, das bactérias indicadoras, as de sobrevivência mais parecida com os patógenos entéricos por persistirem de forma similar no ambiente marinho, tendo maior relação entre eles. Possuem maior resistência a salinidade, crescimento entre 10 e 45 °C e as espécies mais encontradas resistem a um pH de 4,6 a 9,9 (Calatrava, 2022).

### 3.2.2 Indicadores alternativos de balneabilidade

#### 3.2.2.1 *Bacteriófagos*

Vírus que infectam bactérias, os bacteriófagos tem tamanho, composição, estrutura e morfologia similares aos vírus animais e humanos, além de sua persistência no ambiente e resistência a processos de tratamento de efluentes e desinfecção também semelhantes (Jofre et al., 2016). Apesar de serem encontrados nos mesmos ambientes que as bactérias, apenas podem se reproduzir dentro de um hospedeiro, são parasitas intracelulares obrigatórios, e quase sempre são provenientes de fezes humanas ou de animais homeotérmicos, características positivas para um indicador ideal, como explicitado por WHO e Grabow, Brüßow e Jończyk (EPA, 2015), podendo ser detectados e quantificados por métodos de bom custo-benefício, rápidos e simples.

Atualmente as bactérias indicadoras, para águas que recebem esgoto sem tratamento ou com tratamento insuficiente, são úteis, porém há uma gama maior de estudos sugerindo

outros tipos de indicadores para prever o risco de adoecimento (EPA, 2023). Já é uma recomendação da APHA e da EPA o uso dos colifagos ou fagos, bacteriófagos que, em sua maioria, infectam coliformes, como indicadores fecais.

Como contemplado por Davis (Davis, 1990 *apud* Grabow, 2000), fagos se reproduzem por meio de dois ciclos. No ciclo lítico, o fago virulento infecta a célula, replica-se e causa a ruptura da mesma, liberando um grande número de vírus em minutos. Segundo Brock, Madigan e Hayes, no ciclo lisogênico, fagos temperados, a depender de determinadas condições, acabam não se replicando assim que infectam a célula, podendo na verdade integrar seu material genético ao da célula hospedeira e seguir sendo carregado pela reprodução da bactéria. Outra possibilidade é a de formar plasmídeos, elementos genéticos que podem se replicar dentro da bactéria, com a possibilidade de integrá-la com novas características, inclusive patogênicas. Esse fato vai de encontro as características de um indicador ideal (Brock, Madigan e Hayes *apud* Grabow, 2000).

O presente trabalho visa analisar especificamente bacteriófagos que infectam bactérias do gênero *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, os Colifagos somáticos e os Colifagos F-específicos, F-RNA macho-específicos, ou RNA F-específicos, que são os mais estudados como possíveis indicadores de contaminação fecal.

Colifagos somáticos utilizam a parede celular para se fixar e se incorporar à bactéria e são os mais abundantes no ambiente, normalmente advindos das famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, e *Microviridae* (Jofre, 2007; Muniesa, Lucena e Jofre, 1999). Um dos problemas como possível indicador é já terem sido encontrados infectando *Klebsiella* e *Shigella* além da *Escherichia coli*, bactérias às vezes encontradas se reproduzindo fora do intestino, assim havendo chances de também se replicarem no ambiente aquático (EPA, 2015; Von Sperling, 2007; Jofre, Lucena e Muniesa, 2016).

Colifagos F-específicos, normalmente das famílias *Inoviridae* (DNA-específico) e mais abundantemente *Leviviridae* (RNA-específico), são um grupo de fagos que usa o pili sexual do hospedeiro como local para se conectar. O plasmídeo F contém o código para produção do pili, o que faz com que o alcance do fago dependa da transferência e expressão deste plasmídeo na bactéria, que só é sintetizado em temperaturas maiores que 30 °C (GRABOW, 2000). São mais resistentes a luz UV que os somáticos, mas menos persistentes quanto a altas temperaturas e pH (Jofre, 2007; Ballesté *et al.* 2022).

Há estudos que relacionam subdivisões de gêneros da família *Leviviridae* a uma possibilidade de diferenciação na poluição fecal. De acordo com Hartard, Rivet, Banas e

Gantzer, 2015, os dois gêneros *Levivirus* e *Allolevivirus*, da família *Leviviridae*, são subdivididos em quatro subgrupos devido as suas características similares, sendo grupos I e II do *Levivirus* e II e IV do *Allolevivirus* (King *et al.* 2011; Vinje *et al.* 2004; Friedman *et al.* 2009 *apud* McMinn, Ashbolt e Korajkic, 2017). A contaminação advinda de fezes humanas tem sido associada aos grupos II e III, e a de fezes de animais aos grupos I e IV (Griffin *et al.* 2000; Cole *et al.* 2003; Noble *et al.* 2003 *apud* McMinn, Ashbolt e Korajkic, 2017). Apesar de ainda não ter uma associação perfeita como no estudo de Arredondo-Hernandez (2017) no México, há vários novos estudos nessa direção.

Os autores McMinn, Ashbolt e Korajkic (2017) evidenciaram uma importante característica dos bacteriófagos, vírus e bactérias entéricos em geral: sua capacidade de aderir-se a materiais particulados (tendem a sedimentar), podendo influenciar em seu comportamento e persistência no meio. A depender de sua carga superficial, do pH da água, da densidade de sólidos suspensos na coluna d'água, do tipo de solo ou sedimento ou da velocidade da água (Cho *et al.* 2016 *apud* McMinn, Ashbolt e Korajkic, 2017), também podem afetar a forma como devem ser removidos num processo de desinfecção (Templeton, Andrews e Hofmann, 2005; Bradford, Tadassa e Jin, 2006 *apud* McMinn, Ashbolt e Korajkic, 2017). Acontece em 20% a 60% dos colifagos e 20 a 55% das bactérias indicadoras. De acordo com Ferguson *et al.* (2005) qualquer movimentação na água, como atividades de recreação ou chuvas intensas, podem aumentar sua carga de vírus ao ressuspender os sedimentos sólidos e desprender vírus e bactérias aderidos, sendo os vírus de 100 a 1000 vezes mais difíceis de desprenderem-se (Ferguson *et al.*, 2005 e Characklis *et al.* 2005, Hijnen *et al.* 2005 *apud* McMinn, Ashbolt e Korajkic, 2017).

Os bacteriófagos ainda não são amplamente aceitos como indicadores fecais de poluição por sua sensibilidade à radiação solar, à alta temperatura e à alta salinidade (Havelaar and Pot-Hogeboom, 1988; Sinton *et al.*, 2002; Gorchev and Ozolins, 2011). Porém, de acordo com Sinton, Finlay e Lynch, 1999, em água do mar, persistiram por mais tempo do que as bactérias indicadoras, sendo os somáticos ainda mais resistentes. O colifago F-específico (MS2), de acordo com Theitler *et al.* (2012) em seus estudos, persistiu ao aumento das temperaturas e radiação solar, por mais tempo que a *E. coli*.

Outro fator problemático dos bacteriófagos é ser encontrado em grande quantidade em águas residuárias, mas nem sempre em grandes quantidades em outros meios (Havelaar e Pot-Hogeboom, 1988), um dos motivos de serem propostos muitas vezes em conjunto com os indicadores bacterianos.

Em seu trabalho, Grabow (2000) reuniu algumas características que põem em dúvida a qualidade dos colifagos como indicadores, como o fato de não haver correlação direta entre a densidade de fagos e vírus provenientes de fezes humanas, uma vez que fagos são excretados por humanos e animais a todo momento, e vírus somente por infectados durante a infecção (Vaughn and Metcalf, 1975; Borrego et al., 1990; Grabow et al., 1993 *apud* Grabow, 2000); ou por haver registro de detecção de vírus entéricos sem detecção de colifagos em ambientes aquáticos (Montgomery, 1982; Deetz et al., 1984; Morinigo et al., 1992 *apud* Grabow, 2000); ou porque os fagos são excretados por animais homeotérmicos, e os vírus entéricos transmitidos pela água quase sempre tem origem especificamente humana (Grabow, 1996 *apud* Grabow, 2000); ou porque os hábitos alimentares e a saúde dos animais possivelmente influenciam na densidade de colifagos nas fezes (Osawa et al., 1981 *apud* Grabow, 2000); ou pela diferença na quantidade de fagos expelidos por humanos saudáveis e que tomaram antibióticos (Furuse et al., 1983 *apud* Grabow, 2000); ou por haver diferenças na eficiência dos processos de recuperação entre fagos e vírus entéricos (Grabow, 2000).

### 3.2.3 Ensaio de Decaimento

O ensaio de decaimento tem como propósito avaliar o decaimento dos diferentes microrganismos em um ensaio controlado para determinar se os vírus estudados persistem por mais tempo que bactérias em água salgada.

Segundo Boehm et al. (2018) um dos motivos para o decaimento das bactérias é a inativação, tanto na ausência de luz devido a fatores como estresse, envelhecimento, poucos nutrientes, compostos tóxicos ou predadores, quanto na presença da luz, devido aos danos da radiação solar e temperatura. O decaimento também pode se dar fisicamente como devido às correntes marítimas, processos de adsorção e sedimentação ou turbidez da água, além de quimicamente como uma alteração da pressão osmótica em água do mar ou uma alteração de vários desses fatores devido a uma diluição (Carneiro, 2014; Von Sperling, 2007; Sinton, Finlay e Lynch, 1999).

## 4 METODOLOGIA

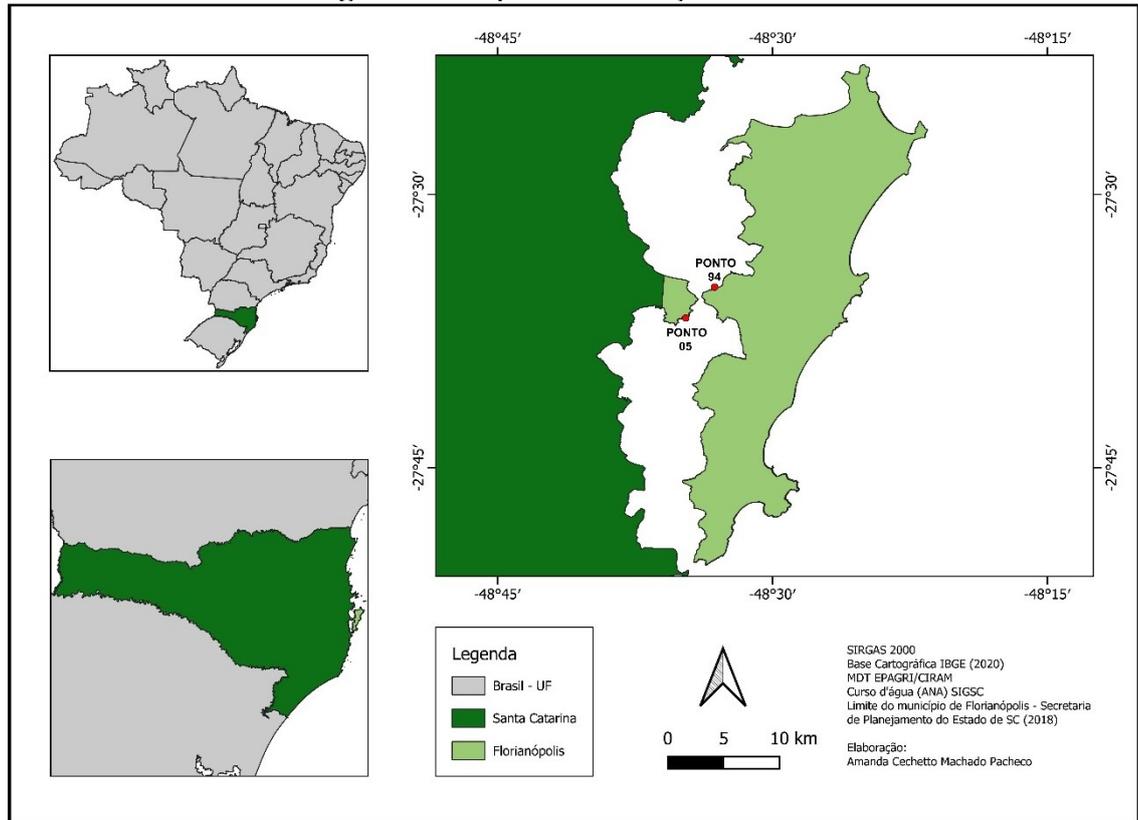
### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL E PONTOS DE ESTUDO

Para investigar e propor aprimoramentos nos critérios de balneabilidade utilizados no Brasil, o presente trabalho adota uma metodologia que une abordagem quantitativa e pesquisa bibliográfica. Serão realizadas uma análise da taxa de decaimento de bactérias e vírus inoculados em água do mar e análises de amostras de água coletadas duas vezes nos meses de maio de 2024. A pesquisa se baseia na ideia de inadequação dos indicadores microbiológicos tradicionais de balneabilidade em ambientes costeiros, e exploração da eficácia de indicadores microbiológicos alternativos virais.

As coletas foram realizadas por amostragem simples na região da Grande Florianópolis, no estado de Santa Catarina, com base nos pontos já utilizados pelo Corpo de Bombeiros Militar de Santa Catarina nas análises de balneabilidade. A preferência de escolha foi para locais normalmente considerados “impróprios”, ou seja, quando em mais de 20% de um conjunto de amostras coletadas nas últimas cinco semanas, no mesmo local, forem superiores a 800 *Escherichia coli* por 100 ml ou quando, na última coleta, o resultado for superior a 2000 *Escherichia coli* por 100 ml, conforme a Resolução CONAMA nº 274/2000. Os pontos escolhidos foram: Ponto 05, de coordenadas (-27.613598, -48.585135), no meio da Praia do Meio e Ponto 94, de coordenadas (-27.586566, -48.554038), em frente à Praça Esteves Junior, como consta na Figura 2. O ensaio de decaimento foi feito apenas para uma amostra do Ponto 94, com análises nos dias 29 e 31 de maio, 3, 5, 7, 12 e 14 de junho, além da análise da amostra bruta nos dias 9 e 29 de maio. Já para o Ponto 05 foi feita uma coleta e análise da amostra bruta nos dias 9 de maio.

O clima em Florianópolis, de acordo com a classificação climática de Köppen, que se baseia nos perfis de temperatura e precipitação, é considerado *Cfa*, ou seja, “Clima subtropical úmido, oceânico sem períodos secos e com verões quentes e chuvosos” (Alvares et al., 2014). Segundo a Prefeitura Municipal de Florianópolis (2021), a precipitação anual da cidade é de, em média, 1600mm.

**Figura 2 - Mapa de localização**



Fonte: A autora (2024).

Um dos focos do estudo foi analisar as taxas de decaimento das bactérias *Escherichia coli* e Enterococos e dos bacteriófagos øx-174 e MS2 em água do mar, para assim determinar suas persistências. Além disso, foram conduzidas análises da amostra original bruta, para comparação com as análises conduzidas pelo Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina – IMA. Os métodos utilizados foram a técnica de cultivo em placas de ágar para as bactérias (*spread plate method* ou método de espalhamento) e a de duplo ágar de Adams (1959) para os bacteriófagos.

Com base nas normas, as amostras foram coletadas em galões de 5 Litros previamente lavados com água sanitária e álcool. Quanto aos Equipamentos de Proteção Individual, os EPIs (Figura 3) utilizados foram luvas e roupa para proteção, uma jardineira impermeável de PVC com bota soldada da marca Pioneira. Garantindo que a amostra não tem sólidos indesejados e foi coletada superficialmente, em local que apresentasse a isóbata de 1 metro, foram acondicionadas em caixa térmica refrigerada, transportadas e manipuladas no menor tempo possível.

**Figura 3** – Imagens da Beira Mar Norte (a esquerda) e EPIs (a direita).



Fonte: A autora (2024).

## 4.2 CULTURA PARA INÓCULO

Para o ensaio de decaimento foi necessário cultivar as bactérias no dia anterior para que pudessem ser inoculadas. Adiciona-se a um Erlenmeyer um vial de 1,2ml da bactéria e 50ml de meio de cultura (caldo), sendo MSB para *Escherichia coli*, TYGB para *Salmonella Typhimurium* e TSB para *Enterococcus faecalis*, resultando em três Erlenmeyer. Após, são colocados na incubadora à 37°C as duas primeiras bactérias, e à 41°C a terceira. Dezoito horas depois (*overnight*) são retiradas e coloca-se mais 30ml de meio, voltando-as para as incubadoras por mais duas horas. Assim, estão prontas para serem inoculadas à amostra para o ensaio de decaimento e para a análise de bacteriófagos (a *E. coli* e a *S. Typhimurium*). Na Figura 4 temos os caldos MSB à esquerda e TYGB à direita, já com as bactérias cultivadas.

O procedimento de análises a seguir foi utilizado tanto nas amostras brutas quanto nas amostras retiradas ao longo do tempo para estudo da persistência das bactérias e vírus na água do mar.

O ensaio de decaimento foi iniciado no dia 29 de maio de 2024, o dia zero, onde foi feita a inoculação dos microrganismos, e realizados também nos dias dois, cinco, sete, nove, quatorze

e dezesseis. A análise individual das amostras brutas foi realizada no dia de cada coleta, dias 9 e 29 de maio. Todas as análises foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC.

**Figura 4** – Meios MSB (à esquerda) e TYGB (à direita).



Fonte: A autora (2024).

Periodicamente é feita a propagação das espécies hospedeiras *Escherichia coli* C (ATCC13706) e *Salmonella Typhimurium* WG49 (NCTC12484), que foram cedidas pelo Grupo de Pesquisas de Recuperação de Recursos em Sistemas de Saneamento (RRESSA), do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Segue-se o processo de cultura e manutenção das bactérias hospedeiras, de acordo com a ISO10705 (ISO 10705-1:1995 e ISO 10705-2:2000 – Qualidade da água, detecção e enumeração de bacteriófagos).

A propagação das bactérias se dá dividindo as bactérias padronizadas em alíquotas. Escolhe-se aleatoriamente um vial da bactéria mantida em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  e despeja-se em um erlenmeyer de 125 ml juntamente ao seu caldo líquido, o meio em que se propagará, a depender da bactéria, sendo *Modified Scholten's Broth* (MSB) para *Escherichia coli*, *Tryptone Yeast extract-Glucose Broth* (TYGB) para *Salmonella Typhimurium* e *Trypticase Soy Broth* (TSB) para *Enterococcus faecalis*. Este erlenmeyer segue para a incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  no caso

das duas primeiras bactérias e a 47°C no caso da terceira, durante 18 horas (*overnight*). Após é adicionado 30 ml do mesmo caldo específico e incubado por mais 2 horas. Terminado o tempo, são feitos esfregaços em placas de meio específico com alças de inoculação estéreis, e incubados por 24 horas (ou 48 horas para Enterococos). Dessas placas são coletadas com a alça cinco colônias que são inseridas em 50 ml de meio em outro erlenmeyer, voltando para a incubadora por 5 horas. Para finalizar a solução estoque, é adicionado glicerol 850 g/L na proporção de 1:1 ao erlenmeyer, divide-se 1,2 ml em vials estéreis e armazena-se novamente nos freezers.

#### 4.3 ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS

A enumeração das bactérias *Escherichia coli* foi realizada no meio de cultura MacConkey da marca KASVI. Inicia-se com a diluição decimal seriada, adicionando aos tubos de ensaio 9 ml de água peptonada e 1 ml da amostra. Replicando esta etapa e trocando a amostra bruta pela amostra diluída do tubo de ensaio anterior, tem-se as diluições 1:10, 1:100, até 1:10000. Depois é adicionado 0,1 ml de cada tubo às placas de ágar e espalha-se uniformemente com uma alça T. Ao fim, é feita a leitura após 24 horas na incubadora a 37°C. É importante salientar que adicionar 0,1 ml implica em iniciar a diluição em 1:100 e não em 1:10.

A mesma diluição foi utilizada para os *Enterococos faecalis*, porém é adicionado 0,1ml ao meio de cultura Slanetz and Bartley da marca KASVI, e sua leitura é feita após 48 horas na incubadora a 41°C. O resultado é expresso em notação científica e transformado em logaritmo na base 10 de Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro (UFC/ml), para facilitar as análises posteriores ao normalizar os valores. A Equação (1.1) a seguir é utilizada para calcular o número de microrganismos presentes na amostra.

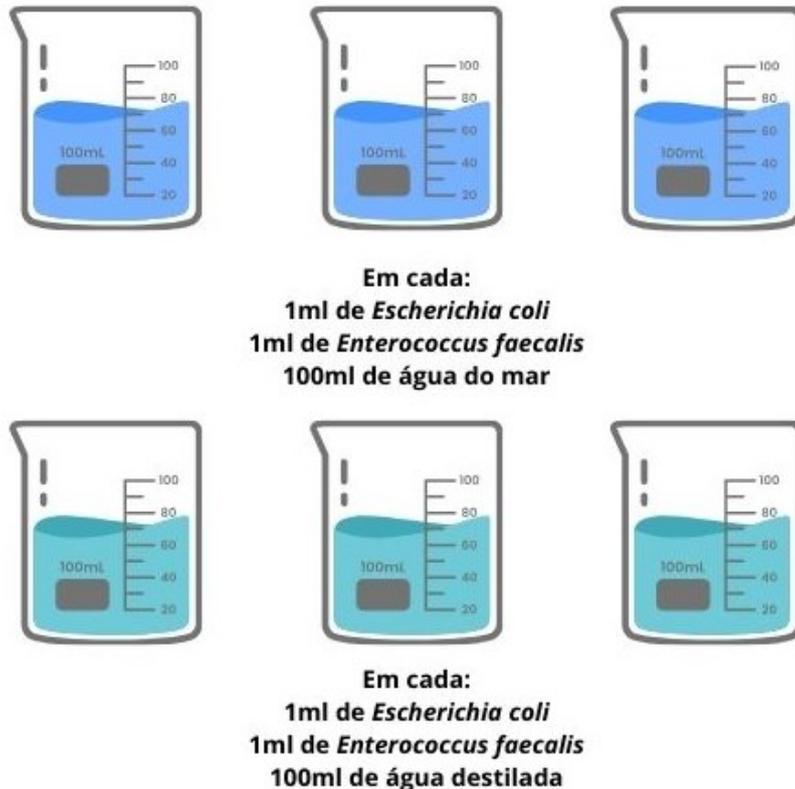
$$\frac{n^{\circ} \text{ de microrganismos}}{\text{ml}} = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias contadas na placa}}{\text{diluição da amostra}} \quad (1.1)$$

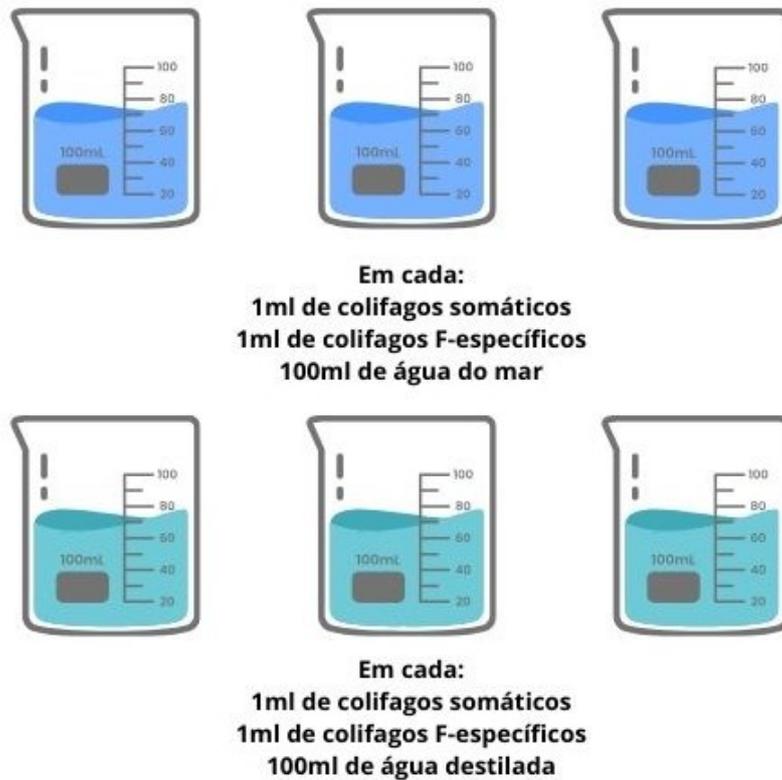
Onde o termo *diluição da amostra* significa dizer que, se a diluição da placa foi de 1:1000, a diluição é  $10^{-3}$ .

#### 4.4 ENUMERAÇÃO DE VÍRUS

Para o ensaio de decaimento foram inoculadas as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* e os colifagos somáticos ( $\phi$ x-174) e colifagos F-específicos (MS2). O ensaio foi feito em triplicata. Em três beakers foram inoculadas as bactérias à 100 ml da amostra de água do mar e em outros três elas foram inoculadas à 100 ml de água destilada para controle. Os vírus foram inoculados à água do mar e também à água destilada, totalizando 12 beakers de 100 ml cada um, como consta na Figura 5. Os microrganismos foram inoculados a uma concentração de 1% da amostra, ou seja, 1ml de cada para cada becker. Sobre os beakers foi colocado papel alumínio e estes permaneceram em uma sala a temperatura de 21°C ao longo de 16 dias.

**Figura 5** – Ensaio de decaimento



**Figura 5 – Ensaio de decaimento**

Fonte: A autora (2024).

Foram feitas titulações prévias para obtenção da concentração média dos organismos, sendo 6,131 log<sub>10</sub> UFC/ml de *Escherichia coli*, 6,106 log<sub>10</sub> UFC/ml de *Enterococcus faecalis*, 11,097 log<sub>10</sub> UFP/ml de colifagos somáticos (øx-174) e 11,146 log<sub>10</sub> UFP/ml de colifagos RNA F-específicos (MS2).

Anteriormente ao processo de detecção e enumeração bacteriófagos do tipo colifagos somáticos da espécie øx-174, que infectam *Escherichia coli*, e RNA F-específicos da espécie MS2, que infectam *Salmonella Typhimurium* são produzidos três meios de cultura diferentes: o meio com ágar, que é disposto em placas de Petri e solidifica, o meio semissólido em frascos graduados com tampa também com ágar e o caldo líquido para crescimento das bactérias. Na Tabela 1 e 2 encontram-se os reagentes e dosagens utilizadas para a confecção de 100 ml dos meios utilizados.

**Tabela 1** – Fórmula de 100 ml de meio TYGB

Meio TYGB	
Composição	Dosagem
Triptona [g]	1
Extrato de levedura [g]	0,1
Cloreto de sódio (NaCl) [g]	0,8
Água peptonada [ml]	1

Fonte: adaptado de KASVI.

Essa configuração é para o meio líquido para cultivo de bactérias. Para o meio de cultura a ser disposto em placas de Petri adiciona-se 1,8g de ágar bacteriológico e é denominado *Tryptone Yeast extract-Glucose Agar* (TYGA). Para o meio semi-sólido adiciona-se metade dessa quantidade e é chamado *Tryptone Yeast extract-Glucose Agar* (TYGA SS). Após autoclavar o frasco e o meio, adiciona-se 1 ml de solução de cálcio-glucose. A água peptonada é uma mistura de 0,1g de Peptona e 0,85g de NaCl em 100 ml.

A Tabela 2 a seguir é a configuração para o cultivo de bactérias em meio líquido. Para meio de cultura em placa, deve-se adicionar 1,8g de ágar bacteriológico e é nomeado *Modified Scholten's Agar* (MSA). Para o meio semissólido, *Modified Scholten's Agar* (MSA SS) adiciona-se metade do ágar. Por fim, é autoclavado o frasco e o meio e adiciona-se 0,6 ml de solução de cloreto de cálcio. Todos os produtos utilizados para produção desses meios são da Marca KASVI.

**Tabela 2** – Fórmula de 100 ml de meio MSB

Meio MSB	
Composição	Dosagem
Peptona [g]	1
Extrato de levedura [g]	0,3
Extrato de carne [g]	1,2
Cloreto de sódio (NaCl) [g]	0,3
Água peptonada [ml]	1
Solução de 150g/L de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> [ml]	0,5
Solução de 100g de MgCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O em 50 ml de água [ml]	0,03

Fonte: adaptado de KASVI.

São feitas as diluições da amostra como anteriormente, então são colocados tubos de ensaio vazios em uma estação de aquecimento conhecida como bloco seco ou digestor com temperatura de 47°C e adicionados 2 ml de meio semissólido, 1 ml de amostra diluída e 1 ml da bactéria cultivada. Em seguida, cada tubo é agitado num vórtex e derramado uniformemente em uma placa de Petri com meio MSA ou TYGA, para *Escherichia coli* ou *Salmonella Typhimurium* respectivamente. Após a solidificação da amostra na placa, estas são viradas e incubadas por 18 horas à 37°C.

O resultado é expresso da mesma forma que as bactérias, porém enumerando os halos formados nos meios específicos indicando que o bacteriófago provocou a lise da célula hospedeira e em Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/ml).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Valores de concentração de bactérias e vírus foram obtidos e, para iniciar, calculou-se a média, o desvio padrão, o mínimo, o máximo e a mediana de cada microrganismo em cada dia de análise. Sobre os parâmetros foi utilizada uma matriz de correlação, que mede a intensidade da relação linear entre todas as variáveis. Em seguida foi aplicado o teste de ANOVA, uma análise estatística de variância para comparação das médias das bactérias e dos vírus a fim de encontrar padrões, e também os testes de *Tukey* e *t de Student*, que analisam as médias entre todos e entre dois grupos, respectivamente (Hurst et al., 2007). Os cálculos prévios foram realizados no *software Excel* da empresa *Microsoft*, os testes estatísticos e gráficos no *software Prism* da empresa *GraphPad Software, LLC* e mapas no *software Qgis*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE DE PARÂMETROS

Foi realizada uma aferição de parâmetros através de sonda multiparamétrica *ProQuatro* da empresa YSI, entre eles temperatura, pressão, Oxigênio Dissolvido (OD), condutividade elétrica, pH e Potencial de Oxidação/Redução (ORP), a fim de caracterizar a amostra ao longo do ensaio. Para os bacteriófagos o foco deve ser na temperatura, salinidade e pH, características chave para inativação dos microrganismos estudados, como visto anteriormente. A Tabela 3 indica os valores obtidos através da sonda nos dias 0 e 6, exceto salinidade e Sólidos Dissolvidos Totais (SDT), que foram calculados.

**Tabela 3** – Valores de parâmetros obtidos por sonda

<b>Dia</b>	<b>0</b>			<b>6</b>		
<b>Horário</b>	<b>10:53</b>	<b>11:11</b>	<b>13:21</b>	<b>12:44</b>	<b>12:54</b>	<b>13:02</b>
Temperatura (°C)	18,9	19,20	20,30	21,2	21,1	21,2
Pressão (mmHg)	765	765,00	764,40	769,1	769	768,9
OD (mg/L)	3,93	3,68	3,27	0,08	0,06	0,03
Condutividade elétrica (µS/cm)	40489	40561	40661	41480	40904	41269
<b>Salinidade (PPS-78, ppm)</b>	29,8	29,60	28,90	29,0	28,6	28,8
<b>SDT (mg/L)</b>	28342,30	28392,70	28462,70	29036,00	28632,80	28888,30
pH	8,46	8,47	8,46	7,83	7,99	8,09
ORP (mV)	148,9	98,30	74,30	-247,4	-220,4	-196,8

Fonte: A autora (2024).

A relação entre condutividade elétrica, SDT e salinidade não é direta e vários estudos exploram essa temática. Através da Escala de Salinidade Prática (PPS-78), baseado nas especificações da Ocean Observatories Initiative (2023), relacionou-se a condutividade elétrica à salinidade, sendo válida apenas para valores de salinidade entre 2 e 42 partes por milhão (ppm), resultando em valores de 29,8; 29,6 e 28,9 ppm para o dia 0, e de 29,0; 28,6 e 28,8 ppm para o dia 6. Também foram estimados valores de SDT ao multiplicar os valores obtidos em µS/cm por 0,7 (Rusydi, 2018), com os resultados expressos na Tabela 3. A água do mar tem

aproximadamente 35 ppt (NASA) e um estudo de Nascimento et al. (2022) analisou a água num ponto da Baía Norte em Florianópolis, obtendo para o outono aproximadamente 31,65 ppm, o que faz com que os valores fiquem dentro do esperado. A condutividade elétrica é de, em média, 53000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a 25 °C (YSI, 2019) e SDT próximo a 35000mg/L. A água doce tem 100 a 2000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (CWT, 2004) e até 1000 mg/L de SDT (U.S. Geological Survey, 2018).

Potencial de Oxidação/Redução ou Redox (ORP) é medido em milivolts (mV) e indica quanto ou se um meio aquoso apresenta reações características de sistemas biológicos ou de metais (EPA, 2017). Na Tabela 4, temos algumas dessas reações e seus valores de ORP (YSI, 2019). É comumente utilizado para determinar a qualidade de processos de tratamento de água.

**Tabela 4 – Reações características de sistemas biológicos e valores de ORP**

<b>Reação</b>	<b>ORP (mV)</b>
Nitrificação	+100 a +350
Desnitrificação	+50 a -50
Remoção biológica de Fósforo	+25 a +250
Degradação da DBO carbonácea com O <sub>2</sub> livre	+50 a +250
Formação de gás sulfídrico (H <sub>2</sub> S)	-50 a -250
Fermentação	-100 a -225
Produção de metano (CH <sub>4</sub> )	-175 a -400

Fonte: adaptado de YSI, 2019.

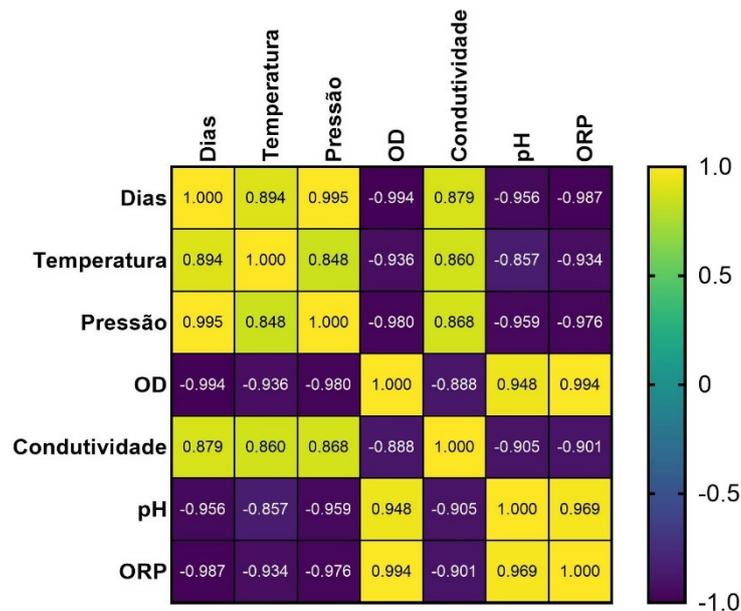
Aplicando o teste de correlação de Pearson observado na Figura 6, observou-se fortes correlações entre algumas das variáveis, tanto positivas quanto negativas. Houve correlação positiva forte entre os dias X temperatura (0,894), que pode ser explicado pelo fato de a amostra ter chegado ao laboratório refrigerada, e ao longo das horas aumentou a temperatura até permanecer próxima de 21°C, que era a temperatura que a sala se encontrava, da mesma forma que a relação entre os dias X pressão (0,995) e dias X condutividade (0,879), acredita-se que foi apenas a estabilização da amostra. Outras correlações positivas foram apontadas entre temperatura X pressão (0,848), que conceitualmente estão relacionadas, como na alteração do ponto de ebulição em diferentes altitudes e pressões; a temperatura X condutividade (0,860), visto que teoricamente o aumento do calor em um material condutor causa aumento da energia cinética dos átomos, interferindo na sua condutividade (Bagnato e Rodrigues, 2006); entre a pressão e a condutividade (0,868), onde da mesma forma que a temperatura, o aumento da pressão aumenta a massa por volume ocupado, alterando também a movimentação dos elétrons da amostra e da condutividade, porém a pressão atmosférica no local quase não varia, sendo

essa relação desconsiderada; entre o OD e o pH (0,948), OD e o ORP (0,994); e entre o pH e o ORP (0,969), visto que essas variáveis estão intimamente relacionadas aos organismos e seus processos, como por exemplo na eutrofização, onde o excesso de nutrientes aumenta o número de algas e plantas aquáticas que depois se decompõem, gerando gás sulfídrico e diminuição do pH e OD (Siqueira et al. 2011, Rivas et al. 2009 *apud* Nozaki, 2014), além da diminuição de radiação solar pela barreira física, fazendo com que diminua a fotossíntese em áreas menos superficiais (Fragoso Jr. et al., 2007).

Já correlações negativas foram encontradas entre dias e OD (-0,994), o pH (-0,956), e o ORP (-0,987); entre a temperatura e o OD (-0,936), visto que o aumento da temperatura fará com que gases fiquem mais solúveis (Von, Sperling, 2005), o pH (-0,857), e o ORP (-0,934); entre a pressão e o OD (-0,980), o pH (-0,959) e o ORP (-0,976); entre o OD e a condutividade (-0,888); entre a condutividade e o pH (-0,905), e o ORP (-0,901).

Esses valores podem explicar motivos para o valor de salinidade menor que a média para a água do mar observado anteriormente, pois a salinidade foi obtida por meio da condutividade, que depende da temperatura e pressão, e vê-se que condutividade X pressão e condutividade X temperatura comportam-se de maneira semelhante por terem fortes correlações positivas. Outro possível fator é a precipitação na semana anterior, o que pode ter acarretado em uma diluição das águas superficiais.

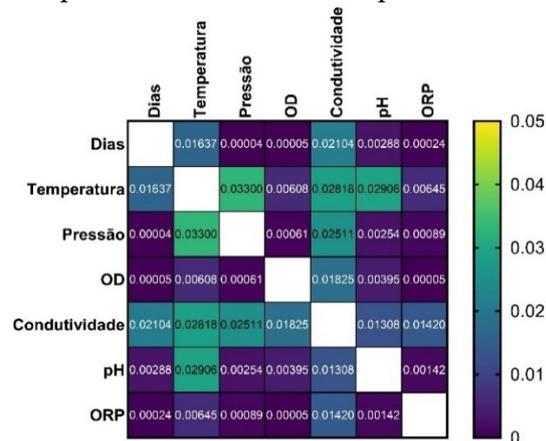
**Figura 6** – Mapa de Calor da Correlação de Pearson entre parâmetros



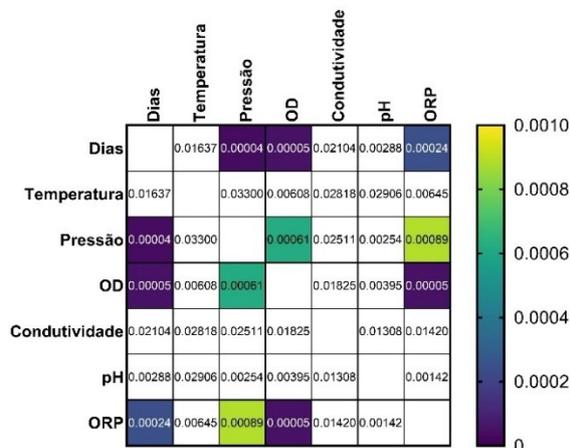
Fonte: A autora (2024).

Como a correlação de Pearson não indica que uma variável necessariamente causa a outra, observou-se também os valores-p. Valores menores que o nível de significância escolhido ( $p < 0,05$ ) são uma sugestão de que são valores significativos. O maior valor-p foi de  $3,30E-02$ , enquanto o menor foi de  $3,56E-05$ . Como pode-se observar na Figura 7 (A), há relação significativa entre todos, porém, apresentando os valores de 0 a 0,05 não é possível verificar a diferença clara entre os valores muito baixos. Refazendo o gráfico de Mapa de Calor com valores de 0 a 0,001, na Figura 7 (B), pode-se constatar que as relações mais fortes (em roxo) ocorrem entre os dias e a pressão, os dias e o OD; e entre o ORP e o OD. Isso indica que, como as correlações entre os dias e o OD e os dias e o ORP foram negativas fortes, ao longo do aumento dos dias, os valores de OD e ORP diminuíram. A correlação entre os dias e a pressão foi positiva forte, então aumentando o número de dias de repouso da amostra, aumentou também a pressão. Por fim, a correlação positiva forte entre o ORP e o OD indica que ambos decaíram simultaneamente.

**Figura 7** – Mapas de calor dos valores-p em duas escalas



(A) Mapa de Calor dos valores-p em escala 0-0,05



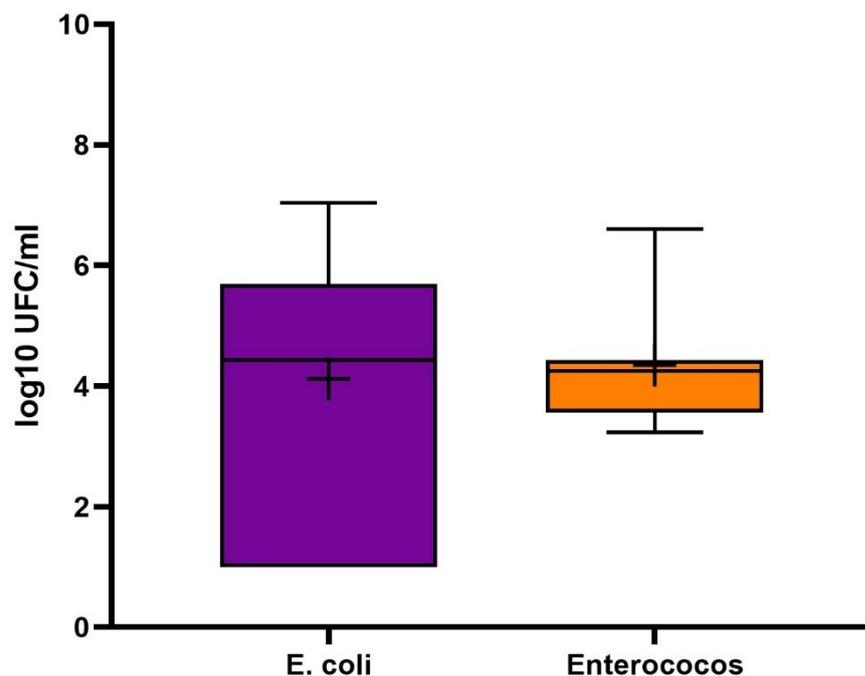
(B) Mapa de Calor dos valores-p em escala 0-0,001

Fonte: A autora (2024).

## 5.2 ENSAIO DE DECAIMENTO

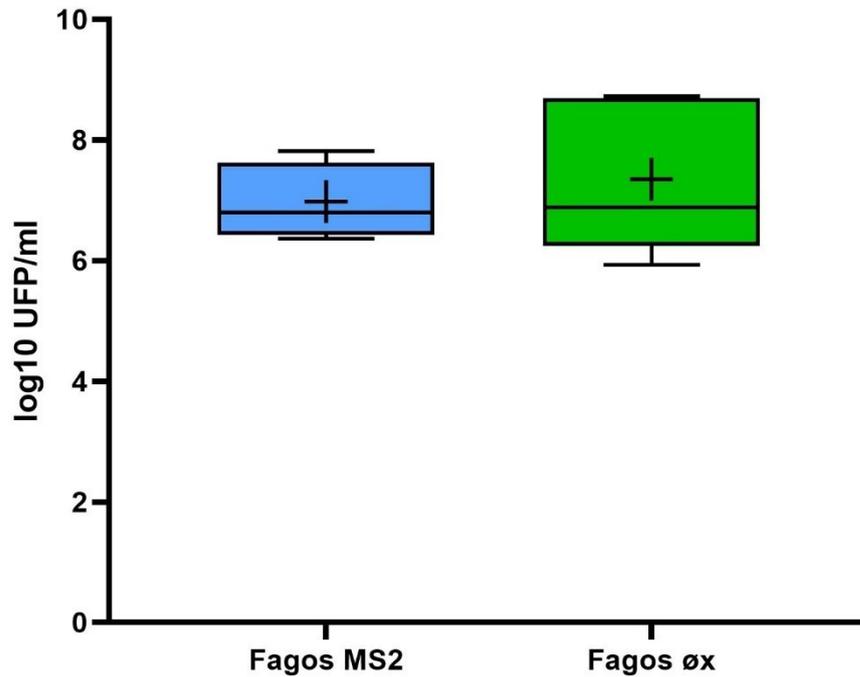
Para o ensaio de decaimento foram realizadas análises nos dias 29 e 31 de maio, 3, 5, 7, 12 e 14 de junho. As análises dos beakers de controle foram feitas com maior espaçamento, nos dias 29 de maio, 5 e 14 de junho. Na Figura 8 e 9 pode-se observar a distribuição dos dados em forma de *boxplot* com média, mediana, mínimo, máximo e quartis para comparações entre os grupos, onde constata-se que não há valores discrepantes. Os gráficos para as concentrações médias de *Escherichia coli* (A), *Enterococcus faecalis* (B), Fagos MS2 (C), Fagos øx (D) e seus respectivos controles encontram-se na Figura 10. É importante salientar que em todos os gráficos a concentração está representada em log<sub>10</sub> UFC/ml para todos os microrganismos, porém para os vírus utiliza-se log<sub>10</sub> UFP/ml. As duas unidades representam o número de microrganismos viáveis contados nas placas, a mudança da unidade é apenas uma convenção devido à forma como se apresentam e são lidos nas placas.

**Figura 8** – *Boxplot* das concentrações de *E. coli* e *E. faecalis*



Fonte: A autora (2024).

**Figura 9 - Boxplot das concentrações de Fagos MS2 e Fagos øx**



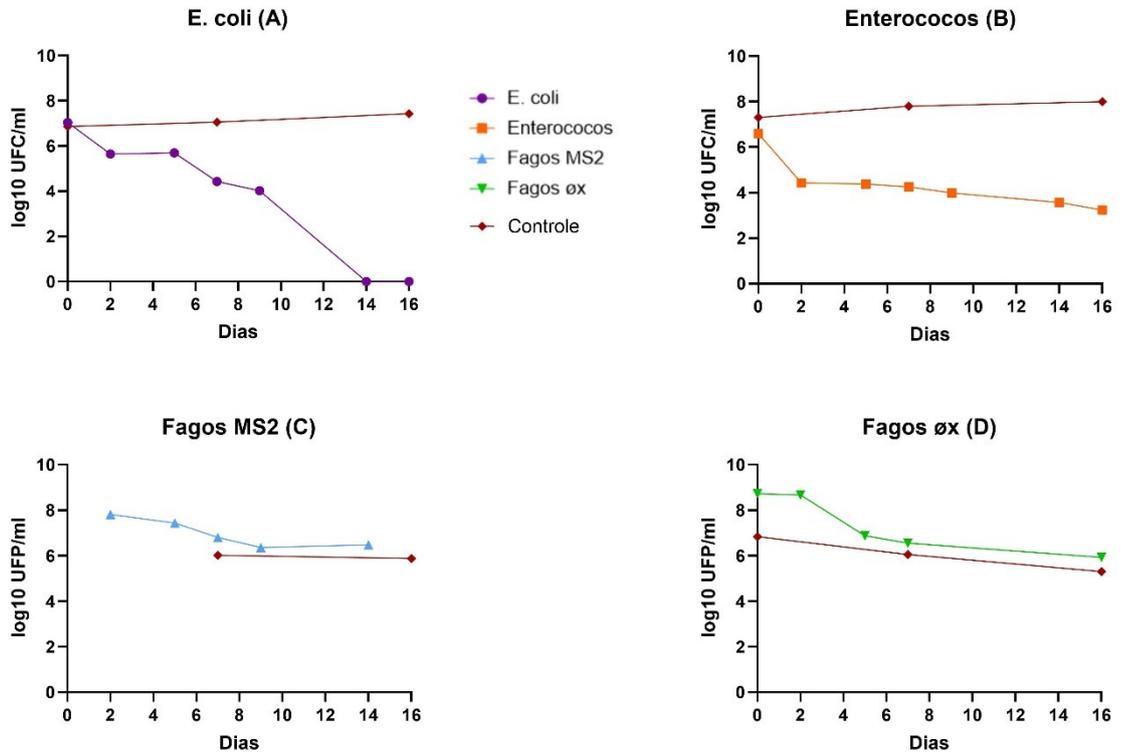
Fonte: A autora (2024).

O cálculo da taxa de decaimento ( $k$ ) foi realizado através da Equação 1.2, conhecida como Lei de Chick, assumindo que a cinética da reação de inativação das bactérias é de primeira ordem, mas já após integração (Von Sperling, 2007; Carneiro, 2014). Essa é uma Equação Geral utilizada normalmente para o decaimento de bactérias como coliformes e *E. coli*.

$$N(t) = N_0 e^{-kt} \quad (1.2)$$

Na qual:  $N(t)$  é a concentração de microrganismos por 100 ml (UFC/100ml) no tempo  $t$ ;  $N_0$  é a concentração inicial por 100ml (UFC/100ml);  $t$  é o tempo (dias);  $k$  é a taxa de decaimento ( $d^{-1}$ ) e  $e$  é a constante de Euler.

**Figura 10** – Gráficos das concentrações médias de cada microrganismo e seu controle nos dias de análise



Fonte: A autora (2024).

Após transformar as unidades multiplicando por 100 para obtê-las em UFC/100ml, os valores de  $k$  foram calculados utilizando valores do dia 0 ao dia 9, por ser o último dia onde foi identificada concentração de *E. coli*, como pode-se observar na Tabela 5.

**Tabela 5** – Cálculo da taxa de decaimento para cada microrganismo.

Ensaio de decaimento	
Microrganismo	Taxa de decaimento (k)
<i>E. coli</i>	0,77
Enterococos	0,67
Fagos MS2	0,42
Fagos øx-174	0,40

Fonte: A autora (2024).

Diante dos resultados apresentados, vemos que a taxa de decaimento é, do maior para o menor valor, *E. coli* > Enterococos > Fagos MS2 > Fagos øx-174, ou seja, a cada dia a *E. coli* foi o microrganismo que decaiu mais rapidamente, e os colifagos somáticos (øx) foram os mais lentos, corroborando com a teoria de que são melhores indicadores em água do mar. Até o uso do *E. faecalis* é mais interessante, visto que foram melhores indicadores de risco de adoecimento por contaminação fecal humana (EPA, 2023). Importante ressaltar que este resultado foi obtido em condições controladas, podendo ser afetado por fatores naturais comentados anteriormente.

Em 1978, Mancini fez um estudo com o tema “Estimativas numéricas de taxas de mortalidade de coliformes para várias condições”, onde, além de outras equações, formulou a Equação 1.3 com uma correção da Equação Geral para a temperatura (20°C, próxima a temperatura do ensaio realizado neste trabalho) e salinidade, indicando que o aumento da salinidade causaria uma maior taxa de mortalidade.

$$k^*(T) = K_{20} + 0,006 (\% \text{ água do mar}) \times 1,07^{(T-20)} \quad (1.3)$$

Na qual:  $k^*(t)$  é taxa de mortalidade na temperatura T;  $K_{20}$  é a taxa de mortalidade à 20°C; “% água do mar” é a porcentagem de água salgada da amostra; T é a temperatura (°C).

A água do mar possui em média 35 PSU (*Practical Salinity Unit*), valor utilizado como padrão para 100% de salinidade. Considerando que os valores de k obtidos anteriormente foram obtidos à 20°C e a água das amostras possuiu uma média de 29,12 PSU, a porcentagem para nossa análise seria de 83,20. Uma água com 50% de 35 PSU possuiria 17,5 PSU. Logo, temos os valores corrigidos para o decaimento dos organismos. Na Tabela 6 podemos observar que os valores corrigidos são ligeiramente maiores, ou seja, uma taxa de decaimento mais rápida.

**Tabela 6** – Cálculo da taxa de decaimento corrigida para cada microrganismo.

Ensaio de decaimento			
Microrganismo	Taxa de decaimento corrigida (k*)		
	50% de água do mar	<b>83,20% de água do mar</b>	100% de água do mar
E. coli	1,07	<b>1,27</b>	1,37
Enterococos	0,97	<b>1,17</b>	1,27
Fagos MS2	0,72	<b>0,91</b>	1,02
Fagos øx-174	0,70	<b>0,90</b>	1,00

Fonte: A autora (2024).

### 5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Iniciando as análises estatísticas, primeiramente entre os microrganismos e seus controles. Empregando os valores da Tabela 8 aplicou-se o teste ANOVA com o teste de *Brown-Forsythe* e determinou-se um valor de P maior que o valor de confiança, o que indica que a hipótese de que há homogeneidade de variâncias entre os valores não é descartada. Assim é possível aplicar o teste *t de Student* para comparação das médias entre cada bactéria e seu respectivo controle. O valor de P encontrado para a *E. coli* e seu controle; Enterococos e seu controle; e Fagos øx e seu controle foram maiores que o nível de significância de 0,05, sugerindo que não há diferença estatística entre as médias dos dois grupos. O grupo dos Fagos MS2 não foi analisado quanto ao controle com o teste *t de Student* por não possuir o valor de concentração do dia 0. No seu lugar foi utilizado um teste t não paramétrico comparando as médias dos dias 7 e 16, sendo a diferença entre elas estatisticamente insignificante, da mesma forma.

Além disso é importante evidenciar que os controles de bactérias aumentaram e os de vírus diminuíram em água destilada, reforçando que a proposição dos vírus como indicadores seria em água do mar.

**Tabela 7** – Médias das concentrações das bactérias, fagos e seus controles ao longo dos dias em log<sub>10</sub> UFC/ml (ou log<sub>10</sub> UFP/ml para os vírus)

Dias	<i>E. coli</i>	Controle	Enterococos	Controle	Fagos MS2	Controle	Fagos øx	Controle
0	7,037	6,864	6,599	7,308	4,517	-	8,722	6,839
2	5,644	-	4,431	-	7,809	-	8,925	-
5	5,696	-	4,379	-	7,868	-	5,162	-
7	4,432	7,058	4,256	7,797	6,708	6,017	6,554	6,058
9	4,022	-	3,991	-	6,366	-	-	-
14	0,000	-	3,568	-	6,483	-	-	-
16	0,000	7,429	3,236	7,997	-	5,878	5,933	5,308

Fonte: A autora (2024).

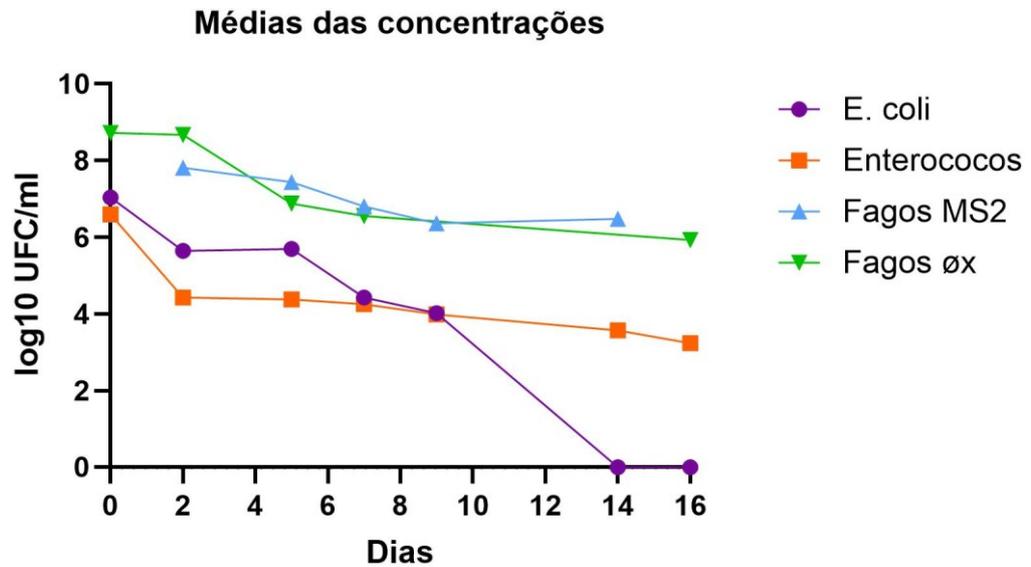
Posteriormente os testes tiveram o objetivo de analisar os grupos entre si, sem seus controles. O gráfico da Figura 11 apresenta as médias de cada microrganismo em cada dia de análise em log<sub>10</sub> UFC/ml. Importante ressaltar que os valores de *E. coli* dos dias 14 e 16 foram zero; portanto, não aparecem no gráfico em log<sub>10</sub>. Utilizou-se o teste ANOVA e obteve-se um valor de P de 0,0041, menor que o valor de confiança P de 0,05, indicando que deve existir diferença significativa entre as médias. Já o teste de *Tukey* entre *E. coli* e Enterococos; entre Enterococos e Fagos MS2; e entre Fagos MS2 e Fagos øx resultaram em valores de P maiores que 0,05, sugerindo que não há diferença significativa entre estes. Já entre *E. coli* e Fagos MS2; entre *E. coli* e Fagos øx; e entre Enterococos e Fagos øx; o valor foi menor que o intervalo de confiança adotado, sugerindo que há significativas diferenças entre os grupos, como podemos analisar na Tabela 9, com os valores menores que o valor de confiança em negrito.

**Tabela 8** – Valores-P do teste de *Tukey*

	<i>E. coli</i>	Enterococos	Fagos MS2	Fagos øx
<i>E. coli</i>	-	0,9451	<b>0,0293</b>	<b>0,0134</b>
Enterococos	0,9451	-	0,0819	<b>0,0395</b>
Fagos MS2	<b>0,0293</b>	0,0819	-	0,9867
Fagos øx	<b>0,0134</b>	<b>0,0395</b>	0,9867	-

Fonte: A autora (2024).

**Figura 11** – Gráficos das concentrações médias dos microrganismos nos dias de análise



Fonte: A autora (2024).

Do mesmo modo, analisou-se os grupos de controles entre si. Os resultados do teste ANOVA indicaram com valor de  $p < 0,05$  que há diferença significativa entre os grupos. O teste de *Tukey* indicou quais grupos seriam esses, no caso entre o grupo de Controle de Enterococos e o de Fagos MS2 e entre o Controle de *E. coli* e Fagos MS2. Era esperado que em água destilada os controles não fossem diferentes ou os de bactérias e de fagos fossem diferentes, o que não ocorreu totalmente.

Diante dos resultados apresentados, é possível sugerir que o decaimento dos bacteriófagos entre si e o das bactérias entre si são semelhantes, com o decaimento da *E. coli* sendo diferente estatisticamente do decaimento dos dois bacteriófagos e o do Enterococos apenas do øx.

#### 5.4 COMPARAÇÃO COM DADOS DO IMA

No ano de 2008, Gronewold e Wolpert testaram um modelo para relacionar as unidades de Número Mais Provável (NMP) e Unidade Formadora de Colônias (UFC). Apesar de desconsiderar fatores externos que possivelmente influenciariam no resultado, encontraram a relação da Equação 1.4.

$$\frac{13}{6} \times \frac{UFC}{ml} = \frac{NMP}{100 ml} \quad (1.4)$$

Logo, para realizar uma comparação com as amostras obtidas e analisadas pelo IMA, os valores limite de *Escherichia coli* da Resolução CONAMA N° 274/2000 para classificação foram convertidos como consta na Tabela 10.

**Tabela 9** – Conversão dos limites para *Escherichia coli* e Enterococos determinados pela Resolução CONAMA N° 274/2000

Classificação	Resolução CONAMA N° 274/2000			
	<i>E. coli</i>		Enterococos	
	NMP/100ml	UFC/ml	NMP/100ml	UFC/ml
Excelente	200	0,923	25	0,115
Muito boa	400	1,846	50	0,231
Satisfatória	800	3,692	100	0,462
Imprópria	2000	9,231	400	1,846

Fonte: Adaptado de Gronewold e Wolpert (2008).

As amostras coletadas nos dias 09 e 29 de maio foram analisadas e os resultados obtidos estão apresentados, em UFC/ml para bactérias e UFP/ml para os Fagos, na Tabela 11 a seguir.

**Tabela 10** – Concentrações obtidas nas análises das amostras dos Pontos 05 e 94.

	Ponto 05		Ponto 94
	Dia 09/05	Dia 09/05	Dia 29/05
<i>E. coli</i>	13	6	3400
Enterococos	ND*	ND*	100
Fagos MS2	300	7000	4506

(\*) Não Detectado. Fonte: A autora (2024).

Considerando as Tabelas 10 e 11, verifica-se que as concentrações de *E. coli* nos dias 09 e 29 de maio para os Pontos 05 e 94 encontram-se acima do limite da Resolução CONAMA N° 274/2000. Desconsiderando o fato de que são necessários os resultados das análises de cinco semanas anteriores e ao menos 20% das amostras fora dos limites “excelente”, “muito boa” ou “satisfatória” para ser considerada imprópria, ou se houverem outros fatores que contraindiquem o exercício da recreação de contato primário, as praias dos Pontos 05 e 94 estariam na categoria de “impróprias”, assim como o resultado da análise do IMA para um dia próximo, o dia 22 de maio de 2024, que foi de 65,24 UFC/ml após a conversão.

No dia 09 de maio para os dois pontos não foram identificados Enterococos na amostra coletada, então a praia seria classificada como “própria” e “excelente” para banho. Já no dia 29 de maio o Ponto 94 apresentou uma concentração de 100 UFC/ml, o que tornaria a praia

“imprópria”. Com relação aos colifagos F-RNA específicos (MS2) pode-se observar que os valores encontrados foram sempre maiores que os valores para bactérias, um dos motivos da proposição dos mesmos como indicadores, visto que devido a sua semelhança com outros vírus entéricos, a amostra demonstraria valores ainda mais indicativos de contaminação fecal.

Em relação as análises realizadas pelo IMA, como vê-se na Tabela 12, as concentrações variam bastante, mas a praia do Ponto 94 foi categorizada como “imprópria” em todo o período de janeiro a junho de 2024, juntamente com os anos de 2022 e 2023. Em 2021 foi categorizada como “própria” para banho por 8 vezes, sendo 6 dessas vezes de março a setembro, onde a temperatura se encontrava mais baixa do que no resto do ano, com exceção dos dias 20 de janeiro, 10 de março e 27 de dezembro que tiveram temperaturas de 27°C, 22°C e 21°C respectivamente. Outro possível fator para a boa qualidade da água foi que apenas um dia dos 8 havia chuva moderada e dois dias chuva fraca, tendo os outros chuva ausente. Já em 2020, ano do início da pandemia de COVID-19, outro fator que pode ter influenciado na diferença da qualidade da água em comparação aos outros anos, a praia foi caracterizada como “própria” por 10 vezes, sendo em momentos diferentes do ano de 2021, pelo mês de janeiro, início de fevereiro, um dia em outubro, dois em novembro e um em dezembro. As temperaturas variaram de 14 a 28°C nesse intervalo. Importante ressaltar que não foram feitas análises depois do dia 11 de março, voltando dia 2 de setembro de 2020.

Realizando uma comparação entre a estação do outono dos últimos quatro anos, com os valores apresentados na Tabela 12, pode-se observar que, ao fazer uma análise estatística de Pearson entre a temperatura e a concentração de *E. coli* obtida pelo IMA, a relação entre eles é fraca ou inexistente, o que nos confirma que a relação dos valores de concentração não dependerá apenas da temperatura, e sim de outros parâmetros como chuvas (Holcomb et al., 2020), velocidade e direção do vento.

**Tabela 11** – Valores obtidos das análises do IMA para meses de outono de 2021-2024

Data	<i>E. coli</i> (log <sub>10</sub> UFC/ml)	Temperatura (°C)
26/05/2021	2,10	13
28/04/2021	1,44	19
25/05/2022	16,86	17
27/04/2022	42,50	22
24/03/2022	15,91	24
31/05/2023	14,20	17
26/04/2023	111,67	20

Data	<i>E. coli</i> (log10 UFC/ml)	Temperatura (°C)
29/03/2023	91,68	23
20/03/2023	10,53	24
22/05/2024	65,24	18
24/04/2024	33,55	22
26/03/2024	2,97	21
Média	34,05	19,71
Desvio Padrão	36,94	3,24
Mínimo	1,44	13,00
Mediana	16,38	20,00
Máximo	111,67	24,00

Fonte: Adaptado de IMA.

De acordo com Brondani (2015), as análises de colifagos podem ser alteradas de acordo com diferentes períodos do ano, tanto pelo regime de chuvas, quanto pelas temperaturas. O mais comum é encontrar menor concentração destes a menores temperaturas, mas há estudos contrários como o de Nkwe et al. (2015) para água potável, na África do Sul, mostrando que os parâmetros ambientais não devem ser analisados isoladamente.

No artigo de McMinn, Ashbolt & Korajkic (2017) foram analisados dados de diversos estudos, e determinaram que foram encontradas em água do mar concentrações próximas a 0,0187 log10 UFC/ml para *E. coli* e 0,0203 log10 UFC/ml para Enterococos, valores bastante diferentes dos valores de *E. coli* encontrados pelo IMA e valores dos dois organismos encontrados nas amostras deste trabalho. Também destacam que colifagos somáticos foram encontrados na faixa de 0,0166 UFP/ml, e F-específicos na média de 0,0089 UFP/ml, valores também muito inferiores aos analisados anteriormente neste trabalho. Este fato pode nos mostrar como o local estudado, os costumes dos habitantes e o clima podem modificar as concentrações dos microrganismos na água do mar, como observado por Schenkel (2020), e também sugere que estes indicadores possam ser utilizados em Florianópolis.

## 6 CONCLUSÃO

A necessidade de investigar e propor aprimoramentos nos critérios de balneabilidade no Brasil devido à alta densidade nas regiões costeiras, às mudanças climáticas e o aumento do aparecimento de doenças virais é de uma importância extrema. Explorar a eficácia de indicadores microbiológicos alternativos como bacteriófagos, a fim de aprimorar a segurança da saúde pública é uma das possibilidades para melhorar este cenário. Os indicadores atuais sozinhos não têm inespecificidade com o hospedeiro, não são exclusivamente encontrados em humanos, mas também em outros animais homeotérmicos, não são relacionados somente à poluição fecal e tem comportamento bastante diferenciado a depender da variação das condições ambientais, como maiores ou menores temperaturas.

Através dos métodos utilizados, a técnica de cultivo em placas de ágar para as bactérias (*spread plate method* ou método de espalhamento) e a de duplo ágar de Adams de 1959 para os bacteriófagos, foram obtidos resultados em 24 horas e 48 horas de cada análise, sendo estes confiáveis, rápidos e facilmente reproduzidos.

A partir deste trabalho, temos que os resultados de taxa de decaimento das bactérias analisadas foi maior que o dos bacteriófagos em água do mar. Além disso foram encontrados valores de *E. faecalis* que tornariam as águas da Beira Mar e da Praia do Meio “próprias” para banho, enquanto a *E. coli* apontava que “estariam impróprias”. Análises do IMA indicaram poucos dias em que a praia da Beira Mar estava “própria” para banho, e apesar das suposições de que seria devido à falta de chuvas e temperaturas mais baixas, seria interessante ter outros indicadores para ter a certeza de que estavam “próprias”.

Os resultados obtidos levam à ideia do uso de mais de um indicador microbiológico concomitantemente para determinação da balneabilidade, visto que os indicadores atuais, os coliformes e *Escherichia coli*, não demonstram ser suficientes, sendo os bacteriófagos mais resistentes a variações de temperatura, pH e principalmente salinidade, apesar de pecar em outros quesitos como a dificuldade de medição devido à baixa densidade nos corpos d’água normalmente enfrentada.

Para futuros estudos seria interessante realizar o ensaio, porém em outras temperaturas, porcentagem de salinidade e à radiação solar, fatores que inativam os microrganismos estudados. Seria interessante realizar também com outros vírus, como os Adenovírus e outros bacteriófagos promissores.

Notou-se através das pesquisas que uma das maiores dificuldades é a falta de padronização do método de análise, gerando estudos com muitas variáveis diferentes e difíceis de comparar, sendo interessante realizar o ensaio da mesma forma que este trabalho.

## REFERÊNCIAS

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's Climate Classification Map For Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 711-728, 1 dez. 2013.

ARREDONDO-HERNANDEZ, L. J. R.; DIAZ-AVALOS, C.; LOPEZ-VIDAL, Y.; CASTILLO-ROJAS, G.; MAZARI-HIRIART, M. FRNA Bacteriophages as Viral Indicators of Faecal Contamination in Mexican Tropical Aquatic Systems. **PLoS ONE (Public Library of Science)**, [S.L.], v. 12, n. 1, 23 jan. 2017.

BAGNATO, V. S.; RODRIGUES, V. Análogo mecânico para condutividade elétrica dos metais: efeito da temperatura. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 35-39, 19 jul. 2006. FapUNIFESP (SciELO)

BALLESTÉ, E.; BLANCH, A. R.; MENDEZ, J.; SALA-COMORERA, L.; MAUNULA, L.; MONTEIRO, S.; FARNLEITNER, A. H.; TIEHM, A.; JOFRE, J.; GARCÍA-ALJARO, C. Bacteriophages Are Good Estimators of Human Viruses Present in Water, **Frontiers in Microbiology**, [S.L.], v. 12, 3 maio 2021.

BALLESTÉ, E.; BLANCH, N. R.; MUNIESA, M.; GARCÍA-ALJARO, C.; RODRÍGUEZ-RUBIO, L.; MARTÍN-DÍAZ, J.; PASCUAL-BENITO, M.; JOFRE, J. Bacteriophages in sewage: abundance, roles, and applications. **Fems Microbes**, [S.L.], v. 3, 2022. Oxford University Press (OUP).

BELANDI, Caio. IBGE atualiza municípios de fronteira e defrontantes com o mar devido a mudanças de limites. **Agência de Notícias IBGE**, Rio de Janeiro, 6 de julho de 2021. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/31090-ibge-atualiza-municipios-de-fronteira-e-defrontantes-com-o-mar-devido-a-mudancas-de-limites>. Acesso em: 11 abr. 2024.

BOEHM, A.B.; GRAHAM, K.E.; JENNINGS, W.C. Can We Swim Yet? Systematic Review, Meta-Analysis, and Risk Assessment of Aging Sewage in Surface Waters. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 52, n. 17, p. 9634-9645, 6 ago. 2018. American Chemical Society (ACS)

BRADFORD, S. A.; TADASSA, Y. F.; JIN, Y. Transport of Coliphage in the Presence and Absence of Manure Suspension. **Journal of Environment Quality**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 1692–1701, set. 2006.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 jan. 2001. Seção 1, p. 70-71. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2018/01/RESOLU%C3%87%C3%83O-CONAMA-n%C2%BA-274-de-29-de-novembro-de-2000.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2024.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 jan. 2001. Seção 1, p. 70-71. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2018/01/RESOLU%C3%87%C3%83O-CONAMA-n%C2%BA-274-de-29-de-novembro-de-2000.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2024.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res\\_conama\\_357\\_2005\\_classificacao\\_corpos\\_agua\\_rtfcd\\_a\\_ltrd\\_res\\_393\\_2007\\_397\\_2008\\_410\\_2009\\_430\\_2011.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_a_ltrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf). Acesso em: 25 mar. 2024.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução CONAMA nº 357, de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 maio 2011. Seção 1, p. 81. Disponível em: [https://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/RE%20CONAMA%20403-2011\\_Lancamento%20de%20Efluentes.pdf](https://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/RE%20CONAMA%20403-2011_Lancamento%20de%20Efluentes.pdf). Acesso em: 25 jun. 2024. Acesso em: 25 mar. 2024.

BRASIL. FUNASA Fundação Nacional de Saúde. **Manual Prático de Análise de Água**. 4. ed. Brasília: Funasa, 2013. Disponível em: [http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files\\_mf/manual\\_pratico\\_de\\_analise\\_de\\_agua\\_2.pdf](http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/manual_pratico_de_analise_de_agua_2.pdf). Acesso em: 16 abr.2024.

BRASIL. Lei nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 jan. 1997. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/19433.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19433.htm). Acesso em: 25 mar. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dda/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 25 mar. 2024.

BRONDANI, Greice Carvalho. **Identificação das fontes de contaminação fecal nas águas superficiais do Rio Tejo**. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética Molecular e Biomedicina, Laboratório de Análises Instituto Superior Técnico, Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2015.

BURBANO-ROSETO, Edith Mariela. **Frequência e diversidade de colifagos somáticos isolados de amostras de água do mar, plâncton e bivalves da Baixada Santista, canal de São Sebastião e Ubatuba**. 155 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CALATRAVA, Elizabeth. Other Streptococcus species and Enterococcus. In: REZAEI, Nima. **Encyclopedia of Infection and Immunity**, 1ª ed. Irã: Elsevier, 2022. Cap. 3, p. 529-541.

CARNEIRO, Marcos Tavares. **Estimação de decaimento de Escherichia coli como indicador de poluição no ambiente marinho tropical**. Dissertação (Doutorado em Sistemas de Gestão Sustentáveis) - Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia, Niterói, 2020.

CASTRO, Hilda Maria de. **Efeito da radiação solar e da salinidade sobre o crescimento de Escherichia coli**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

CLEAN WATER TEAM (CWT) 2004. Electrical conductivity/salinity Fact Sheet 3.1.3.0, The Clean Water Team Guidance Compendium for Watershed, Monitoring and Assessment. Sacramento, CA, EUA. 27 abr. 2004. Disponível em: [https://www.waterboards.ca.gov/water\\_issues/programs/swamp/docs/cwt/guidance/3130en.pdf](https://www.waterboards.ca.gov/water_issues/programs/swamp/docs/cwt/guidance/3130en.pdf). Acesso em: 18 jun. 2024.

ESCHERICH T.; BETTELHEIM, K. S. **The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884**. University of Chicago. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 11, n. 2, 1989. EUA. Environmental Protection Agency (EPA). Capítulo 5.11 Fecal Bacteria. Disponível em: <https://archive.epa.gov/water/archive/web/html/vms511.html>. Acesso em: 20 mar. 2024.

EUA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Field measurement of ORP (Oxidation-Reduction Potential)**. Washington, D.C., 2017. Disponível em: [https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-07/documents/field\\_measurement\\_of\\_orp113\\_af.r2.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-07/documents/field_measurement_of_orp113_af.r2.pdf). Acesso em: 20 jun. 2024.

EUA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Office of Water, Office of Science and Technology, Health and Ecological Criteria Division. **Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality**. Washington, D.C., 17 abr. 2015. Disponível em: [https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-07/documents/review\\_of\\_coliphages\\_as\\_possible\\_indicators\\_of\\_fecal\\_contamination\\_for\\_ambient\\_water\\_quality.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-07/documents/review_of_coliphages_as_possible_indicators_of_fecal_contamination_for_ambient_water_quality.pdf). Acesso em: 23 mar. 2024.

EUA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Report on the 2nd Five-Year Review of EPA's Recreational Water Quality Criteria**. 2023. Disponível em: <https://www.epa.gov/system/files/documents/2023-05/2023-5year-review-rwqc-report.pdf>.

Acesso em: 20 jun. 2024.

EUA. U.S. GEOLOGICAL SURVEY (USGS), Water Science School. **Saline water and salinity**. 11 jun. 2018. Disponível em: <https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/saline-water-and-salinity>. Acesso em: 18 jun. 2024.

FERNANDES, Kayo C. B. Detecção e quantificação de contaminação fecal hospedeiro-específico em águas destinadas ao abastecimento público. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2015.

FLORIANÓPOLIS. Secretaria Municipal de Habitação e Saneamento. Prefeitura Municipal de Florianópolis. **Revisão Plano Municipal Integrado de Saneamento Básico**. Florianópolis: Prefeitura Municipal de Florianópolis, 2021. Disponível em: [https://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/29\\_01\\_2021\\_11.21.18.389022061182b941b3d6d84046750119.pdf](https://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/29_01_2021_11.21.18.389022061182b941b3d6d84046750119.pdf). Acesso em: 20 mar. 2024.

FORSYTHE, Stephen. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, RS, 2013.

FRAGOSO JR., C. R.; TUCCI, C. E. M.; COLLISCHONN W.; MARQUES, D. M. L. da M. **Simulação de eutrofização em lagos rasos II: Sistema do Taim (RS)**. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, Porto Alegre, v. 12, n. 4, p. 37-48, out./dez. 2007.

FURTADO, João Salvador. **Indicadores de Sustentabilidade e Governança**. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, São Paulo, SP, v. 2, n. 1, p. 121-188, fev. 2009.

GLOBAL WATER PARTNERSHIP, Technical Advisory Committee (TAC). **Integrated Water Resources Management**. Stockholm: Global water partnership, Estocolmo, Suécia, 2000. p. 22 Disponível em: <https://www.gwp.org/globalassets/global/toolbox/publications/background-papers/04-integrated-water-resources-management-2000-english.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2024.

GORCHEV, H.G.; OZOLINS, G. **Guidelines for drinking-water quality**. *WHO chronicle*, v. 38, p. 104–108, 2011.

GRABOW, WOK. **Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water**. *Water SA*, Johannesburg, v. 27, n. 2, p. 251-268, abr. 2001.

GRONEWOLD, A. D.; WOLPERT, R. L. **Modeling the relationship between most probable number (MPN) and colony-forming unit (CFU) estimates of fecal coliform concentration**. *Water Research*, v. 42, n. 13, p. 3327-3334, jul. 2008.

HARTARD, C.; RIVET, R.; BANAS, S.; GANTZER, C. **Occurrence of and sequence variation among F-specific RNA bacteriophage subgroups in feces and wastewater of urban and animal origins**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, p. 6505–6515, 2015.

HAVELAAR, A.H.; POT-HOGEBOOM, W.M. **F-specific RNA-bacteriophages as model viruses in water hygiene: ecological aspects**. *Water Science and Technology*, v. 20, n. 11/12, p. 399-407, 1988.

HOLCOMB, D. A.; STEWART, J. R. **Microbial Indicators of Fecal Pollution: Recent Progress and Challenges in Assessing Water Quality**. *Current Environmental Health Reports*, v. 7, p. 311-324, 2020.

HUI, Eric Ka-Wai. **Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases**. *Microbes and Infection*, v. 8, p. 905-916. mar. 2006.

HURST, C. J.; CRAWFORD, R. L.; MILLS, A. L.; GARLAND, J. L.; STETZENBACH, L. D.; LIPSON, D. A. **Manual of environmental microbiology**, 3<sup>a</sup> edição. *American Society for Microbiology Press*, Washington, D.C., 2007.

IMA. **Balneabilidade, Mapa e Relatórios**. Florianópolis, SC. Disponível em: <https://balneabilidade.ima.sc.gov.br/>. Acesso em: 11 abr. 2024.

IPCC, ABRAM, N.; GATTUSO, J.-P.; PRAKASH, A.; CHENG, L.; CHIDICHIMO, M.P.; CRATE, S.; ENOMOTO, H.; GARSCHAGEN, M.; GRUBER, N.; HARPER, S.; HOLLAND, E.; KUDELA, R.M.; RICE, J.; STEFFEN, K.; VON SCHUCKMANN, K. **Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate**. *Cambridge University Press*, Cambridge, Reino Unido e Nova York, NY, USA. 2019. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/srocc/chapter/chapter-1-framing-and-context-of-the-report/>. Acesso em: 20 mar. 2024.

ISO 10705-1. Qualidade da água - Detecção e enumeração de bacteriófagos - Parte 1: Enumeração de bacteriófagos RNA F-específicos. Genebra: *International Organization for Standardization*, 1995.

ISO 10705-2. Qualidade da água - Detecção e enumeração de bacteriófagos - Parte 2: Enumeração de colifagos somáticos. Genebra: *International Organization for Standardization*, 2000.

JOFRE, J. **Indicators of Waterborne Enteric Viruses**. Em: *Human Viruses in Water Perspectives in Medical Virology*; BOSCH, A; 1ª ed. v. 17, p. 227-249. Amsterdam: *Elsevier*, 2007.

JOFRE, J.; LUCENA, F.; BLANCH A. R. **Coliphages as a complementary tool to improve the management of urban wastewater treatments and minimize health risks in receiving waters**. *Water*, v. 13, n. 8, p. 1110, 2021.

JOFRE, J.; LUCENA, F.; BLANCH A. R.; MUNIESA M. **Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources**. Universidade de Barcelona, Barcelona, Espanha: *Water*, v. 8, n. 5, p. 199, 2016.

KHAN ACADEMY. **Análise de variância (ANOVA)**. Disponível em: <https://pt.khanacademy.org/math/statistics-probability/analysis-of-variance-anova-library>. Acesso em: 18 jun. 2024.

LI, E.; SALEEM, F.; EDGE, T.A.; SCHELLHORN, H.E. **Biological Indicators for Fecal Pollution Detection and Source Tracking: A Review.** *Processes*, 2021.

MANCINI, J.L. **Numerical estimates of coliform mortality rates under various conditions.** *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 50, n. 11, p. 2477-2484, 1978.

MCMINN, B.R.; ASHBOLT, N.J.; KORAJKIC, A. **Bacteriophages as indicators of faecal pollution and enteric virus removal.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 65, n. 1, p. 11-26, jul. 2017.

MUNIESA, M.; LUCENA, F.; JOFRE, J. **Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment.** *Journal of Applied Microbiology*, p. 402–409, 1999.

NASA, Sea Surface Salinity from Space. **Overview:** introduction. Disponível em: <https://salinity.oceansciences.org/overview.htm>. Acesso em: 19 jun. 2024.

NASCIMENTO, V. S.; LAPA, K. R.; GOMES, C. H. A. M.; GRAY, M.; SILVA, G.; GARBOSSA, L. H. P.; SUPLICY, F. M.; MELO, C. M. R. **Filtration and biodeposition rates of Crassostrea oysters for southern Brazilian waters.** *Regional Studies in Marine Science*, v. 56, 2022.

NKWE, K. I.; ATEBA, C. N.; SITHEBE, N. P.; BEZUIDENHOUT, C. C. **Enumeration of Somatic and F-RNA Phages as an Indicator of Fecal Contamination in Potable Water from Rural Areas of the North West Province.** *Pathogens*, v. 4, n. 3, p. 503-512. sep. 2015.

NOZAKI, C. T.; MARCONDES, M. A.; LOPES, F. A.; DOS SANTOS, K. F.; LARIZZATTI, P. S. da C. **Comportamento temporal de oxigênio dissolvido e pH nos rios e córregos urbanos.** *Atas de saúde ambiental (ASA)*, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 29-44, jan./abr. 2014.

OCEAN OBSERVATORIES INITIATIVE (OOI). **Data Product Specification for Salinity.** Documento técnico, Washington, D.C., EUA. 2023. Disponível em:

[https://oceanobservatories.org/wp-content/uploads/2023/09/1341-00040\\_Data\\_Product\\_SPEC\\_PRACSAL\\_OOI.pdf](https://oceanobservatories.org/wp-content/uploads/2023/09/1341-00040_Data_Product_SPEC_PRACSAL_OOI.pdf). Acesso em: 19 jun. 2024.

ONU, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. **World Population Prospects 2022: Summary of Results**. Nova York, NY, 2022.

RUSYDI, A.F. **Correlation between conductivity and total dissolved solid in various types of water: A review**. Em: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 118, 2018.

SANTA CATARINA. Conselho Estadual de Meio Ambiente. Resolução nº 181, de 02 de agosto de 2021. Estabelece as diretrizes para os padrões de lançamento de efluentes. **Diário Oficial do Estado de Santa Catarina**, Florianópolis, SC, 9 set. 2021. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=420108>. Acesso em: 26 mar. 2024.

SANTA CATARINA. Conselho Estadual de Meio Ambiente. Resolução nº 182, de 6 de agosto de 2021. Estabelece as diretrizes para os padrões de lançamento de esgotos domésticos de sistemas de tratamento públicos e privados. **Diário Oficial do Estado de Santa Catarina**, Florianópolis, SC, 6 ago. 2021. Disponível em: [https://www.casan.com.br/ckfinder/userfiles/files/Documentos\\_Download/RESOLU%C3%87%C3%83O%20CONSEMA%20N%C2%BA%20182%20-%20padr%C3%B5es%20de%20lan%C3%A7amento%20de%20esgotos%20sanit%C3%A1rios%20-%20assinada.pdf](https://www.casan.com.br/ckfinder/userfiles/files/Documentos_Download/RESOLU%C3%87%C3%83O%20CONSEMA%20N%C2%BA%20182%20-%20padr%C3%B5es%20de%20lan%C3%A7amento%20de%20esgotos%20sanit%C3%A1rios%20-%20assinada.pdf). Acesso em: 26 mar. 2024.

SANTA CATARINA. Lei nº 14.675, de 13 de abril de 2009. Institui o Código Estadual do Meio Ambiente e estabelece outras providências. **Diário Oficial do Estado de Santa Catarina**, Florianópolis, SC, 13 abr. 2009. Disponível em: [http://leis.alesc.sc.gov.br/html/2009/14675\\_2009\\_Lei.html](http://leis.alesc.sc.gov.br/html/2009/14675_2009_Lei.html). Acesso em: 26 mar. 2024.

SAVITCHCHEVA, O.; OKABE, S. **Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen**

**monitoring and future application perspectives.** *Water Research*, v. 40, n. 13, p. 2463-2476, jul. 2006.

SCHENKEL, Guilherme C. **Avaliação do uso de colifagos como indicadores microbiológicos em água e esgoto em estações de tratamento no município de Novo Hamburgo – RS**, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, 2020.

SINTON, L. W.; FINLAY, R. K.; LYNCH, P. A. **Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater.** *Applied and environmental microbiology*, v. 65, n. 8, p. 3605-3613, 1999.

SINTON, L. W.; HALL, C. H.; LYNCH, P. A.; DAVIES-COLLEY, R. J. **Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters.** *Applied and environmental microbiology*, v. 68, n. 3, p. 1122-1131, mar. 2002.

SOLO-GABRIELE, H. M.; WOLFERT, M. A.; DESMARAIS, T. R.; PALMER, C. J. **Sources of Escherichia coli in a coastal subtropical environment.** *Applied and environmental microbiology*, v. 66, n. 1, p. 230-237, 2000.

SOUZA, R. V. de; NOVAES, A. L. T.; GARBOSSA, L. H. P.; RUPP, G. S. **Variações de salinidade nas Baías Norte e Sul da Ilha de Santa Catarina: implicações para o cultivo de moluscos bivalves.** *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, SC, v. 29, n. 3, p. 45-48, 2016.

TEMPLETON, M. R.; ANDREWS, R. C.; HOFMANN, R. **Inactivation of particle-associated viral surrogates by ultraviolet light.** *Water Research*, v. 39, n. 15, p. 3487-3500, 2005.

THEITLER, D. J.; NASSER, A.; GERCHMAN, Y.; KRIBUS, A.; MAMANE, H. **Synergistic effect of heat and solar UV on DNA damage and water disinfection of E. coli and bacteriophage MS2.** *Journal of Water & Health*, v. 10, n. 4, p. 605-618, 10 dez. 2012.

UNESCO, WORLD WATER ASSESSMENT PROGRAMME. **Relatório Mundial das Nações Unidas sobre o Desenvolvimento dos Recursos Hídricos 2024: água para a prosperidade e a paz; fatos, dados e exemplos de ações**, Itália, 2024.

VIEIRA, R. H. S. F.; SILVA, P. R. F. G. da; LEHUGEUR, L. G. de O.; SOUSA, O. V. de. **Colimetria da água da praia da Barra do Ceará - Fortaleza - Ceará**. *Arquivos de Ciências do Mar*, Fortaleza, v. 32, 1999, p. 119-122.

VON SPERLING, M. **Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal**. Biological Wastewater Treatment Series. London: *IWA Publishing*, v.1, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for drinking-water quality**, 4ed. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/352532/9789240045064-eng.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2024.

YSI INC./XYLEM INC. **ORP/Redox**. 2024. Disponível em: <https://www.yxi.com/parameters/orp-redox>. Acesso em: 18 jun. 2024.