

**Colheita de amostra:** conforme descrito em Sabino *et al.* (2011): Colheita de uma amostra composta de areia. Recolha de areia de vários pontos ao longo da zona seca do areal da praia. Gera-se assim uma única amostra que representa todos os pontos de recolha ao longo da praia.

**Frequência:** Uma colheita antes da época balnear e uma vez por mês durante a época balnear. Maio a setembro, coincidindo com a colheita de água, para a época balnear que decorre entre Junho e Setembro.

**Transporte:** Refrigerado

**Métodos analíticos:**

#### **Fungos – Fungos totais**

Agitar 40g de areia (peso bruto, não peso seco) com 40 mL de água destilada estéril, por agitação orbital, durante 30 min a 100 rpm. Inocular o sobrenadante por espalhamento (0,2 mL) em triplicado, em placas de meio de Malte com cloranfenicol. Incubar as placas durante 5 dias a  $27,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Contar as colónias das 3 placas, calcular a média e multiplicar por 5, para perfazer contagem por mL. O resultado é apresentado em unidades formadoras de colónias (CFU) por grama de areia (1 mL = 1 g) - Sabino *et al.* (2011).

#### **Bactérias – Enterococos e *E. coli***

Pesagem de 10g de areia para 100 mL de água destilada estéril. Após a agitação manual por 2 minutos procede-se à pesquisa de Enterococos por Número Mais Provável (NMP) utilizando o meio de cultura Enterolert<sup>®</sup> Quanti-Tray<sup>®</sup> da IDEXX<sup>™</sup> (IDEXX, Westbrook, MN, EUA). Analisar 10 mL do Sobrenadante e perfazer o volume até 100 mL com água destilada estéril. (Verificar as instruções do fabricante para amostras de água). Alternativamente pode utilizar-se o método de filtração por membrana (ISO 7899-2), filtrando 10 mL do sobrenadante. (Boehm *et al.*, 2009). Sabino *et al.* (2011), descreve outra metodologia: Pesar 50g de areia para 500 mL de água destilada estéril. Após a agitação mecânica, por rotação vertical a 100 rpm por 30 min, procede-se da mesma forma que na metodologia descrita anteriormente. Esta abordagem pode ser usada para ambos os métodos (NMP e filtração em membrana).

Em ambas as metodologias, os resultados são por grama de areia, portanto não são necessários cálculos.

Para a pesquisa de *E. coli*, seguir o mesmo procedimento substituindo o meio de cultura Enterolert<sup>®</sup> pelo meio de cultura Colilert<sup>®</sup> (o resultado do teste já é por grama de areia bruta) ou utilizar SIREN rapid pathogen test kit<sup>®</sup> (MolEndoTech, LTD, Brixham, UK).

**Controlo de Qualidade:** O laboratório deve ter um procedimento de controlo de qualidade interno robusto. É fortemente recomendada a participação num esquema de avaliação externa da qualidade em análises microbiológicas de areia ([PNAEQ](#), por exemplo).

**Classificação:** Considerando a distribuição não normal das contagens de fungos ao longo do tempo, o uso de desvios padrão e médias geométricas não é recomendado. Uma boa alternativa é classificar a praia em “conforme” ou “não conforme”, permitindo que um determinado número de resultados esteja fora dos “limites” por flutuação natural da microbiota: Para fungos, 20% de taxa de rejeição, por exemplo. Considerando os resultados de Brandão *et al.* (2021) definiu-se um valor de orientação de 89 UFC / g de fungos totais na areia, sendo o limite de

rejeição baseado no percentil 80%, de 490 UFC / g. Isso significa que durante um período de amostragem, 20% das amostras não deverão apresentar valores acima dos 490 UFC / g.

Para enterococos, o valor declarado pela OMS (*in press*) reflete teoricamente o mesmo efeito sobre a saúde que os limites de água. Portanto, deve-se ter atenção a amostras que excedam o valor de 60 UFC / g ou NMP / g de areia. Este valor é considerado provisório, por ser o resultado de um cálculo de avaliação de risco por exposição (QMRA) que não contempla a flora nativa de uma praia, mas supostamente, quando excedido pode ter expressão na saúde dos utilizadores das praias. A validação dos pressupostos dos cálculos depende de futuros estudos epidemiológicos.

Em caso de monitorização, *E. coli* serve de indicador de contaminação fecal adicional, com um valor de referência de 25 UFC/g (Sabino *et al.* 2011).

### Referências bibliográficas:

Boehm, A. B., Griffith, J., McGee, C., Edge, T. A., Solo-Gabriele, H. M., Whitman, R., Cao, Y., Getrich, M., Jay, J. A., Ferguson, D., Goodwin, K. D., Lee, C. M., Madison, M., Weisberg, S. B. (2009). Faecal indicator bacteria enumeration in beach sand: a comparison study of extraction methods in medium to coarse sands. *Journal of applied microbiology. J Appl Microbiol.* 107(5), 1740–1750. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04440.x>

Brandão, J., Gangneux, J.P., Arikan-Akdagli, S., Barac, A., Bostanaru, A.C., Brito, S., Bull, M., Çerikçioğlu, N., Chapman, B., Efstratiou, M. A., Ergin, Ç., Frenkel, M., Gitto, A., Gonçalves, C.I., Guégan, H., Gunde-Cimerman, N., Güran, M., Irinyi, L., Jonikaitè, E., Katarzytè, M., Klingspor, L., Mares, M., Meijer, W.G., Melchers, W.J.G., Meletiadis, J., Meyer, W., Nastasa, V., Novak Babič, M., Ogunc, D., Ozhak, B., Prigitano, A., Ranque, S., Rusu, R.O., Sabino, R., Sampaio, A., Silva, S., Stephens, J.H., Tehupeiory-Kooreman, M., Tortorano, A.M., Velegraki, A., Veríssimo, C., Wunderlich, G.C., Segal, E. (2021). Mycosands: Fungal diversity and abundance in beach sand and recreational waters - relevance to human health. *Sci. Total Environ.* 781, 146598.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146598>

International Organization for Standardization. (2000b). Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci — Part 2: Membrane filtration method (ISO Standard No. 7899-2). <https://www.iso.org/standard/14854.html>

Sabino, R., Veríssimo, C., Cunha, M. A., Wergikoski, B., Ferreira, F. C., Rodrigues, R., Parada, H., Falcão, L., Rosado, L., Pinheiro, C., Paixão, E., Brandão, J. (2011). Pathogenic fungi: an unacknowledged risk at coastal resorts? New insights on microbiological sand quality in Portugal. *Mar Pollut Bull.* 62(7), 1506–1511. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.008>