

**Sampling:** described in Sabino *et al.* (2011) - compositing one sample by grabbing sand from several places along the supratidal area of the beach to generate only one sample containing all the grabbing points along the beach.

**Frequency:** One sampling event before the bathing season and once a month during the bathing season. May to September, coinciding with water sampling, for a bathing season running between June and September.

**Transport:** Refrigerated

**Analytical methods:**

#### **Fungi – All fungi**

40g of crude sand (not dry weight) are extracted with 40 mL of sterile distilled water by orbital shaking for 30 min at 100 rpm and the extract is then plated (0.2 mL) in triplicates on Malt agar/Potato dextrose agar with chloramphenicol. Plates are incubated for 5 days at  $27.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Count the colonies and the results are given in colony-forming units (CFU) per gram of crude sand (equivalent), as mean numbers of each triplicate multiplied by 5 (0.2 mL X 5=1 mL so the average of the triplets needs to be multiplied by 5 to obtain the number of CFU/g of sand) - Sabino *et al.* (2011).

#### **Bacteria – Enterococci and *E. coli***

Extraction of 10g of sand with 100 mL of distilled water shaking by hand for 2 mins, followed by analyses using Quanti-Tray<sup>®</sup> systems from IDEXX<sup>™</sup> (IDEXX, Westbrook, MN, USA) to determine enterococci Most Probable Number (MPN) Enterolert<sup>®</sup> on 10 mL of the eluent, according to the manufacturer's instructions for water samples. Alternatively, apply the membrane filtration method used for water quality (ISO 7899-2) (Boehm *et al.* 2009) to the eluent. Sabino *et al.* 2011 describes 50g of sand in 500g of distilled water shaking by vertical rotation at 100 rpm for 30 mins. This approach can be applied both to MPN and membrane filtration method. The results of these tests are per gram of crude sand, so no calculations are necessary. For *E. coli*, follow the same procedure replacing Enterolert<sup>®</sup> by Colilert<sup>®</sup> on 10 mL of the eluent (result of test is per gram of crude sand – no calculations necessary) or use SIREN rapid pathogen test kit<sup>®</sup> (MolEndoTech, LTD, Brixham, UK).

**Quality control:** Participation in a sand microbial analysis quality assessment scheme is highly recommended (e.g., [PNAEQ](#)).

**Classification:** Considering the non-normal distribution of fungal counts along time, using standard deviations and geometric means is not advised. A good alternative is to classify a beach as compliant or not compliant, allowing a certain number of results to fail, in case of ordinary microbiota fluctuation: 20% of rejection rate, for example, which is not unreasonable, in case of the fungi, considering the results of Brandão *et al.* (2021). This would represent a guidance value of 89 CFU/g of total fungi in sand but a rejection limit of the 80% percentile, which is 420 CFU/g for coastal beaches and 1130 CFU/g for inland beaches.

For enterococci, the value stated in WHO (in press) theoretically reflects the same health effect of water thresholds. Therefore, care should be taken in samples exceeding the value of 60 CFU/g or NMP/g of sand. This value is considered provisional as it is the result of a Quantitative Microbial Risk Assessment calculation (QMRA), which does not contemplate the

native flora of a beach. Epidemiological studies should be run in order to confirm the validity of assumptions of the calculation.

If decided to monitor, *E. coli* serves as an extra faecal indicator, with a reference value of 25 CFU/g (Sabino *et al.* 2011).

### References:

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., Arikian-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., Jonikaitė, E., Kataržytė, 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>

**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  $27,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ . 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., Arian-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., Kataržytė, 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>