

**RELAÇÃO DA SALINIDADE COM AS DENSIDADES DE
BACTÉRIAS INDICADORAS DE CONTAMINAÇÃO FECAL E
DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES DO RIO ITANHAÉM - SP**

ELIETE RODRIGUES BALLESTEROS

SÃO VICENTE - SP
2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

RELAÇÃO DA SALINIDADE COM AS DENSIDADES DE
BACTÉRIAS INDICADORAS DE CONTAMINAÇÃO FECAL E
DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES DO RIO ITANHAÉM - SP

ELIETE RODRIGUES BALLESTEROS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANA JULIA FERNANDES

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus do Litoral Paulista,
UNESP, para obtenção do título de Doutora
no Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

SÃO VICENTE - SP

2024

B191r

Ballesteros, Eliete Rodrigues

Relação da salinidade com as densidades de bactérias indicadoras
de contaminação fecal e de bactérias autóctones do rio Itanhaém - SP /
Eliete Rodrigues Ballesteros. -- São Vicente, 2024

97 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, São Vicente
Orientadora: Ana Julia Fernandes

1. Salinidade. 2. Escherichia coli. 3. Enterococcus sp. 4.
Biodiversidade. 5. Metagenômica. I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha Tia Luzia, aos meus primos Osmar, Aider Cristina e amigos que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES: 001) - UNESP - Universidade Estadual Paulista - CLP Campus Litoral Paulista.

Agradeço imensamente a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho com importantes contribuições pessoais e acadêmicas

Primeiramente à Profa Dra Ana Julia Fernandes que me recebeu no seu grupo de pesquisa no laboratório Micromar onde iniciei os meus estudos teóricos e práticos de microbiologia com muita garra e vontade de aprender incentivado por ela, foi quando decidi fazer o doutorado e começar uma nova jornada. O incentivo e apoio da professora Ana Julia Fernandes e da amiga Julia foram cruciais para o desenvolvimento dos meus estudos e vida pessoal, muito obrigada “Julia”.

Agradeço a todos os alunos que conheci no Micromar desde os graduandos até os pós graduandos em especial a Vanessa e o Augusto que muito me ajudou nas coletas e a Roberta, ah! A Roberta que teve uma paciência sem fim de me ensinar muitas coisas, “amiga” muuuuuuito obrigada por tudo.

O meu agradecimento muito especial as colaborações do Professor Roberto desde os tempos áureos do IO USP e por acreditar em mim.

Agradeço a Fabiana da secretaria a Conceição da biblioteca ao pessoal da limpeza sempre muito divertidas, simpáticas e educadas.

Um agradecimento muito especial a todos os professores do CLP que muito trabalham para conseguir fazer pesquisa em um país onde o professor, o meio ambiente, a ciência e a academia não são respeitados. Muito obrigada “Professores Brasileiros”.

Agradeço a Aider Cristina que muito me ensinou em minha vida pessoal com seus conselhos e paciência mesmo temporariamente distante continuamos amigas, irmãs e parceiras.

Agradeço ao Laboratório NEOPROSPECTA Microbiome Technologies que contribui para as análises Metagenômicas e um agradecimento muito especial ao seu colaborador Leonardo.

Agradeço muito pela minha cachorrinha Mila por ser minha companheira de todos os dias e me amar incondicionalmente.

Um eterno agradecimento aos meus falecidos pais (Eduardo e Avelina) sem eles nada disso teria acontecido.

RESUMO

Os estuários marinhos urbanos são frequentemente impactados por contaminação microbiológica de diversas origens como esgotos doméstico, industriais, compostos orgânicos e inorgânicos. Este estudo utilizou o estuário marinho urbano tropical do rio Itanhaém para comparar às densidades das Bactérias Indicadoras Fecais (FIB) em diferentes gradientes de salinidade. A *Escherichia coli* exibiu densidades acima da legislação (CONAMA 274/00) em 89% dos pontos de coleta, enquanto que *Enterococcus* sp exibiu densidades restritivas em 69% dos pontos de coleta indicando elevado grau de contaminação e potenciais riscos à saúde pública associados à utilização do rio para fins recreacionais entre outros. As densidades de *Escherichia coli* foram superiores às densidades de *Enterococcus* sp mesmo em águas salobras e salinas durante todas as campanhas. Os resultados obtidos indicam a possibilidade de que a *Escherichia coli* seja melhor indicadora de contaminação por esgotos domésticos, inclusive para águas salobras e salinas. As análises da comunidade bacteriana autóctone foram realizadas usando o Gene 16S rRNA do (eDNA) DNA ambiental com a técnica (NGS) Next Generation Sequencing nos 3 diferentes gradientes de salinidade Doce, Salobra e Salgada, gerando 34.977 sequências com dominância do Filo *Proteobactéria*. Na água doce além da *Proteobacteria* também foram identificados os Filos *Actinobactéria* e *Bacteroidete*. As análises comparativas em nível de espécie demonstraram diferenças entre as espécies provenientes de águas salobras e salgadas e as espécies de água continentais, sendo as maiores diversidades obtidas em águas salobras e salinas. Os resultados obtidos nesse estudo demonstrou que a *Escherichia coli* é a melhor Indicadora Fecal tanto em água doce como em água salobra e os métodos moleculares são poderosas ferramentas para analisar a diversidade das comunidades bacterianas em nível de espécie nos diferentes gradientes de salinidades.

Palavras chaves: Salinidade, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp, Biodiversidade, Metagenômica, 16S rRNA.

ABSTRACT

Marine Urban Estuaries are frequently impacted by microbiological contamination from various sources such as domestic and industrial sewage, organic and inorganic compounds. This study used the tropical urban marine estuary at Itanhaém River to compare the densities of Fecal Indicator Bacteria (FIB) at different salinity gradients. *Escherichia coli* exhibited densities above legislation (CONAMA 274/00) in 89% of collection points, while *Enterococcus* sp exhibited restrictive densities in 69% of collection points, indicating a high degree of contamination and potential risks to public health associated with the rivers use for recreational purposes, among others. *Escherichia coli* densities were higher than *Enterococcus* sp densities, even in brackish and saline waters, during all campaigns. The results obtained indicate the possibility of *Escherichia coli* is a better indicator of contamination by domestic sewage, including brackish and saline waters. The analyzes of autochthonous bacterial communities were carried out using the 16S rRNA Gene from environmental DNA (eDNA) with the Next Generation Sequencing technique (NGS) in the 3 different salinity gradients Fresh, Brackish and Salty, generating 34,977 sequences with dominance of the Phylum Proteobacteria. In freshwater, in addition to Proteobacteria, two other phyla were identified Actinobacteria and Bacteroidete. The comparative analyzes at the species level demonstrated differences between species from brackish and saline waters and freshwater species, with the greatest diversities has being obtained in brackish and saline waters. The results obtained in this study had been demonstrated that *Escherichia coli* is the best Fecal Indicator in both freshwater and brackish water and molecular methods are powerful tools for analyzing the diversity of bacterial communities at the species level in different salinity gradients.

Keywords: Salinity, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp, Biodiversity, Metagenomic, 16S rRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do Brasil com a localização do município de Itanhaém no estado de São Paulo e mapa ampliado dos Rios Itanhaém, Branco e Preto (Fonte Google Earth – Adaptado por Roberto Fioravanti Carelli Fontes)	23
Figura 2: Mapa do Rio Itanhaém mostrando os pontos de coleta 1 a 15, distribuídos da Foz a Nascente do Rio Itanhaém (Fonte Google Earth – Adaptado por Roberto Fioravanti Carelli Fontes)	24
Figura 3: Kit de filtração utilizado para realizar a técnica de membrana filtrante Fonte (Micromar, 2023)	26
Figura 4: Crescimento de <i>Escherichia coli</i> em Agar mTEC.	27
Figura 5: Confirmação de <i>Escherichia coli</i> em substrato de ureia	27
Figura 6: Placa de Agar m <i>Enterococcus</i> mostrando o crescimento das colônias de <i>Enterococcus</i> sp	28
Figura 7: Tubos com Enterococcosel mostrando reação positiva (enegrecimento do meio) para <i>Enterococcus</i> sp	28
Figura 8: Fluxograma das fases das análises Metagenômicas, extração de DNA, Amplificação, Construção da Biblioteca, Sequenciamento e Análises de Bioinformática. Fonte: doi.org/10.3390/biomedicines11030827	29
Figura 9: Região V3/V4 do gene 16S rRNA. Marcações de regiões variáveis entre gêneros ou espécies bacterianas e regiões conservadas no domínio Bactéria	31
Figura 10: 16S rRNA “small subunit” (SSU) dos ribossomos procarióticos	32
Figura 11: Bruma da água do Rio avançando até a boca da barra do Rio Itanhaém, resultado de chuvas fortes e efeitos de ressaca - maio/22 (Fonte: Nicole Leslie, Tv Tribuna.)	35
Figura 12: Variação das densidades de <i>Escherichia coli</i> (UFC 100ml ⁻¹) nos 15 pontos de coleta do Rio Itanhém, durante todo o período de coleta	40
Figura 13: Variação das densidades de <i>E. coli</i> e dos valores de salinidade, em todos os pontos de coleta, durante todo o período de estudo, (A) novembro/21, (B) janeiro/22, (C) março/22, (D) maio/22 e (E) agosto/22	43
Figura 14: Densidades de <i>Enterococcus</i> sp (100ml UFC 100ml ⁻¹) nos 15 pontos de coleta do Rio Itanhém, durante todo o período de coleta	45

Figura 15: Variação das densidades de <i>Enterococcus</i> sp (UFC 100ml ⁻¹) e dos valores de salinidade, em todos os pontos de coleta, durante todo o período de estudo, (A) novembro/21, (B) janeiro/22, (C) março/22, (D) maio/22 e (E) agosto/22	48
Figura 16: Espécies bacterianas mais frequentes (A) e espécies mais abundantes (B), considerando o conjunto de águas Doces, Salobras e Salinas	50
Figura 17: Distribuição do número de sequências obtidas em amostras de água Doce, Salobra e Salina do Rio Itanhaém	51
Figura 18: Diagrama de Venny	51
Figura 19: Porcentagem (%) de Filos mais abundantes identificados nas amostras de água doce	52
Figura 20: Porcentagem (%) de Filos mais abundantes identificados nas amostras de água Salobra	53
Figura 21: Porcentagem (%) de Filos mais abundantes identificados nas amostras de água Salina	53
Figura 22: Bactérias mais abundantes e suas porcentagens de ocorrência em águas Doces, Salobras e Salinas	55
Figura 23: Espécies mais frequentes e suas porcentagens de ocorrência, identificadas em amostras de águas Doce, Salobra e Salina	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites das densidades de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Enterococcus</i> sp, de acordo com a Resolução CONAMA 357 para águas doce (classe II), salobras e salinas (Classe I)	18
Tabela 2: Limites das densidades de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Enterococcus</i> sp de acordo com a Resolução CONAMA 274, para águas doces, salobras e salinas	18
Tabela 3: Limites das densidades de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Enterococcus</i> sp da União Europeia e dos Estados Unidos da América para águas doces, salobra e salinas	18
Tabela 4: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta no Rio Itanhaém	25
Tabela 5: Primers usados para o sequenciamento da região 16S	30
Tabela 6: Índices de precipitação na bacia do Rio Itanhaém durante os períodos de coleta Fonte site CPTEC/INPE Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos/Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais em 2021 e 2022)	34
Tabela 7: Valores de Salinidade obtidos nos pontos de coleta, nas cinco campanhas de estudo	36
Tabela 8: Temperatura (°C) da água e índices de precipitação em todos os pontos de coleta, durante às 5 campanhas amostrais	38
Tabela 9: Densidades de <i>Escherichia coli</i> (UFC 100ml ⁻¹) nas amostras de água nos 15 pontos de coletas do Rio Itanhaém, durante às 5 campanhas de amostragem, de novembro de 2021 a agosto de 2022	39
Tabela 10: Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre as densidades de <i>Escherichia coli</i> e cada um dos fatores abióticos: Precipitação (mm), Salinidade e Temperatura (°C)....	41
Tabela 11: Densidades de <i>Enterococcus</i> sp (UFC 100ml ⁻¹) nas amostras de água nos 15 pontos de coleta no Rio Itanhaém, nas 5 campanhas de amostragem, de novembro de 2021 a agosto de 2022	44
Tabela 12: Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre as densidades de <i>Enterococcus</i> sp e cada um dos fatores abióticos: Precipitação (mm), Salinidade e Temperatura (°C)	46
Tabela 13: Densidades de <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus</i> sp em água doce (0,1), salobra (15,0) e água salgada (35,0)	49
Tabela 14: Microrganismos mais abundantes, total de sequências por espécie e a distribuição dos organismos em água Doce, Salobra e Salina	54

Tabela 15: Microrganismos mais frequentes, total de sequências por espécie e a distribuição dos organismos em água doce, salobra e salgada	56
Tabela 16: Índice de diversidade de Shannon-Wiener e Equabilidade de Pielou	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APHA: American Public Health Association
ASV: Amplicon Sequence Variants
BH-BS: Bacia Hidrográfica da Baixada Santista
CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
C-G-A-T: Citosina-Guanina-Adenina-Timina
CNE: Controle Negativo de Extração
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPTEC: Centro de Processamento Tecnológico
DAEE: Departamento de Águas e Energia Elétrica
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ETE: Estação de Tratamento de Esgoto
FIB: Fecal Indicator Bacteria
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INPE: Centro Nacional de Pesquisas Espaciais
NGS: Next Generation Sequencing
OD: Oxigênio Dissolvido
pb: pares de base
PCR: Polymerase Chain Reaction
qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA: Ácido Ribonucleico
rRNA: Ácido Ribonucleico ribossômico
SSU: Small Subunit
UFC: Unidade Formadora de Colônia
UGRHI: Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos
USEPA: United States Environmental Protection Agency
UTO: Unidade Taxonômica Operacional
V3-V4: Vetor 3-Vetor 4
16S: Small Subunit do RNA ribossômico de Procariontes

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Escherichia coli</i>	16
1.2 <i>Enterococcus</i> sp.....	16
1.3 Legislação	17
1.4 Bactérias Autóctones	18
1.5.1. Importância do conhecimento da biodiversidade de bactérias em diferentes salinidades	20
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Área de Estudo.....	21
3.2 Fatores Abióticos	23
3.3 Densidades de Bactérias Indicadoras	25
3.3.1. Coleta de amostras	25
3.3.2 Processamento das amostras	26
3.3.2.1 Técnica da Membrana Filtrante	26
3.3.2.2 Densidade e Confirmação de <i>Escherichia coli</i>.....	26
3.3.2.3 Densidades e Confirmação de <i>Enterococcus</i> sp.....	27
3.4 Análises Moleculares da Comunidade Bacteriana	28
3.4.1 Coleta de amostras – Análise molecular.....	28
3.4.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	29
3.4.3. Filtração das amostras de água e extração de DNA.....	30
3.4.4 Preparo de Biblioteca e Sequenciamento de DNA - 16S.....	30
3.4.5 Análises das Sequências	32
3.5 Análise Estatística - Bactérias Indicadoras.....	33
3.6. Análise da Diversidade de Bactérias Autóctones	33

4. RESULTADOS	34
4.1 Fatores Abióticos	34
4.1.1 Precipitação	34
4.1.2 Salinidade	34
4.1.3. Temperatura	36
4.2. Densidades de Bactérias Indicadoras	38
4.2.1 Densidade de <i>Escherichia coli</i>	38
4.2.1.1. <i>Escherichia coli</i> e Fatores Abióticos	40
4.2.2 Densidade de <i>Enterococcus</i> sp	44
4.2.2.1 <i>Enterococcus</i> sp e os Fatores Abióticos	46
4.3 Análises Metagenômica	49
4.3.1. Densidades de Bactérias Indicadoras	49
4.3.2. Abundância, Diversidade e Riqueza (no total de amostras)	49
4.3.3. Abundância, Frequência e Diversidade (água doce, salobra e salina)	51
4.3.3.1 Ocorrência dos Principais Filos	52
4.3.3.2 Diversidade das Espécies	54
4.3.3.2.1 Diversidade das Espécies mais Abundantes	54
4.3.3.2.2 Diversidade das Espécies mais Frequentes	55
4.3.4 Índice de Diversidade	57
5. DISCUSSÃO	58
5.1 Bactérias Indicadoras Fecais	58
5.2. Diversidade das Comunidades Bacterianas	61
5.2.1. Espécies mais abundantes em Água Doce:	63
5.2.2 Espécies mais abundantes em Águas Salobra e Salgada	63
5.2.3 Espécies mais frequentes Água Doce	64
5.2.4 Espécies mais frequentes em Água Salobra e Salgada	64

6. CONCLUSÃO	66
6.1 Bactérias indicadoras fecais:	66
6.2 Diversidade Bacteriana	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	68

1 INTRODUÇÃO

Os estuários são áreas de transição entre rios e oceanos, caracterizadas por sua alta dinâmica e mudanças constantes. Eles são vulneráveis à ocupação urbana devido à sua produtividade e capacidade de renovação das águas. Aproximadamente 60% das grandes cidades estão próximas a estuários, que sofrem impactos significativos das atividades humanas, como poluição e perda de qualidade da água. Esses ambientes recebem escoamentos pluviais contaminados, afetando a saúde pública e a biodiversidade. A legislação brasileira utiliza a *Escherichia coli* para avaliar a qualidade microbiológica de águas continentais e *Enterococcus* sp para águas salobras e salinas. Estudos mostram que *Escherichia coli* pode tolerar salinidade. Devido às variações na salinidade e seus diferentes impactos nas bactérias fecais, é crucial entender o comportamento dessas bactérias em diferentes salinidades para definir o melhor indicador de contaminação fecal.

A análise da diversidade de microrganismos, especialmente bactérias, ajuda a entender as relações entre eles e os fatores abióticos, além dos efeitos dos poluentes. Estudar a biodiversidade bacteriana é crucial para preservar ecossistemas aquáticos e terrestres e garantir a sustentabilidade ambiental, pois as bactérias desempenham papéis essenciais na transferência de matéria e energia, remineralização de nutrientes e produção de fármacos.

A palavra estuário é derivada do adjetivo latino *aestuarium*, cujo significado é maré ou onda abrupta de grande altura, fazendo referência a um ambiente altamente dinâmico, com mudanças constantes em resposta às forçantes naturais (Miranda, Castro e Kjerfve, 2002). Os estuários representam porções finais de um rio no qual o escoamento das águas fluviais se faz de modo contínuo até o mar ou oceano, diretamente no nível marinho. Portanto, trata-se de um ambiente de transição entre o continente e o oceano adjacente, onde a água do mar é diluída pela água doce da drenagem continental (Miranda, Castro e Kjerfve, 2002)

Os estuários marinhos urbanos estão entre os corpos d'água mais vulneráveis devido a vários fatores que tornam estes ambientes favoráveis à ocupação urbana, pois são locais adequados para instalações portuárias e navais, são produtivos e podem produzir grandes quantidades de alimento, constituem uma via de acesso importante para o interior do continente, além de possuírem capacidade natural para renovar, periódica e sistematicamente, suas águas sob influência da maré (Miranda, Castro e Kjerfve, 2002)

Estas características favorecem que, aproximadamente, 60% das grandes cidades do mundo estejam localizadas perto de estuários. Como consequência, estes ambientes podem sofrer grande impacto pelas atividades antropogênicas, causando a perda da qualidade da água, ameaçando o lazer e a saúde das populações humanas (Lai et al., 2011).

Esses estuários urbanos recebem rotineiramente, das comunidades do seu entorno, escoamentos de águas pluviais e esgotos que contêm níveis relativamente altos e altamente diversificado de contaminantes (Lai et al., 2011).

Entre os principais contaminantes, os esgotos domésticos que carregam patógenos, são altamente abundantes neste efluente (Cai e Zhang, 2013). Vários tipos de bactérias, vírus e outros microrganismos estão presentes em corpos hídricos que desaguam nos rios e estuários (Ahmed et al., 2019), ocasionando riscos para a saúde pública devido à transmissão de doenças infecciosas associadas a usos recreativos e ao consumo de pescados (Jeng et al., 2005).

Além dos riscos à saúde pública, o despejo de poluentes e nutrientes nos corpos d'água são causadores de diversos impactos nos ecossistemas aquáticos, incluindo impactos sobre a biodiversidade, os quais tendem a se agravar como resultado do uso incorreto que o homem faz do meio e das atividades que desenvolve na bacia hidrográfica (Mignani et al., 2013).

No caso de ambientes aquáticos, segundo Braga et al. (2005), os efeitos resultantes da introdução de poluentes dependem da natureza do poluente introduzido, do caminho que esse poluente percorre no meio e do uso que se faz do corpo d'água.

O crescimento populacional, desmatamentos, conversão das terras para uso agrícola intensivo e a expansão urbana em áreas costeiras têm sido os principais fatores causadores da deterioração de muitos ecossistemas, incluindo os rios, estuários e outros ambientes costeiros. Em relação ao uso e ocupação do solo e à expansão urbana destes ambientes, o principal impacto é o aumento da carga de esgotos domésticos que, de acordo com sua disposição no ambiente, pode acelerar o processo de poluição ambiental (Novotny e Olem, 1993).

Segundo Mignani et al. (2013), a qualidade microbiológica da água doce, salgada e salobra, também pode ser afetada por inúmeros fatores ambientais, como marés, precipitação pluviométrica, oxigênio dissolvido (OD), temperatura e salinidade.

A salinidade é um fator de extrema importância, pois interfere diretamente no desenvolvimento microbiano (Esteves, 2011). A salinidade pode influenciar na biodiversidade dos corpos hídricos e, também, na sobrevivência e na permanência dos microrganismos, tanto autóctones, quanto alóctones, nestes ambientes.

Já a precipitação pluviométrica é o fator ambiental mais comumente associado a níveis máximos de microrganismos, incluindo aqueles indicadores de contaminação fecal. Esta relação é devida a lixiviação e à ressuspensão dos sedimentos contaminados para a coluna de água. (Campos et al., 2013).

No caso da região proposta para o presente trabalho, a contaminação dos corpos hídricos por esgotos domésticos e/ou por nutrientes provenientes das atividades humanas e agrícola pode causar diversos prejuízos tanto à saúde ambiental quanto à saúde pública já que o Rio Itanhaém serve à captação de água para tratamento, distribuição e consumo humano, à obtenção de pescados e para recreação de contato primário.

Em relação à saúde pública, a água, quando contaminada por esgotos domésticos, pode ser responsável pela transmissão de diversas doenças tanto pelo seu consumo quanto pelo seu uso recreacional. O uso de água contaminada é uma das principais causas de doenças em seres humanos. Estima-se que aproximadamente 1,9 milhões de mortes por ano, predominantemente em crianças com menos de 5 anos de idade estejam relacionadas à patógenos de transmissão hídrica (Bridle et al., 2014).

As águas recreacionais de rios, estuários e mares, que recebem esgotos domésticos sem tratamento, oferecem riscos mais altos aos seus usuários, pois carregam consigo vários microrganismos patogênicos os quais podem causar doenças após o uso destas águas para o contato primário através de diferentes vias de penetração: oral, nasal, cutânea e ocular (Pinheiro, Oliveira e Fontes, 2008).

As doenças de veiculação hídrica formam um grupo de infecções que podem ser transmitidas pela água, e podem ser causadas por diferentes microrganismos tais como vírus, bactérias, protozoários e fungos, tais como hepatite A, hepatite B, poliomielite, rotavírose, cólera, febre tifoide, gastroenterites, otite externa, conjuntivite, giardíase e criptosporidiose e micoses superficiais (Pinheiro, Oliveira e Fontes, 2008).

Além disto, a contaminação de corpos hídricos pode causar diversos problemas socioeconômicos e ambientais, como o aumento dos custos de tratamento para produção de água potável, a perda do valor estético e turístico de lagos, represas, rios e praias, o impedimento à navegação e à recreação, a mortandade de peixes, a perda da biodiversidade, alterações nos estoques pesqueiros de espécies de valor comercial e a redução na navegação e da capacidade de transporte (Arceivala et al., 1981; Thomann e Mueller, 1987; Sperling et al., 1994; Sperling, et al., 2007).

A avaliação da qualidade microbiológica dos corpos hídricos é feita através da determinação das densidades de bactérias indicadoras de contaminação fecal. No Brasil cabe ao CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) estabelecer normas de qualidade ambiental, sendo a Resolução 357/2005 (Tabela 1), a qual dispõe sobre a classificação dos corpos d'água, bem como as diretrizes ambientais para o seu enquadramento Brasil, (2005), estabelecendo as condições e padrões de lançamento de efluentes, e outras providências Brasil, (2005) além da CONAMA 274/2000 (Tabela 2) a qual define os critérios de balneabilidade das águas recreacionais.

Segundo as resoluções do CONAMA, a qualidade microbiológica de águas doces, salinas e salgadas são avaliadas utilizando as densidades das bactérias indicadoras de contaminação fecal *Escherichia coli* e bactérias do gênero *Enterococcus* sp.

De acordo com a legislação CONAMA 274/2000 Artigo 2º, as águas doces, salobras e salinas destinadas à balneabilidade (recreação de contato primário) terão sua condição avaliada nas categorias própria e imprópria para os fatores de *E.coli* e *Enterococcus* sp.

No Estado de São Paulo o monitoramento é realizado pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), através de um programa com coletas de amostras de água em um ponto determinado (Rio Itanhaém no píer da sede da DAEE). A classificação da qualidade é determinada com base nas densidades de bactérias indicadoras obtidas nas últimas 5 semanas de amostragem.

1.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* pertence à família *Enterobacteriaceae* sendo uma espécie de origem exclusivamente fecal, uma vez que faz parte da microbiota dos intestinos de seres humanos e de outros animais homeotérmicos. São bacilos gram-negativo, aeróbios e anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose com ou sem produção de gás, podendo ser móveis por flagelos peritríqueos ou imóveis que crescem em temperaturas entre 10 e 44°C. Estas bactérias metabolizam uma ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos (Murray, 2004).

1.2 *Enterococcus* sp

Este gênero da Família *Enterococcaceae* compreende cocos Gram positivos, células esféricas ou ovóides dispostos isolados, aos pares ou em pequenas cadeias. São anaeróbios

facultativos, alguns são móveis, sobrevivem em temperaturas 10° a 45°C temperatura ótima de crescimento é de 35 a 37°C. Estas bactérias constituem uma grande proporção das bactérias naturais da microbiota do trato gastrointestinal da maioria dos mamíferos, aves e répteis. São micro-organismos ubíquos, podendo ser encontrados amplamente distribuídos no meio ambiente, em solos, na água, em plantas e alimentos (Giraffa, 2003 e Klein, et.al. 2003) entretanto, algumas espécies são patógenas humanas oportunistas.

Estas bactérias caracterizam-se pela alta tolerância à condições adversas de crescimento, como a capacidade de sobreviver na presença de 6,5% NaCl (halotolerantes), em pH 9,6 e em ampla faixa de temperatura (de 10 a 45°C) segundo os autores Collins, et al. (1991); Martinez-Murcia, et. al., (1991); Brasil L, (2000); Brasil, (2005). Devido à estas características, a partir da década de 80, vários trabalhos foram realizados comparando o uso de *E. coli* e de *Enterococcus* sp como indicadoras de contaminação fecal.

Em estudos realizados em ambientes marinhos por Cabelli et al., (1982); Dufour et al., (1984), o grupo de bactérias *Enterococcus* sp, mostrou maior tolerância à salinidade e maior relação entre sua densidade e a ocorrência de doenças de veiculação hídrica. Segundo estes estudos, devido à sua maior afinidade por sais, *Enterococcus* sp apresentam maior permanência em ambientes salinos e marinhos além de serem mais resistentes aos processos de desinfecção.

Devido a sua alta concentração nas fezes e a sua alta capacidade de sobrevivência nos ambientes salobros e salinos, a partir da década de 90, o grupo *Enterococcus* sp foi proposto como indicador de contaminação fecal para águas marinhas e salobras USEPA, (2004).

1.3 Legislação

A partir de então, a legislação brasileira (CONAMA 357 E 274) (Tabelas I e II) e de outros países como Estados Unidos e países da União Europeia (Tabela 3), considerou o uso de *Escherichia coli*, como padrão para avaliação da qualidade microbiológica de águas doces, enquanto, para águas salobras e salinas, o indicador mais apropriado é o grupo *Enterococcus* sp. Apesar da adoção de *Enterococcus* sp como indicador mais apropriado para águas marinhas, alguns trabalhos puderam evidenciar a tolerância da *Escherichia coli* para a salinidade (Castro et al., 2003 e Craig et al., 2004).

Mesmo com a legislação brasileira vigente, considerando o grupo *Enterococcus* sp como o melhor indicador para avaliar a qualidade das águas salgadas e salobras, não existem no Brasil, nos últimos 20 anos, trabalhos robustos, envolvendo as densidades bacterianas e

estudos epidemiológicos para embasar a legislação pertinente, sendo os indicadores e fatores baseados nas legislações de outros países.

Tabela 1. Limites das densidades de *Escherichia coli* e de *Enterococcus* sp, de acordo com a Resolução CONAMA 357 para águas doce (classe II), salobras e salinas (Classe I).

BACTÉRIA INDICADORA (UFC 100ml ⁻¹)	Água Doce Classe II	Água Salobra Classe I	Água Salina Classe I
<i>E. coli</i>	1000	1000	1000
<i>Enterococcus</i> sp	—	—	—

Tabela 2. Limites das densidades de *Escherichia coli* e de *Enterococcus* sp de acordo com a Resolução CONAMA 274, para águas doces, salobras e salinas.

BACTÉRIA INDICADORA (UFC 100ml ⁻¹)	Doces	Salobras	Salinas
<i>E.coli</i>	2000	2000	2000
<i>Enterococcus</i> sp	400	400	400

Tabela 3. Limites das densidades de *Escherichia coli* e de *Enterococcus* sp da União Europeia e dos Estados Unidos da América para águas doces, salobra e salinas.

BACTÉRIA INDICADORA (UFC 100ml ⁻¹)	Doces	Salobras	Salinas
<i>E. coli</i>	1000	500	500
<i>Enterococcus</i> sp	400	200	200

Uma vez que os níveis de salinidade variam amplamente e que a salinidade pode ter impactos significativamente diferentes na sobrevivência de diferentes bactérias fecais (Anderson et al., 2005), a relação entre Bactérias Indicadoras Fecais (FIB) e o entendimento do comportamento destas bactérias em águas de diferentes salinidades é necessário para definir o melhor indicador de contaminação fecal para estes ambientes.

1.4 Bactérias Autóctones

Além das bactérias alóctones lançadas em ambientes aquáticos junto com os esgotos domésticos, as águas doces, salobras e salinas apresentam uma microbiota própria e bastante diversa que tem grande importância na manutenção de diferentes ecossistemas (Ghosh e Bhadury, 2019).

À semelhança do que ocorre com as bactérias alóctones, aquelas provenientes dos ambientes marinhos e de água doce também tem sua sobrevivência e seu padrão de distribuição afetados pelos fatores abióticos tais como, salinidade, precipitação e concentração de nutrientes.

A comunidade microbiana autóctone apresenta grande importância na manutenção das funções dos diferentes ecossistemas, as quais incluem: ciclagem de nutrientes, produção primária, decomposição da matéria orgânica e regulação do clima (Ghosh e Bhadury, 2019; Jeffries et al., 2016).

Embora grandes comunidades bacterianas estejam bem documentadas em águas costeiras e sedimentos, sua diversidade, variações espaço-temporais e fatores que as influenciam ainda permanecem amplamente desconhecidos, principalmente se considerarmos os ecossistemas costeiros brasileiros (Zampieri et al., 2020).

Vários estudos mostram que populações bacterianas marinhas são complexas, de ampla distribuição e geralmente apresentam uma variedade de grupos ainda não identificados ou não cultivados. Entretanto, muitos avanços tecnológicos têm contribuído para melhorar a compreensão dos processos mediados por bactérias nos ambientes marinhos (Wang et al., 2023).

Dentre as técnicas idealizadas para se ter acesso à fisiologia e à genética de microrganismos, a metagenômica desempenha papel central. O desenvolvimento da metagenômica, na verdade, é considerado o evento mais marcante no campo da ecologia microbiana nos últimos anos (Thomas et al., 2012; Arikawa e Hosokawa, 2023). Trata-se da análise genômica de uma comunidade de organismos baseada no isolamento direto de fragmentos de DNA oriundos de amostras ambientais, sobrepondo a necessidade de isolamento e cultivo de espécies individuais.

1.5 Biodiversidade

Biodiversidade é a variabilidade de organismos vivos em diversos ambientes, entre eles o terrestre, o marinho e de outros ecossistemas aquáticos e seus complexos ecológicos. Esta variabilidade ocorre, tanto dentro da espécie, quanto entre as espécies e seus ecossistemas e esta foi a definição mais aceita na Convenção sobre Diversidade Biológica de 1992, (Takacs, 1996).

A biodiversidade microbiana estuda a variabilidade desses microrganismos nos três níveis previamente descritos (Variabilidade dentro da espécie, entre as espécies e seus

ecossistemas). O avanço tecnológico foi fundamental para estudos de biodiversidade microbiana, uma vez que métodos distintos permitem encontrar micro-organismos diferenciados, influenciando dramaticamente nossa compreensão do que é observado. Até recentemente, as metodologias tradicionais, originalmente em contexto de saúde e agropecuária, recuperavam poucos microrganismos, embora fossem bem-sucedidos para abordagem de patógenos de interesse médico, veterinário e/ou agrícola, (Ramees et al., 2017)

Quando novas metodologias passaram a ser empregadas, como aquelas da biologia molecular, foi possível identificar uma enorme diversidade microbiana natural, ainda desconhecida, e suas relações com os fatores abióticos e bióticos. Os índices de biodiversidade obtidos, a partir das novas metodologias, desencadearam mudanças no pensamento sobre ecologia microbiana e sobre o papel dos vírus, fungos e bactérias no planeta (Gregoracci e Rua 2020).

A obtenção dos índices de diversidade de microrganismos, entre eles as bactérias, é uma maneira de caracterizar as comunidades bacterianas de um ecossistema, permitindo o estudo das relações de bactérias com outros microrganismos e com os fatores abióticos, bem como a avaliação dos efeitos dos poluentes nesta comunidade.

Portanto, o estudo da biodiversidade das bactérias aquáticas é fundamental para a preservação dos ecossistemas aquáticos e terrestres, bem como para a sustentabilidade ambiental uma vez que bactérias são responsáveis pela transferência de matéria e energia para níveis tróficos superiores, pela remineralização de nutrientes e por serem fonte de vários produtos de interesse humano, como os fármacos.

1.5.1. Importância do conhecimento da biodiversidade de bactérias em diferentes salinidades

As bactérias são extremamente versáteis e podem sobreviver em uma ampla gama de ambientes, incluindo água doce, salobra e salgada. Compreender como as bactérias se adaptam a diferentes níveis de salinidade é crucial para entender os processos bacterianos, sua participação nos ciclos biogeoquímicos e seu uso como bioindicadoras da presença de contaminantes

As bactérias desempenham um papel vital nos ciclos de nutrientes, como o ciclo do nitrogênio e do carbono. Em ambientes aquáticos, a salinidade afeta a disponibilidade desses nutrientes e influencia as comunidades bacterianas responsáveis pela reciclagem de compostos

orgânicos. Além disso, compreender a diversidade das bactérias em ambientes salinos é importante para a saúde pública, especialmente em regiões costeiras, nas quais as águas doces, salobras e salinas são utilizadas para recreação de contato primário e para obtenção de alimentos.

Em resumo, o estudo das bactérias em diferentes salinidades contribui para nossa compreensão da biodiversidade, ecologia e aplicações práticas desses microrganismos (Gregoracci e Rua, 2020).

2 OBJETIVOS

- O presente trabalho teve como objetivos determinar a relação da salinidade com as densidades das bactérias indicadoras de contaminação fecal, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp no Estuário do Rio Itanhaém
- Relação da salinidade na diversidade de bactérias autóctones presentes em ambientes de água doce, salobra e salina com os estudos metagenômicos através da técnica de sequenciamento de nova geração (NGS).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

O município de Itanhaém faz parte da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos da Baixada Santista 07 (UGRHI 07). A BH-BS Bacia Hidrográfica da Baixada Santista compreende a região do estuário de Santos, São Vicente e Cubatão, as bacias do litoral norte em Guarujá e Bertioga, e as bacias do litoral centro-sul e sul em Praia Grande, Mongaguá, Itanhaém e Peruíbe e ocupa a maior área desta unidade, correspondendo a cerca de 20% da área total e possuindo 912,68 km de cursos d'água, sendo a maior rede de drenagem natural. Os principais usos do solo são: I) área de preservação; II) agricultura; III) vegetação secundária; IV) área urbana com alta densidade demográfica; V) área urbana com baixa densidade demográfica. (Camargo e Cancian 2016).

O município de Itanhaém faz parte da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos da Baixada Santista. O município é uma estância balneária tendo o turismo como uma das principais atividades econômicas.

O rio Itanhaém (Figura 1) é formado pela confluência dos rios Preto e Branco a aproximadamente 6 Km acima da sua foz no oceano e por isso sofre grande influência de águas marinhas, sua utilização é de contato primário, pesca e navegação. O rio Itanhaém, é considerado um rio urbano devido à presença de moradias, marinas, rodovia e de grandes atividades turísticas que exercem ações antrópicas. (Camargo & Cancian, 2016).

O regime de marés e a chuva provocam grandes variações temporais nas características abióticas com uma intensa dinâmica temporal pouco previsível. Em alguns períodos, ele tem características de águas marinhas; em outros, águas pretas; e ainda em outras ocasiões, água salobra. A salinidade da água do rio Itanhaém varia entre 35 (salinidade da água do mar) e zero (Camargo & Cancian, 2016).

A cidade de Itanhaém segundo o relatório do IBGE 2022 possui uma taxa populacional de 112.476 habitantes, sendo 45% de moradias permanentes e 55% de moradias ocasionais sobretudo no período de veraneio. A rede de tratamento de esgoto serve aproximadamente 52% da população permanente Urbana, e mais de 30% do tratamento é feito com fossa séptica, fossa filtro não ligados à rede, fossa rudimentar ou buraco. A cidade não possui sistema de bombeamento responsável pelo escoamento de águas pluviais durante a ocorrência de precipitações intensas. A estação de tratamento de esgoto (ETE) Anchieta está localizada a margem esquerda do Rio Itanhaém próxima ao ponte 6 de coleta (Figura 1 e 2), com o sistema de tratamento “Unitank” (conjunto de tanques de aeração e clarificação). O município Itanhaém gera 8.239,43 mil m³ de esgotos por ano. Do volume gerado, 58,23% é coletado, e 58,23% é tratado. Em 2022, foram despejados 3.441,63 mil m³ de esgotos na natureza sem tratamento (Instituto água e tratamento, censo 2022). No ano de 2022 foram registradas 11 internações nos hospitais do município causadas por doenças de veiculação hídrica (Painel de Saneamento Brasil, 2022).

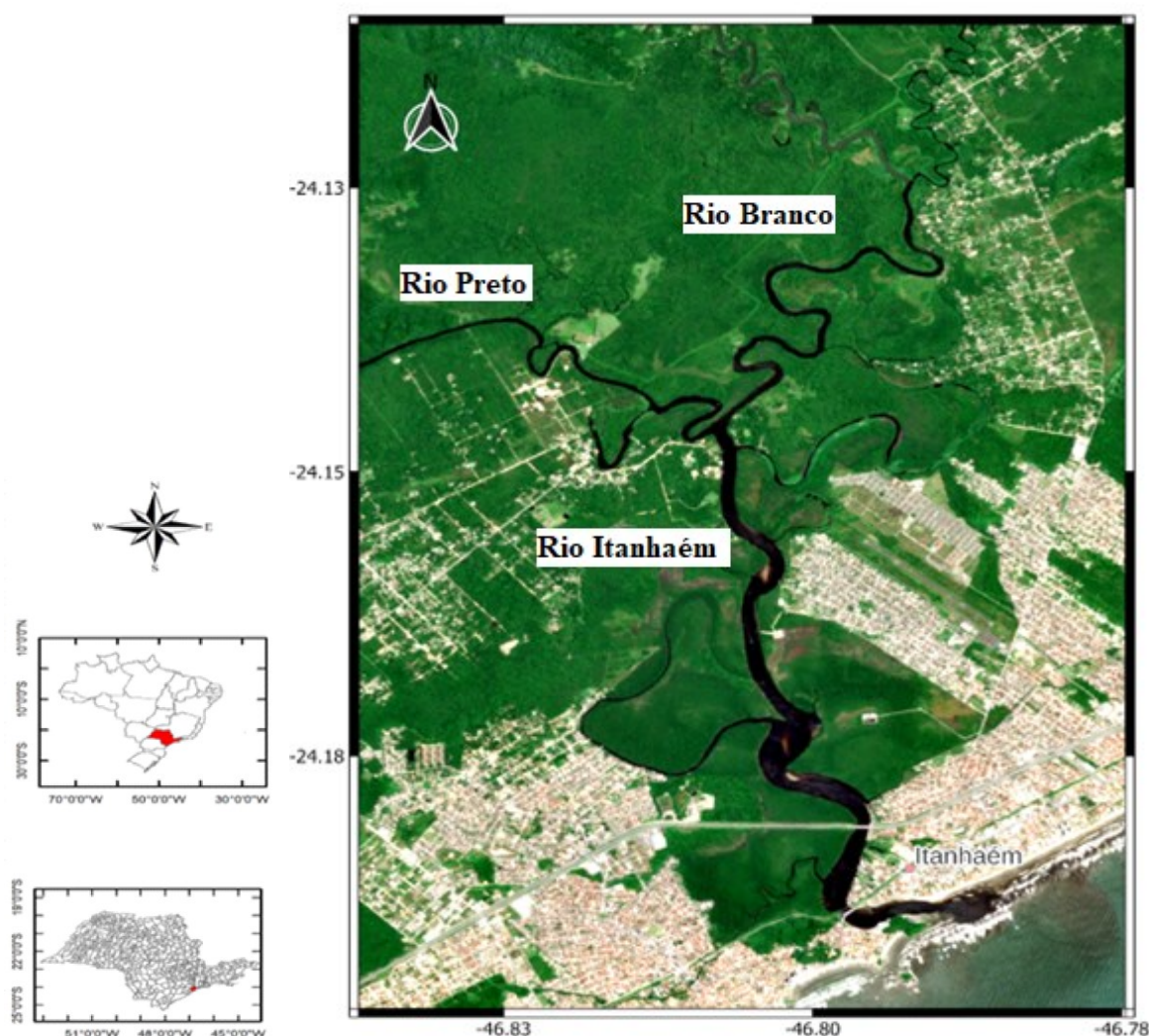


Figura 1 – Mapa do Brasil indicando o Estado de São Paulo (SP) e, em detalhe, a localização do Município de Itanhaém, onde está localizado o Rio Itanhaém. Mapa com a indicação dos Rios Preto e Branco que por confluência formam o Rio Itanhaém. Fonte: Google Earth – (Adaptado por Roberto Fioravanti Carelli Fontes).

3.2 Fatores Abióticos

Amostras de água foram coletadas, bimestralmente, em 15 pontos distribuídos ao longo do Rio Itanhaém (Figura 2), num total de 5 campanhas entre novembro de 2021 a agosto de 2022 durante a maré baixa. As amostras foram destinadas as análises das densidades bacterianas e metagenômica. Nos mesmos pontos de coleta foram medidos, a Salinidade e Temperatura (T°C) com o uso de uma sonda Multifatores Hanna HI98194.

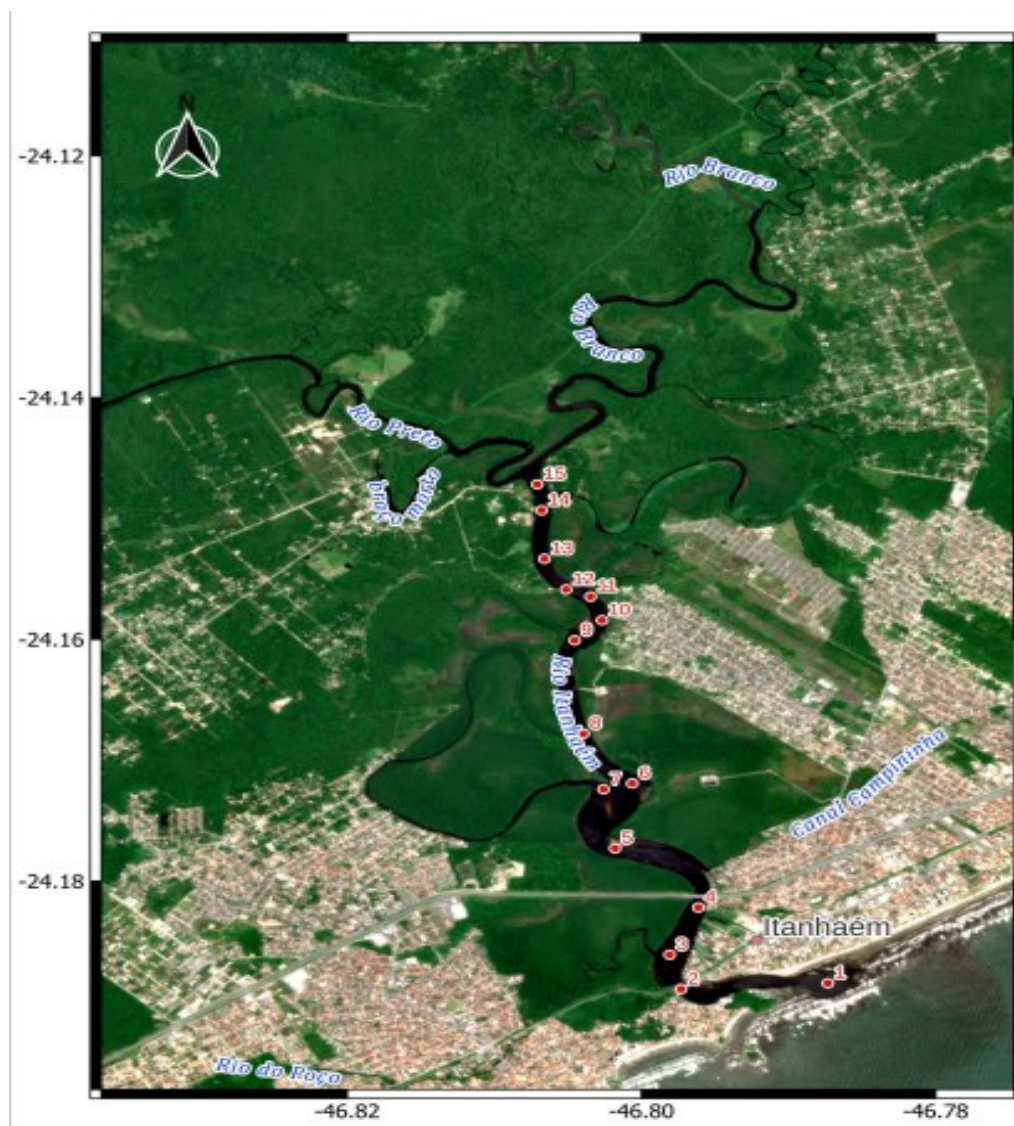


Figura 2– Mapa do Rio Itanhaém mostrando os pontos de coleta 1 a 15, distribuídos da Foz a Nascente (Fonte Google Earth – (Adaptado por Roberto Fioravanti Carelli Fontes).

As coordenadas geográficas dos pontos de coleta ao longo do Rio Itanhém podem ser observadas na Tabela 4 e Figura 2.

Tabela 4. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta no Rio Itanhaém

Pontos de coleta	Coordenadas Geográficas (°)
01	24°11'18.86"S 46°47'33.86"O
02	24°11'20.91"S 46°47'47.51"O
03	24°11'11.39"S 46°47'55.56"O
04	24°11'01.74"S 46°47'48.37"O
05	24°10'49.58"S 46°47'44.52"O
06	24°10'41.32"S 46°47'57.03"O
07	24°10'32.23"S 46°48'14.12"O
08	24°10'23.61"S 46°48'00.67"O
09	24°10'13.09"S 46°48'10.08"O
10	24°09'57.37"S 46°48'18.89"O
11	24°09'41.01"S 46°48'18.45"O
12	24°09'28.45"S 46°48'10.11"O
13	24°09'19.43"S 46°48'19.91"O
14	24°09'04.26"S 46°48'24.92"O
15	24°08'49.41"S 46°48'25.90"O

3. 3 Densidades de Bactérias Indicadoras

3.3.1. Coleta de amostras

Para as coletas de amostras para as análises bacterianas foram utilizando frascos de polietileno estéreis de 100ml, acrescidos de EDTA e Tiossulfato de Sódio, as mesmas foram coletadas na porção superficial da coluna d'água entre a borda e o meio do rio (Tabela 4). Após as coletas as amostras foram mantidas sob refrigeração, até seu processamento no laboratório de Microbiologia Marinha (MICROMAR), no Instituto de Biociências Litoral Paulista - UNESP.

3.3.2 Processamento das amostras

3.3.2.1 Técnica da Membrana Filtrante

As densidades bacterianas nas amostras de água foram obtidas através da Técnica de Membrana Filtrante APHA, (2013) (Figura 3).

Foram filtradas 10ml das amostras de água para *Escherichia coli* e 25ml para *Enterococcus* sp em membranas Milipore® de 0,45µm de porosidade, as quais foram adicionadas em meio seletivo específico para o crescimento da bactéria, conforme APHA (2013).



Figura 3. Kit de filtração utilizado para realizar a técnica de membrana filtrante (Micromar, 2023)

3.3.2.2 Densidade e Confirmação de *Escherichia coli*

Para determinação das densidades de *E. coli*, após a filtração, as membranas foram colocadas em placas com meio específico para *E. coli* (Ágar m-TEC) e incubadas a 35°C por 2 horas. Após este período, as placas foram retiradas e transferidas para banho-maria a 44.5°C ± 1°C onde permaneceram por 24 horas para completar o ciclo de crescimento (Figura 4).

A confirmação foi realizada com a retirada das membranas das placas e colocação sobre o papel-filtro saturado de solução de Uréia (2% Vermelho Difenol) e apenas as colônias

verde-amareladas e marrom- amareladas foram consideradas como resultado positivo para *E. coli* (Figura 5).

As densidades foram expressas em Unidades Formadoras de Colônia por 100 mililitros (UFC 100ml⁻¹).

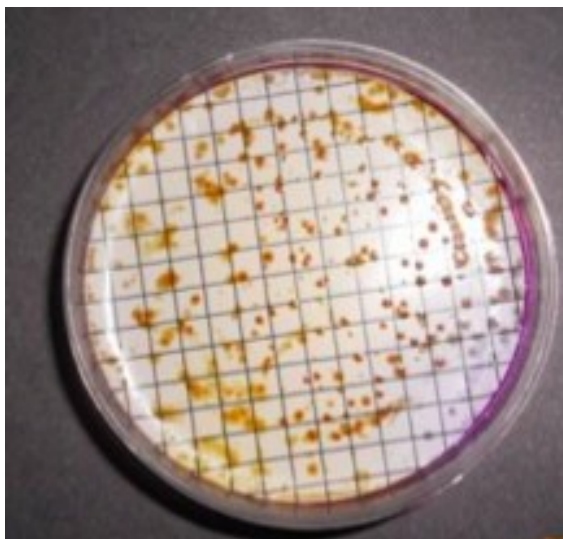


Figura 4 - Crescimento de *E. coli* em Agar mTEC.

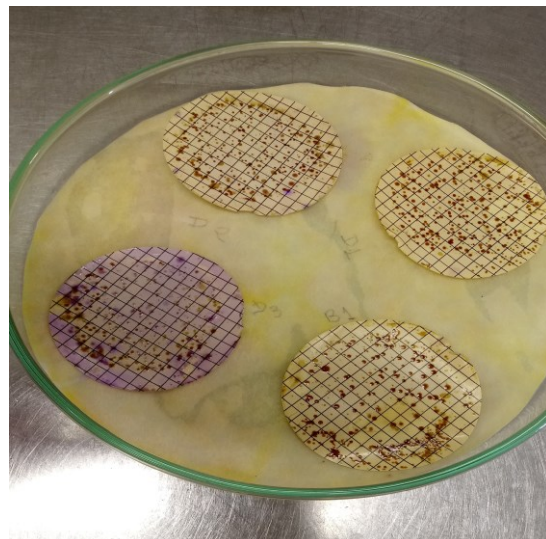


Figura 5 - Confirmação de *E. coli* em substrato de ureia.

3.3.2.3 Densidades e Confirmação de *Enterococcus* sp.

Para *Enterococcus* sp, posteriormente ao procedimento de filtração, as membranas foram colocadas em placas contendo Ágar mEnterococos e incubadas a 37°C ($\pm 1^\circ$) por 48 horas (Figura 6). As colônias com tonalidade vermelha-amarronzado foram retiradas do meio (Ágar mEnterococos) consideradas características de *Enterococcus* sp e confirmadas por meio do Caldo Enterococcosel. Os tubos de Caldo Enterococcosel foram incubados a 35°C por 4 a 18 horas. Os tubos que apresentaram enegrecimento foram considerados positivos, obtendo assim a confirmação das colônias de *Enterococcus* sp (Figura 7).

As densidades foram expressas em Unidades Formadoras de Colônia por 100 mililitros (UFC 100ml⁻¹).

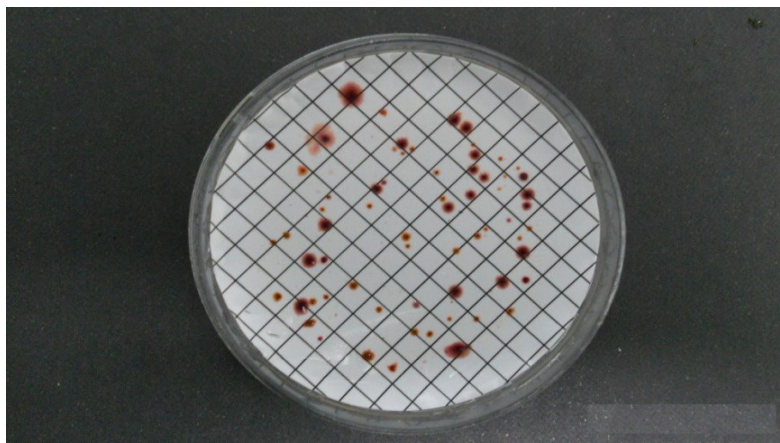


Figura 6– Placa de Agar mEnterococcus mostrando o crescimento das colônias de *Enterococcus* sp.

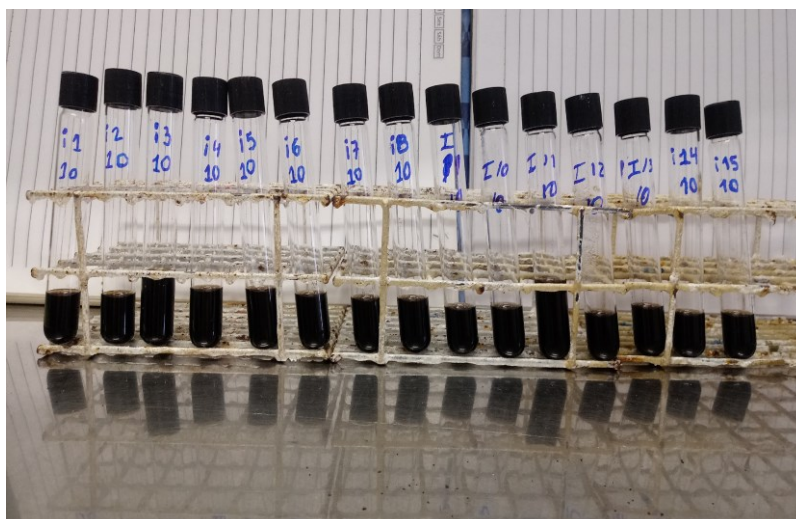


Figura 7. Tubos com Enterococcosel mostrando reação positiva (enegrecimento do meio) para *Enterococcus* sp.

3.4 Análises Moleculares da Comunidade Bacteriana

3.4.1 Coleta de amostras – Análise molecular

Para avaliar as bactérias autóctones presentes nas águas do Rio Itanhém foi utilizado o Sequenciamento de Nova Geração. Para as análises Metagenômica foram coletadas 100ml em duplicata de águas superficiais com 3 diferentes salinidades 0,11 Doce, 15,00 Salobra e 35,00 Salgada medidas com a sonda multiparâmetros. As amostras foram coletadas utilizando frascos de polietileno estéreis, que foram mantidas sob refrigeração até o laboratório de Microbiologia Marinha (MICROMAR), no Instituto de Biociências Litoral Paulista – UNESP.

Onde foram mantidas congeladas a -20°C, até serem encaminhadas para processamento no laboratório Neoprospecta Microbiome Technologies (Florianópolis, SC).

3.4.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

As análises das comunidades bacterianas presentes nas amostras de água doce, salobra e salgada foram desenvolvidas através de técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), utilizando o Illumina. Esta abordagem constou fundamentalmente dos seguintes passos:

- (1) Extração de DNA de um conjunto de amostras;
- (2) Amplificação da região alvo de aproximadamente 400 pares de bases (pb) usando a PCR, com um par de iniciadores (Primers) que tem como objetivo a informação das regiões conservadas em ambos os lados amplificados (16S);
- (3) Codificação dos Amplicons iniciais em sequências curtas;
- (4) Combinação dos Amplicons iniciais em uma única execução de sequenciamento criando milhares de cópias daqueles fragmentos. (Figura 8).

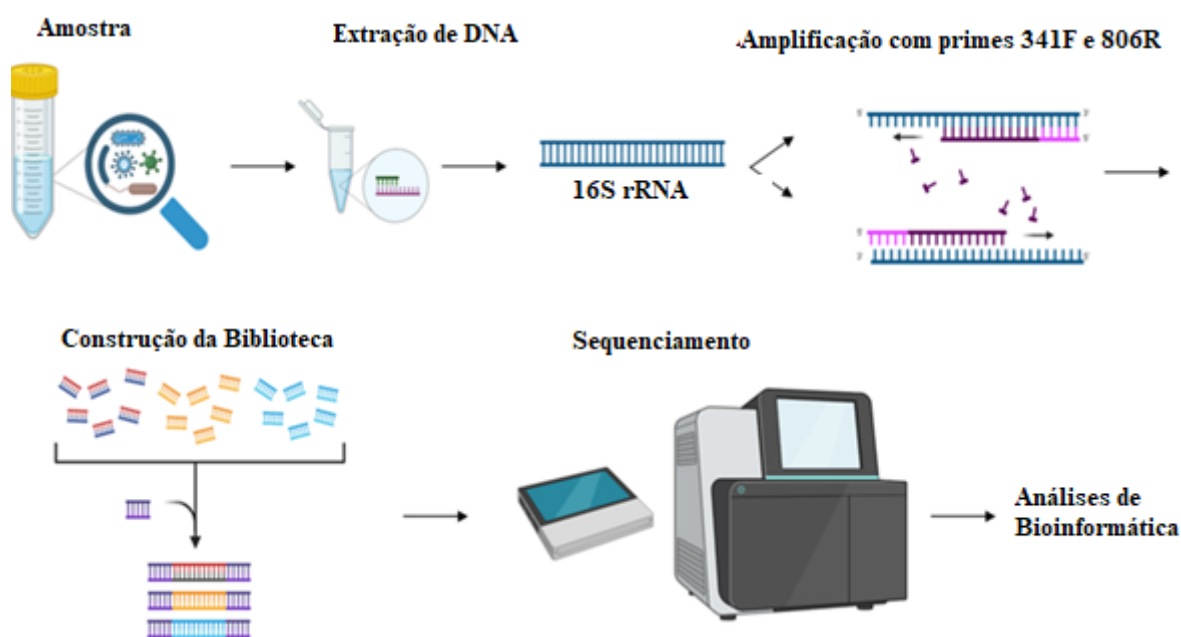


Figura 8– Fluxograma das fases das análises Metagenômicas, extração de DNA, Amplificação, Construção da Biblioteca, Sequenciamento e Análises de Bioinformática. Fonte: doi.org/10.3390/biomedicines11030827– adaptado pelo autor.

Após esses processos, o processamento de dados resultou em uma lista de abundâncias de táxons compostas individualmente pelas Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) presentes em cada amostra.

3.4.3. Filtração das amostras de água e extração de DNA

Primeiramente, os frascos contendo 200 ml de água dos 3 pontos coletados foram descongelados em geladeira *overnight*. Então, foi utilizado o sistema de filtração Microsart® Manifold (Sartorius) contendo filtros de membrana filtrante de 0.22 µm (MilliPore), conforme orientações do fabricante. Posteriormente, com o auxílio de uma pinça e um bisturi, ambos estéreis, as membranas filtrantes foram cortadas em pedaços e inseridas em microtubos de 2 ml, contendo *beads* de zircônio (proporção de 1:1 de *beads* de zircônio de 0.4 e 1 mm) e uma *bead* de aço (2.4 mm). Visando lisar as células presentes nas membranas filtrantes, foi adicionado, nos microtubos contendo os fragmentos de membrana filtrante, o tampão de lise seguindo o protocolo do kit DNeasy PowerWater Kit (Qiagen). O material foi então submetido a disrupção com o auxílio do Disruptor de células e tecidos L-BEADER HT (Loccus).

Após a lise, os microtubos foram submetidos a microcentrifugação (10 min / 5.000 g) e o material em suspensão foi submetido a extração de DNA com o auxílio do kit DNeasy 96 PowerWater adaptado para a extração automatizada pelo QIAcube com o software QIAcube HT Prep Manager software (Qiagen). Cada amostra resultou em 80 µL de DNA extraído.

3.4.4 Preparo de Biblioteca e Sequenciamento de DNA - 16S

A preparação das bibliotecas para sequenciamento de Amplicons de bactérias foi realizada utilizando os oligonucleotídeos (primers) 341F e 806R (Tabela V) específicos para a região V3/V4 do gene 16S rRNA (Tabela 5).

Tabela 5. Primers usados para o sequenciamento da região 16S

Primer	Sequências	Referências
341F	CCTACGGGGRSGCAGCAG	WANG e QIAN (2009)
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	CAPORASO, et al. (2010)

O protocolo utilizado para o PCR foi feito em duas etapas (WANG e QIAN 2009)); (CAPORASO, et al. 2012).

Os primers utilizados na primeira PCR, além de conterem região alvo específica para a região V3/V4 (Figura 9), possuíam também uma região correspondente a um adaptador Illumina parcial, baseado na estrutura TruSeq (Illumina, EUA). A presença deste adaptador permitiu uma segunda PCR que adicionou as sequências de indexação conforme procedimentos já descritos (WALTERS, 2015).

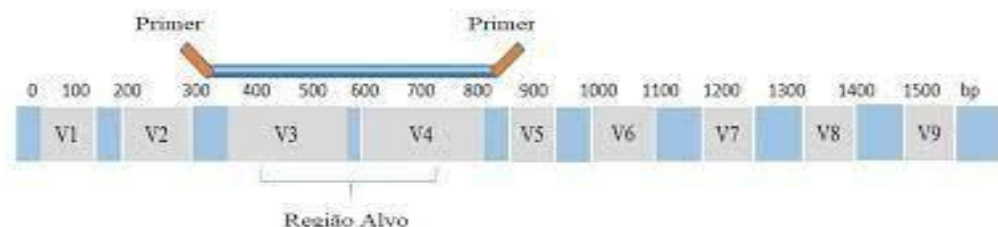


Figura 9. Região V3/V4 do gene 16S rRNA. Marcações em azul – regiões variáveis entre gêneros ou espécies bacterianas. Espaços em cinza – sequência conservada no domínio Bactéria

A indexação foi feita com índices duplos exclusivos para cada amostra na segunda PCR. Dois microlitros do DNA extraído de cada amostra foram utilizados como molde na primeira reação de PCR.

As reações de PCR foram realizadas utilizando Platinum Taq (Invitrogen, EUA) com as condições: 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 95 °C por 45s, 55 °C por 30s e 72 °C por 45s e uma extensão final de 72 °C por 2 min para PCR 1. Na PCR 2 as condições foram 95 °C por 5 min, 10 ciclos de 95 °C por 45s, 66 °C por 30s e 72 °C por 45s e uma extensão final de 72 °C por 2 min. Todas as reações de PCR foram realizadas em triplicata.

As reações finais de PCR foram purificadas utilizando Neobeads® (Beads magnéticas a base de Sera-Mag™) e um volume equivalente de cada amostra foi adicionado ao pool de sequenciamento. Em cada rodada de PCR, um Control Negativo de Reação (CNR) foi incluído. Para cada Ordem de Recebimento (OR) foi também incluído um Control Negativo de Extração (CNE). A concentração final de DNA do pool de bibliotecas foi estimada através de ensaios utilizando Picogreen dsDNA (Invitrogen, EUA), e em seguida foi diluída para quantificação por qPCR utilizando o Kit de Quantificação de Biblioteca Collibri™ (Invitrogen, EUA) já otimizado para bibliotecas Illumina.

O pool de sequenciamento foi ajustado para uma concentração final de 11 pM (para kits V4) ou 17,5 pM (para kits V3) e sequenciado no sistema MiSeq (Illumina, EUA), empregando os primers de sequenciamento Illumina, fornecidos com o kit do fabricante. As

corridas paired-end foram realizadas utilizando kits de sequenciamento V3 e V4 (Illumina, EUA).

As regiões V4, V3–V4 e V3–V5, que demonstram a classificação menos enviesada dos táxons bacterianos. O presente trabalho utilizou primers específicos para as regiões V3–V4 do gene 16S rRNA, pois cobre a região mais longa do 16S rRNA com duas regiões hipervariáveis (V3 e V4), o Amplicon específico V3–V4 permite a fusão das leituras direta (R1) e reversa (R2), levando a uma melhor resolução da classificação bacteriana. (Figura 10)

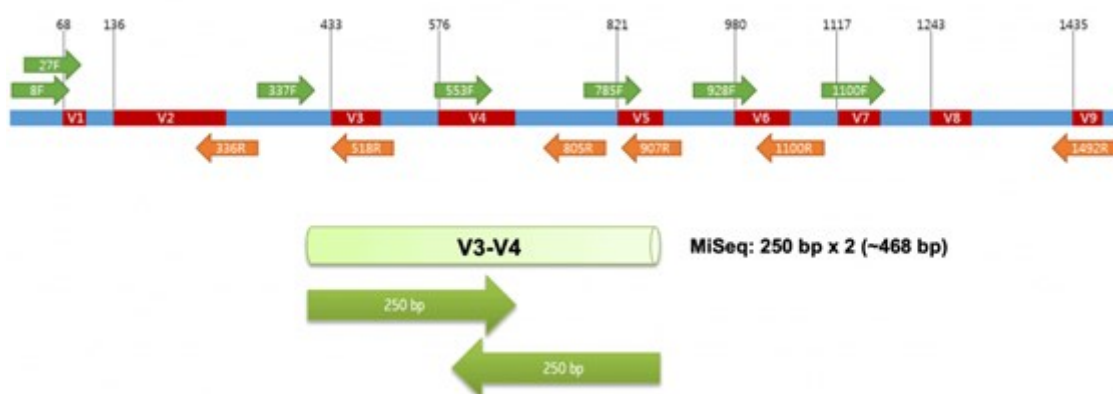


Figura 10: 16S rRNA “small subunit” (SSU) dos ribossomos procarióticos.

3.4.5 Análises das Sequências

O software Qiime2-Deblur (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) agrupou as sequências com 97% de identidade em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), fazendo a reconstrução das sequências biológicas exatas presentes na amostra, chamadas de Amplicon Sequence Variants (ASVs). Assim, uma OTU representa um grupo de sequências muito próximas que se separa das demais OTUs pela aplicação de técnicas de agrupamento hierárquico utilizando limites de identidade de sequência independentemente de inferências filogenéticas Yarza, P. et al. (2014).

Em vez de agrupar as sequências em OTUs, o método ASV atribui um número de identificação único para cada sequência de Amplicon presente nos dados, representando assim variantes únicas. O uso de ASVs permitiu uma resolução mais alta na análise da diversidade microbiana. Ao considerar cada sequência individualmente, foi possível identificar diferenças sutis entre as variantes, como mutações ou polimorfismos, que poderiam ser agrupados em uma

única OTU utilizando uma abordagem baseada em similaridade. (Callahan et al. 2017; Amir et al. 2017).

3.5 Análise Estatística - Bactérias Indicadoras

Para analisar as relações existentes entre as densidades de *Escherichia coli*, de *Enterococcus* sp e fatores abióticos, ao longo do tempo, nos pontos amostrados, foi utilizado o teste de Correlação de Pearson.

Fórmula de correlação de Pearson:

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 \sum (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

3.6 Análise da Diversidade de Bactérias Autóctones

Para analisar a biodiversidade das bactérias autóctones presentes nas águas doces, salobras e salgadas foi utilizado o Índice de Diversidade de Shannon & Wiener (1949).

Fórmula do Índice de Diversidade de Shannon-Wiener:

$$H' = -\sum [(p_i) \cdot \ln(p_i)]$$

O índice de Shannon-Wiener é uma medida que ajuda a compreender a diversidade de espécies e leva em consideração não apenas o número de espécies presentes, mas também a abundância relativa de cada uma delas. Isso significa que um ecossistema com várias espécies de bactérias, mas com uma distribuição desigual entre elas, terá um índice de Shannon mais alto do que um ecossistema com poucas espécies, mas com abundância semelhante entre elas.

O índice de Shannon é baseado em um conceito muito relevante em ecologia: uniformidade (Uniformidade ou Equabilidade). Este fator refere-se ao grau em que as espécies são representadas ao longo da amostra. Os extremos abrangem uma única espécie dominante e outras espécies presentes em números muito baixos (valores de uniformidade próximos de 0), para todas as espécies representadas por números iguais (valores de uniformidade próximos de 1).

A diversidade pode ser subdividida em dois grupos: Riqueza e Uniformidade. Riqueza refere-se ao número de espécies presentes em uma determinada área, enquanto, a uniformidade diz respeito a distribuição de indivíduos entre as espécies, em uma área.

De acordo com os índices de Shannon-Wiener obtidos, que podem variar de 1,5 a 3,5 e, quanto maior seu valor, maior é a diversidade das bactérias no ecossistema. Isso indica que o ecossistema é mais complexo, com uma variedade maior de interações entre as espécies. Por outro lado, um índice de Shannon baixo pode indicar que o ecossistema está mais propenso a perturbações e a perda de biodiversidade.

4. RESULTADOS

4.1 Fatores Abióticos

4.1.1 Precipitação

Na Tabela 6 é possível observar os índices de pluviosidade acumulados 5 dias antes de cada coleta medidos nos meses de estudo. Os índices obtidos demonstraram que os meses de novembro (2021), janeiro e agosto (2022) representaram um período de seca na região, sendo que no mês de novembro o índice de precipitação foi mais baixo.

Contrariamente, nos meses de março e maio de 2022, a precipitação acumulada aumentou, mostrando índices de 98,0mm e 114,6mm, respectivamente.

Tabela 6 – Índices de precipitação na bacia do Rio Itanhaém durante os períodos de coleta (índices obtidos, valores acumulados 5 dias antes da coleta no site CPTEC/INPE Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos/Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais em 2021 e 2022).

Meses	Precipitação (mm)				
	Novembro	Janeiro	Março	Maio	Agosto
	2021	2022	2022	2022	2022
Precipitação acumulada	0	1,4	98,0	114,6	23,7

4.1.2 Salinidade

De acordo com a Resolução CONAMA 357, águas doces são aquelas com salinidade igual ou inferior a 0,5 enquanto que águas salobras apresentam valores maiores que 0,5 até 30 e as salgadas são as que apresentam salinidades superiores a 30 (Brasil, 2000).

Os valores de salinidade obtidos durante todo o período de coletas, em todos os pontos, variaram de 0,02 a 18,33.

Na tabela 7 é possível observar que, no Rio Itanhaém, a predominância de água doce (0 a 0,5) ocorreu nos pontos 14 e 15, nos meses de novembro/21 e março/22. Neste mesmo

período, nos demais pontos (01 a 13) a predominância foi de água salobra, mesmo nos pontos 1 e 2, localizados na Foz do rio.

No mês de março, todos os pontos apresentaram salinidades inferiores a 0,5, o que indicou que as amostras, coletadas em todos os pontos (à exceção do ponto 7), apresentaram predominância de água doce, o que coincidiu com o aumento da precipitação de 1,4mm em janeiro para 98,0 mm em março.

Na Figura 11 é possível observar o efeito da precipitação na Foz do Rio, com o avanço da (pluma) cunha salina da água do rio avançando até o mar.



Figura 11. Pluma da água do Rio avançando até a boca da barra do Rio Itanhaém, resultado de chuvas fortes e efeitos de ressaca — maio/22 (Fonte: Nicole Leslie, Tv Tribuna)

Contrariamente, e, apesar do aumento nos índices de precipitação, nos meses de maio e agosto, todos os pontos amostrados apresentaram salinidade superior a 0,5, sendo, portanto, caracterizados como águas salobras.

Tabela 7. Valores de Salinidade obtidos nos pontos de coleta, nas cinco campanhas. Os valores em azul indicam as amostras com salinidades mais baixas, caracterizando água doce. Valores de precipitação foram obtidos na semana das coletas

Fatores	Salinidade				
DATAS DAS COLETAS	Nov./21	Jan./22	Março/22	Maio/22	Ago./22
PRECIPITAÇÃO (mm)	0	1,4	98,0	114,6	23,7
Ponto 1	15,07	8,39	0,10	13,25	18,33
Ponto 2	12,61	7,08	0,17	12,62	17,32
Ponto 3	9,26	3,98	0,08	9,98	17,22
Ponto 4	6,66	4,50	0,10	10,87	14,14
Ponto 5	7,38	4,49	0,10	10,46	12,74
Ponto 6	7,45	4,34	0,10	9,28	11,02
Ponto 7	5,43	2,40	0,79	8,63	9,04
Ponto 8	3,99	1,92	0,05	5,56	7,21
Ponto 9	2,04	2,05	0,03	4,79	8,33
Ponto 10	2,60	1,00	0,04	4,06	5,15
Ponto 11	0,89	0,76	0,07	2,93	3,45
Ponto 12	0,51	0,59	0,02	2,04	3,47
Ponto 13	0,77	0,64	0,05	1,28	2,55
Ponto 14	0,23	0,40	0,02	0,83	---
Ponto 15	0,27	0,29	---	---	---

De maneira geral, considerando as coletas de novembro e janeiro, meses mais secos, foi possível observar os menores valores de salinidade ocorrendo do ponto 11 ao ponto 15.

Do ponto 11 a 15 – menores valores. Já dos pontos 01 a 03 foram obtidos os maiores valores de salinidade enquanto, nos pontos de 04 a 10 os valores foram medianos.

4.1.3. Temperatura

Os valores obtidos para temperatura, durante o período de estudo, em todos os pontos, variaram de 19,75°C a 27,22°C (Tabela VIII), sendo que os maiores valores foram observados em janeiro.

Considerando as variações de temperatura em cada mês de coleta, não foi possível observar grandes variações entre os pontos.

A temperatura apresentou uma variação sazonal comumente encontrada em regiões estuarinas tropicais (Camargo & Cancian, 2016), cujas temperaturas mais baixas são sempre observadas durante o outono e inverno e as mais altas durante o verão (Tabela 8).

Não foram observadas diferenças significativas entre as temperaturas e os 15 pontos de coleta em uma mesma campanha.

Tabela 8. Temperatura (°C) da água e índices de precipitação em todos os pontos de coleta, nas 5 campanhas amostrais.

Fatores	TEMPERATURA (° C)				
DATAS DAS COLETAS	Nov./21	Jan./22	Mar./22	Mai./22	Ago./22
PRECIPITAÇÃO (mm)	0	1,4	98,0	114,6	23,7
Ponto 1	22,84	27,09	22,92	21,40	20,77
Ponto 2	23,00	27,20	23,10	20,07	20,60
Ponto 3	22,66	27,11	22,87	20,72	20,70
Ponto 4	22,66	27,14	22,83	20,64	20,64
Ponto 5	22,49	26,98	22,88	20,61	20,59
Ponto 6	22,86	27,01	22,92	20,53	20,67
Ponto 7	22,56	27,22	23,60	20,46	20,40
Ponto 8	22,53	26,78	23,02	20,26	20,48
Ponto 9	22,44	26,51	23,00	20,18	20,56
Ponto 10	22,67	26,37	23,22	20,13	20,28
Ponto 11	22,27	26,34	23,43	20,00	20,25
Ponto 12	22,35	26,17	23,06	19,93	20,15
Ponto 13	22,39	26,07	23,17	19,75	20,08
Ponto 14	22,90	26,05	22,92	19,81	---
Ponto 15	22,13	25,92	---	---	---

4.2. Densidades de Bactérias Indicadoras

4.2.1 Densidade de *Escherichia coli*

Os valores obtidos quanto aos resultados das densidades de *Escherichia coli* encontrados nas águas do rio Itanhaém, durante todo o período de estudo, estão apresentados na Tabela 9.

As densidades de *E. coli* variaram, considerando todos os pontos de coleta em todo período de estudo, de 212 a > 3000 UFC 100ml^{-1} . De acordo com a tabela 9 é possível observar que as densidades de *E. coli*, foram abaixo ao valor de 1000 UFC 100ml^{-1} em 9 amostras ou seja 11% de um total de 70 amostras

Densidades de *E. coli* acima de 1000 UFC 100ml^{-1} foram obtidas em 61 amostras de um total de 70 ou seja 89% dos resultados, com destaque para as coletas de maio, na qual todos os pontos apresentaram densidades superiores a 3000 UFC 100ml^{-1} .

As menores densidades de *E. coli* foram obtidas nas amostras de água doce, coletadas mais próximas à nascente do rio, com os menores valores ocorrendo durante os meses de novembro e agosto, nos pontos 11 ao 15 (Figura 12).

Tabela 9 – Densidades de *Escherichia coli* (UFC 100ml⁻¹) nas amostras de água nos 15 pontos de coletas do Rio Itanhaém, nas 5 campanhas de amostragem, de novembro de 2021 a agosto de 2022. Os números em vermelho indicam valores acima dos permitidos na legislação CONAMA 357 (1000 UFC 100ml⁻¹).

Pontos de Coletas	Novembro/21	Janeiro/22	Março/22	Maio/22	Agosto/22
1	>3000	>3000	>3000	>3000	6370
2	>3000	>3000	>3000	>3000	5250
3	>3000	>3000	2460	>3000	5895
4	>3000	>3000	>3000	>3000	6035
5	2570	>3000	>3000	>3000	5860
6	>3000	>3000	>3000	>3000	4625
7	2955	>3000	>3000	>3000	4535
8	2405	1550	2490	>3000	1510
9	953	>3000	2750	>3000	1935
10	2265	1830	>3000	>3000	1110
11	640	1130	1260	>3000	585
12	302	1120	2940	>3000	620
13	392	1190	1140	>3000	835
14	300	>3000	—	>3000	—
15	212	2520	—	—	—

Cabe ressaltar que o gradiente crescente das densidades de *E. coli* nos pontos de coleta ocorreu no sentido da nascente para a foz do rio, maiores valores ocorrendo, de maneira geral, nos pontos mais próximos aos adensamentos urbanos, entre os pontos 1 ao 7, em todas as coletas realizadas. (Figura 12).

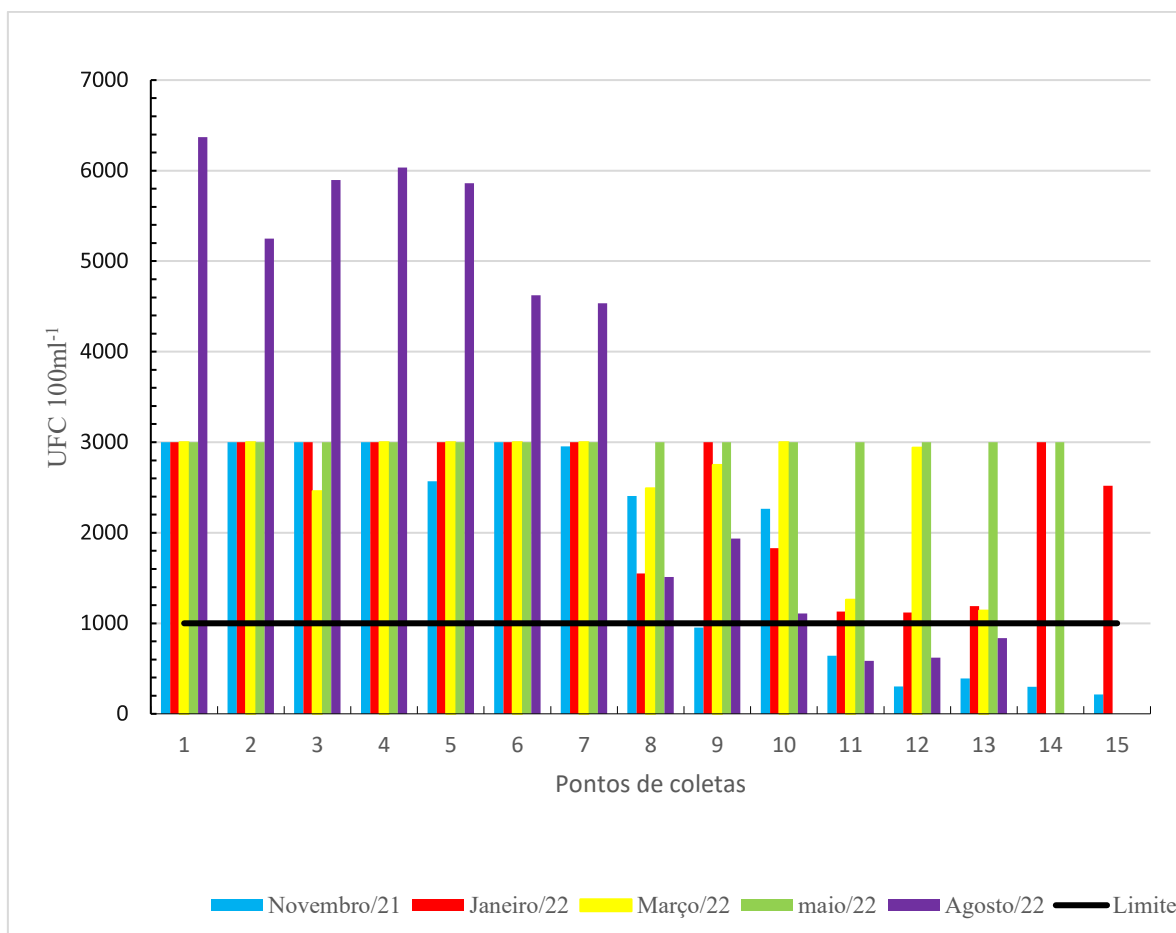


Figura 12. Variação das densidades de *Escherichia coli* (UFC 100ml⁻¹) nos 15 pontos de coleta do Rio Itanhém, durante todo o período de coleta. A linha preta no gráfico de *E. coli* indica o valor máximo permitido pela legislação CONAMA 357 (1000 UFC 100ml⁻¹).

A Figura 12 mostra que as maiores densidades bacterianas ocorreram nos pontos de 01 a 07 enquanto que, nos pontos de 11 a 15, foram obtidas as menores densidades, inclusive com valores dentro dos limites permitidos na legislação.

4.2.1.1. *Escherichia coli* e Fatores Abióticos

Para analisar as possíveis relações existentes entre as densidades de *E. coli* e os fatores abióticos mensurados, foi realizado o teste de Correlação de Pearson. Os valores de correlação (r) obtidos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre as densidades de *Escherichia coli* e cada um dos fatores abióticos: Precipitação (mm), Salinidade e Temperatura (°C).

Pontos de Coletas	Precipitação (mm)	Salinidade	Temperatura (°C)
1	-0,24	0,58	-0,51
2	-0,24	0,63	-0,44
3	-0,32	0,86	-0,43
4	-0,24	0,70	-0,45
5	-0,16	0,61	-0,43
6	-0,24	0,59	-0,45
7	-0,23	0,57	-0,48
8	0,74	-0,32	-0,45
9	0,57	0,39	0,12
10	0,76	-0,45	-0,04
11	0,78	0,28	-0,31
12	0,95	-0,19	-0,16
13	0,76	0,04	-0,38
14	0,51	0,72	0,01
15	0,51	1,00	1,00

Em relação a Temperatura e as densidades bacterianas, os valores de r obtidos foram negativos na maioria dos pontos de coleta, à exceção dos pontos 9, 14 e 15, mostrando a existência de correlação inversamente proporcional entre os fatores (Tabela. 10) entretanto, a relação foi fraca ($< 0,5$) em todos os pontos, à exceção do ponto 15.

Já com relação aos valores de correlação entre a precipitação e as densidades de *E. coli*, foi possível afirmar que, nos pontos de coleta de 08 a 15, mais próximos à nascente e com menor ocupação humana, os valores de (r) obtidos foram positivos, indicando a existência de uma relação direta entre as densidades de *E. coli* e índices de precipitação, ou seja, um aumento de precipitação coincidiu com aumento nas densidades bacterianas.

Já na porção do rio mais próxima a Foz e com maiores áreas ocupadas, pontos 1 a 7, os valores de correlação foram negativos mostrando relação inversa entre a densidade de bactérias e os índices de precipitação, ou seja, um aumento da precipitação foi coincidente a diminuição na densidade de *E. coli*.

Correlações mais fortes ($r > 0,5$) entre precipitação e densidades de bactérias foram obtidas nos pontos de coleta de 08 a 15, região mais próxima à nascente, o que indica que, nas

regiões com menores ocupações humanas, os resultados mais previsíveis ocorrem com menor interferência de fatores antrópicos externos ao ambiente. Enquanto que, nos pontos mais próximos à Foz, com maior ocupação humana, a interferência de outros fatores (ocupação, despejos de esgotos domésticos, agricultura, criação animal) as correlações foram fracas ($r < 0,25$).

Valores de r (acima de 0,5) foram obtidos nos pontos de coleta de 1 a 7, 14 e 15 indicando uma correlação direta de moderada a forte entre estes fatores (Densidade de *E. coli* e Salinidade).

Em relação à correlação entre as densidades de *E. coli* e a salinidade, em 12 dos 15 pontos de coletas, os valores de r obtidos foram positivos, indicando a existência de uma relação direta.

Na Figura 13 é possível observar que, à exceção do mês de março, em todas as outras coletas, a diminuição da salinidade foi acompanhada pela diminuição das densidades bacteriana

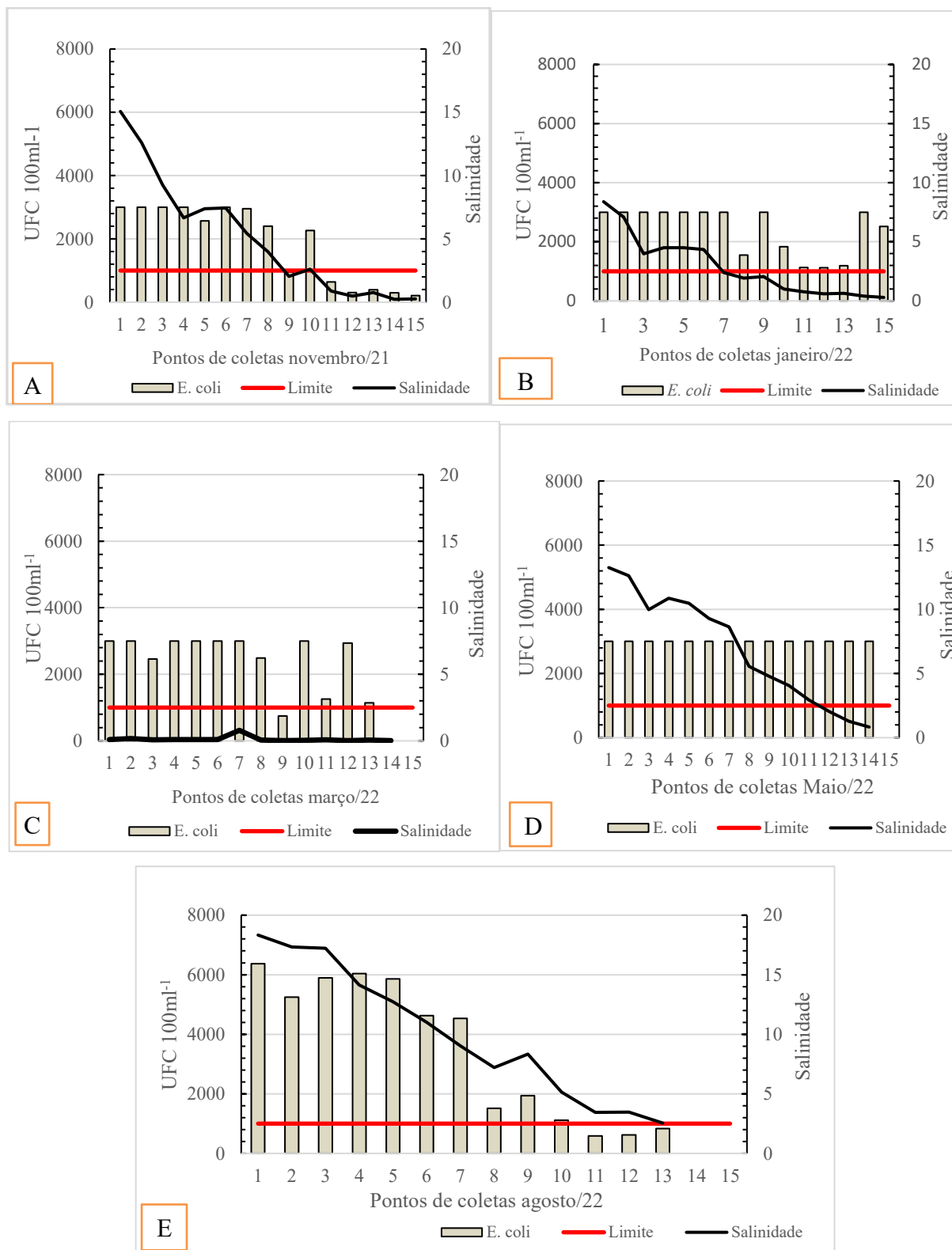


Figura 13. Variação das densidades de *E. coli* e dos valores de salinidade, em todos os pontos de coleta, durante todo o período de estudo, (A) novembro/21, (B) janeiro/22, (C) março/22, (D) maio/22 e (E) agosto/22. A linha vermelha no gráfico representa o valor máximo (1000 UFC 100ml⁻¹) de *E. coli* permitido pela legislação.

4.2.2 Densidade de *Enterococcus* sp

Os valores obtidos quanto às densidades de *Enterococcus* sp encontrados nas águas do rio Itanhaém, durante todo o período de estudo, estão representados na Tabela 11.

As densidades de *Enterococcus* sp variaram, considerando todos os pontos de coleta em todo período de estudo, de 190 a 4500 UFC 100ml⁻¹. De acordo com a Tabela 11 é possível observar que as densidades de *Enterococcus* sp, foram abaixo ao valor de 400 UFC 100ml⁻¹ em 22 amostras, de um total de 70 amostras, ou seja 31%.

Densidades de *Enterococcus* sp acima de 400 UFC 100ml⁻¹, em 48 de um total de 70 amostras, ou seja 69% das amostras com destaque para as coletas de março e maio, nas quais quase todos os pontos tiveram densidades superiores a 400 UFC 100ml⁻¹ com exceção do ponto 12 em maio.

Tabela 11. Densidades de *Enterococcus* sp (UFC 100ml⁻¹) nas amostras de água nos 15 pontos de coleta no Rio Itanhaém, nas 5 campanhas de amostragem, de novembro de 2021 a agosto de 2022. Os números em vermelho indicam valores acima dos permitidos pela legislação CONAMA 274 (400 UFC 100ml⁻¹).

Pontos de Coletas	Novembro/21	Janeiro/22	Março/22	Maio/22	Agosto/22
1	385	1364	3660	3330	825
2	398	1022	4402	3220	940
3	356	744	3424	4500	755
4	350	1583	2570	2320	1055
5	433	1001	2676	1700	855
6	409	1417	2434	1620	910
7	429	431	3862	3000	865
8	374	187	2280	1650	460
9	428	210	3602	1580	500
10	402	184	2790	1440	350
11	387	147	1888	1660	250
12	239	199	3600	370	250
13	418	53	2488	1170	190
14	348	194	---	1780	---
15	284	174	---	---	---

As menores densidades de *Enterococcus* sp foram obtidas nas amostras de água doce, coletadas mais próximas à nascente do rio, com exceção das semanas de maiores precipitações.

Cabe ressaltar que o gradiente crescente das densidades de *Enterococcus* sp nas coletas de janeiro a agosto apresentaram-se no sentido da nascente para a foz do rio, com os maiores valores ocorrendo, nos pontos mais próximos aos adensamentos urbanos, entre 1 e 7 em janeiro e entre 1 e 9 em agosto (Figura 14).

Durante o mês de novembro/21 as densidades de *Enterococcus* sp apresentaram valores entre 239 e 433 UFC 100ml⁻¹ entre os pontos, sendo apenas 6 pontos com valores acima de 400 UFC 100ml⁻¹ (Figura 14).

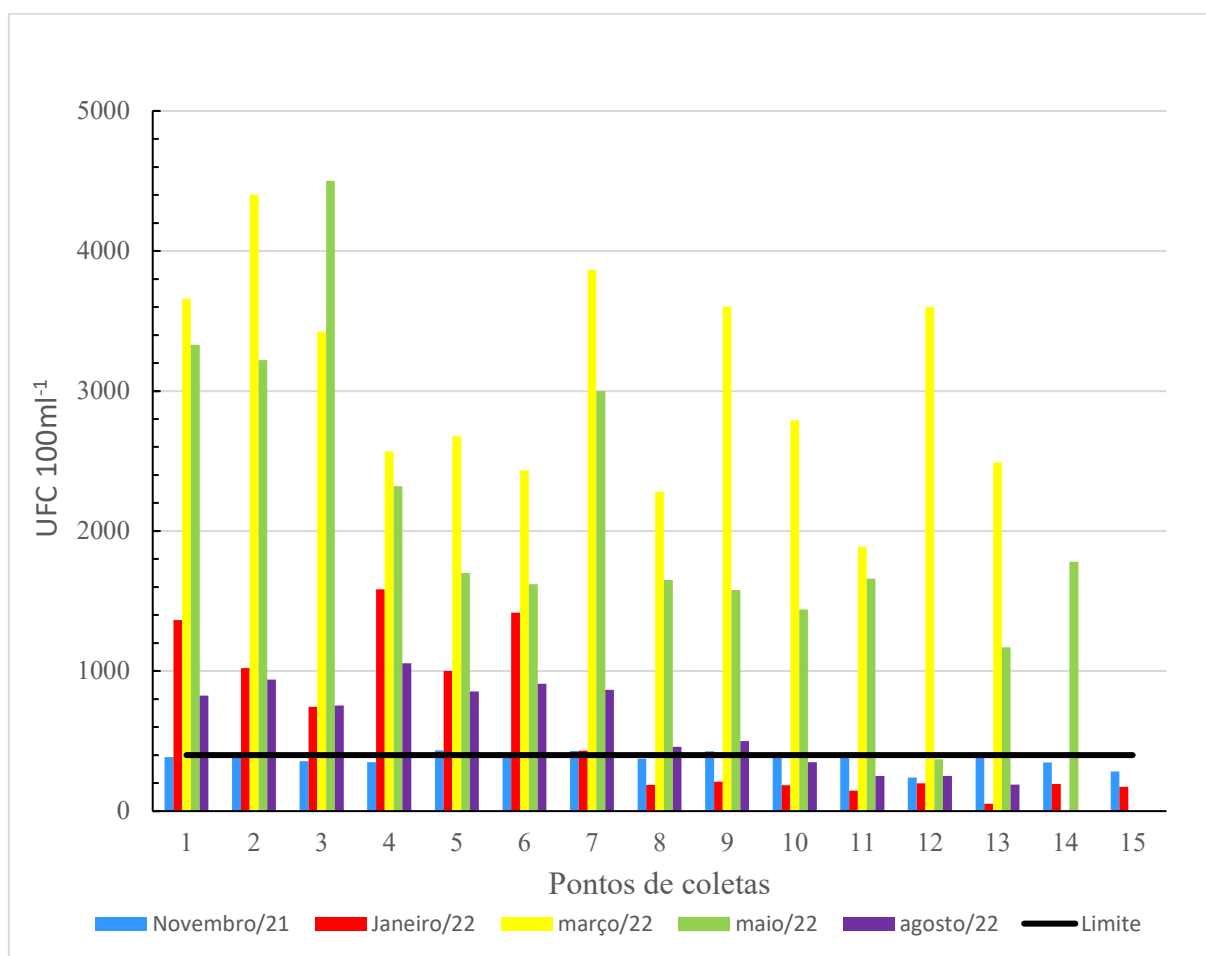


Figura 14 - Densidades de *Enterococcus* sp (100ml UFC 100ml⁻¹) nos 15 pontos de coleta do Rio Itanhém, durante todo o período de coleta. O limite representado pela linha preta no gráfico (400 UFC 100ml⁻¹) de *Enterococcus* sp indicam o valor máximo permitido pela legislação

4.2.2.1 *Enterococcus* sp e os Fatores Abióticos

Para analisar as possíveis relações existentes entre as densidades de *Enterococcus* sp e os fatores Abióticos mensurados, foi realizado o teste de Correlação de Pearson. Os valores de correlação (r) obtidos estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre as densidades de *Enterococcus* sp e cada um dos fatores abióticos: Precipitação (mm), Salinidade e Temperatura (°C)

Pontos de Coletas	Precipitação (mm)	Salinidade	Temperatura (°C)
1	0,94	-0,68	-0,13
2	0,92	-0,65	-0,25
3	0,99	-0,30	-0,45
4	0,85	-0,37	-0,03
5	0,84	-0,59	-0,08
6	0,75	-0,70	0,09
7	0,95	-0,21	-0,26
8	0,93	-0,39	-0,33
9	0,80	-0,48	-0,16
10	0,84	-0,46	-0,14
11	0,96	-0,14	-0,26
12	0,55	-0,50	0,13
13	0,80	-0,56	-0,09
14	1,00	0,93	-0,90
15	-1,00	-1,00	-1,00

Em relação à precipitação e as densidades de *Enterococcus* sp, os valores de (r) obtidos foram todos positivos, à exceção do ponto 15, e acima de 0,5, indicando a existência de uma forte relação direta entre a densidade de *Enterococcus* sp e a precipitação. Ou seja, quando a

precipitação aumenta, as densidades de *Enterococcus* sp também aumentam e vice-versa. Não foi possível observar diferenças entre a correlação destes fatores entre os pontos mais próximos à nascente ou à Foz, à semelhança do que foi possível para *E. coli*.

Já considerando a salinidade, os resultados obtidos (Tabela 12) foram diferentes daqueles esperados com base em dados da literatura. Os valores de (r) obtidos nos testes entre densidades de *Enterococcus* sp e a salinidade, foram todos negativos, indicando uma relação inversamente proporcional. Ou seja, aumentos na salinidade coincidem com diminuições nas densidades de bactérias enquanto que, em salinidade maiores, as densidades de bactérias diminuem.

Cabe destacar que, além de inversamente proporcional, os valores de r obtidos nos pontos demonstraram forte relação inversa entre salinidade e a densidade de bactérias ($<0,5$) na maioria dos pontos de coleta.

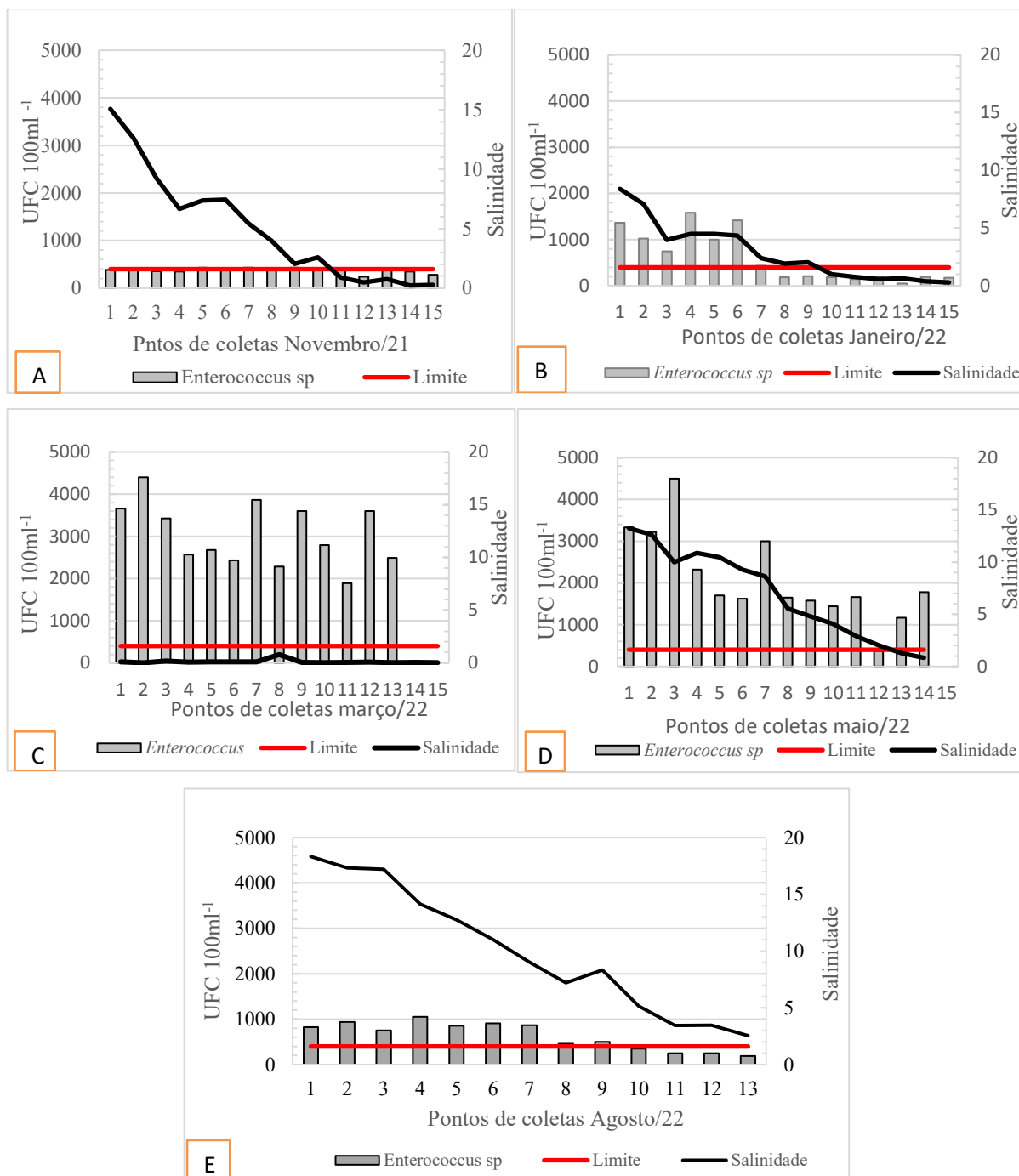


Figura 15 – Variação das densidades de *Enterococcus* sp (UFC 100ml⁻¹) e dos valores de salinidade, em todos os pontos de coleta, durante todo o período de estudo, (A) novembro/21, (B) janeiro/22, (C) março/22, (D) maio/22 e (E) agosto/22. Os limites representados pela linha vermelha no gráfico indicam o valor máximo permitido pela legislação CONAMA 274 400 UFC 100ml⁻¹.

Em relação a temperatura, conforme é possível observar na Tabela 12, a correlação com a densidade de *Enterococcus* sp foi negativa, com exceção do ponto 12, demonstrando a existência de uma relação inversamente proporcional, ou seja, aumentos de temperatura são acompanhados por diminuição nas densidades de bactérias e vice-versa.

4.3 Análises Metagenômica

4.3.1. Densidades de Bactérias Indicadoras

Concomitantemente às coletas de amostras para a realização das análises de metagenômica, também foram coletadas amostras, no mesmo local, para determinação da salinidade e das densidades das bactérias indicadoras, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp.

A Tabela 13 apresenta os valores de salinidade e de densidades de bactérias presentes, quando das coletas para as análises moleculares, em águas doces, salobras e salinas. Observando a tabela é possível notar que, o maior valor de densidade de *Enterococcus* sp ocorreu na água doce, enquanto que, para *E. coli*, a maior densidade foi obtida em água salobra.

Tabela 13. Densidades de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp em água doce (0,1), salobra (15,0) e água salgada (35,0).

Densidade em UFC 100ml-1	Salinidade 0,1	Salinidade 15,0	Salinidade 35,0
<i>Escherichia coli</i>	980	>3000	1130
<i>Enterococcus</i> sp	910	900	300

4.3.2. Abundância, Diversidade e Riqueza (no total de amostras)

A composição da comunidade bacteriana, considerando o total dos três ambientes estudados, água doce, salobra e salgada, foi analisada em diferentes níveis taxonômicos, Filo, Classe e Espécie.

Os Filos identificados foram, *Proteobacteria*, *Bacteroidete*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* e *Bacillota*

Dentro do Filo Proteobactéria foram identificadas 4 Classes distintas, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. No Filo *Bacteroidete* foram identificadas 4 classes sendo a *Cytophagia* com maior abundância. O

Filo *Actinobacteria* foi identificado com 2 Classes sendo a *Actinobacteria* com maior abundância. O Filo *Cyanobacteria* foram identificadas 2 ordens sendo a *Synechococcales* com maior abundância.

Em relação à frequência, considerando os 3 tipos de ambientes juntos, as 10 espécies que ocorreram mais vezes nas amostras coletadas foram identificadas como *Arcobacter cryaerophilus*, *Synechococcus* sp., *Limnohabitans curvus*, *Candidatus Pelagibacter ubique*, *Curvibacter delicatus*, *Candidatus Rhodoluna limnophila*, *Novosphingobium resinovorum*, *Methylocystis parvus* e *Sulfuricurvum kujiense*. (Figura 16A).

Já em relação a abundância de espécies, as 10 espécies mais abundantes foram identificadas como *Aestuarium zhoushanense*, *Polynucleobacter necessarius*, *Marinobacterium* sp, *Arcobacter cryaerophilus*, *Methylocella* sp, *Aquirufa antheringensis*, *Roseivivax lentus*, *Bacteroidetes bacterium*, *Gammaproteobacteria bacterium*, *Citricella marina*. (Figura 16B).

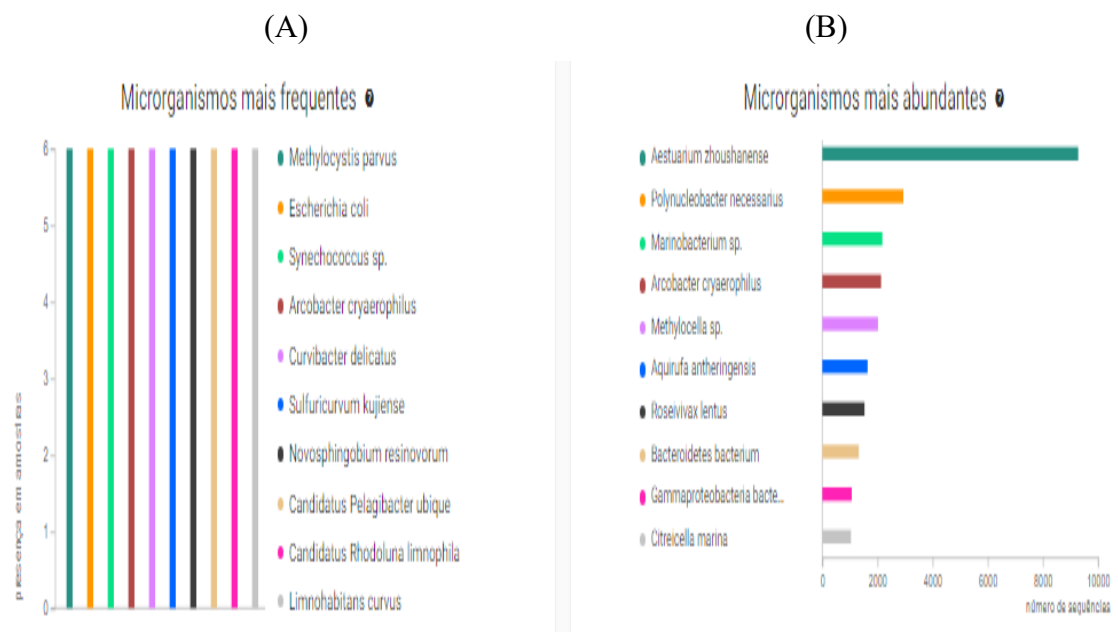


Figura 16. Espécies bacterianas mais frequentes (A) e espécies mais abundantes (B), considerando o conjunto de águas Doces, Salobras e Salinas.

4.3.3. Abundância, Frequência e Diversidade (água doce, salobra e salina)

Foram obtidas, no total, 34977 sequências, sendo 11189 em água doce, 12967 em água salobra e 10821 em água salina (Figura 17). A ordem crescente da abundância das sequências obtidas nos 3 tipos de água foi salobra>doce>salina.



Figura 17. Distribuição do número de sequências obtidas em amostras de água Doce, Salobra e Salgada.

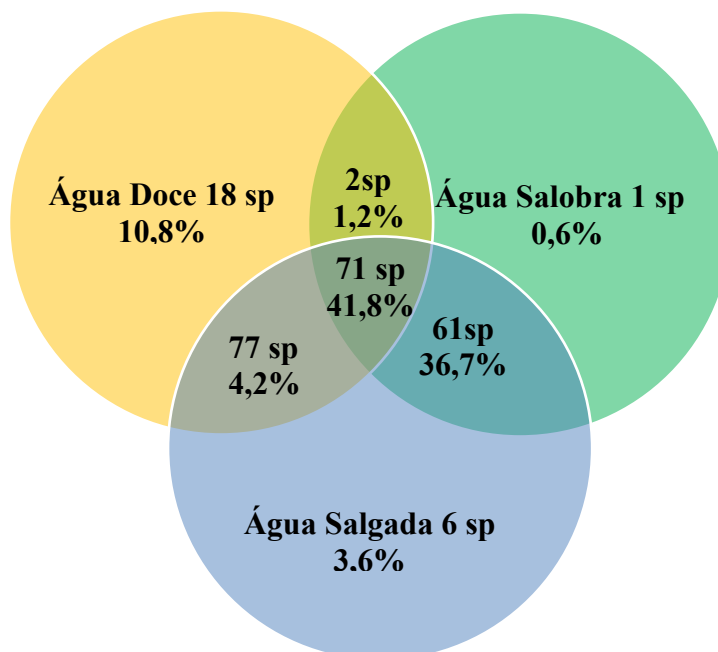


Figura 18. Distribuição das 166 espécies no Diagrama de Venny 2.1 – (Oliveros, JC, 2007-2015) Indicando a comunidade bacteriana core e comunidades únicas presentes nos diferentes ambientes de água doce, salobra e salgada.

4.3.3.1 Ocorrência dos Principais Filos

Na água doce, o Filo mais abundante foi *Proteobacteria* com 6764 sequências (60% comparado com o total). O *Bacteroidete* foi o segundo maior Filo com 2915 sequências (26% do total) e o terceiro Filo foi a *Actinobactéria* com 1439 sequências (13%). Os outros filos apresentaram números de sequências bem menores, sendo o Filo *Bacillota*, com 41 sequências e o Filo *Cyanobacteria* com 30 sequências, o quarto e o quinto, respectivamente, ambos representando 1% ou menos do total. (Figura 19).

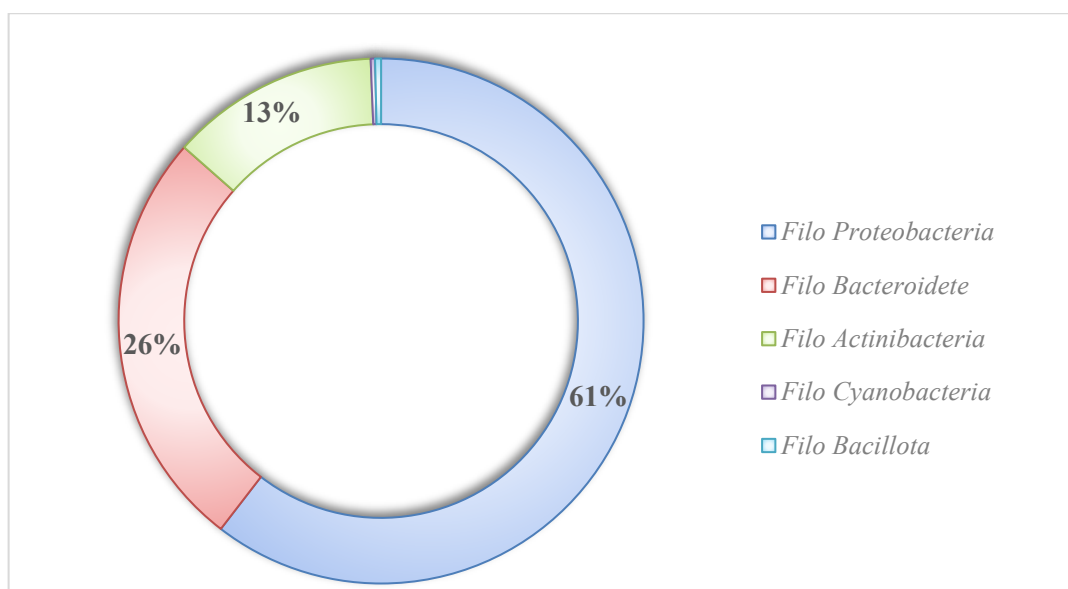


Figura 19. Porcentagem (%) de Filos mais abundantes identificados nas amostras de água Doce.

Já com relação a água salobra o Filo de maior abundância foi a *Proteobacteria*, com 11.962 sequências com 92% de ocorrência comparados com os outros Filos. Os *Bacteroidetes* foram o segundo Filo com 435 sequências (4%) e *Cyanobacterias* foram o terceiro Filo com 256 sequências (2%). O quarto filo com maior número de sequências foi *Actinobactérias* com 174 sequências (1%) e o quinto Filo foi o *Bacillota* com 140 sequências (1%). (Figura. 20).

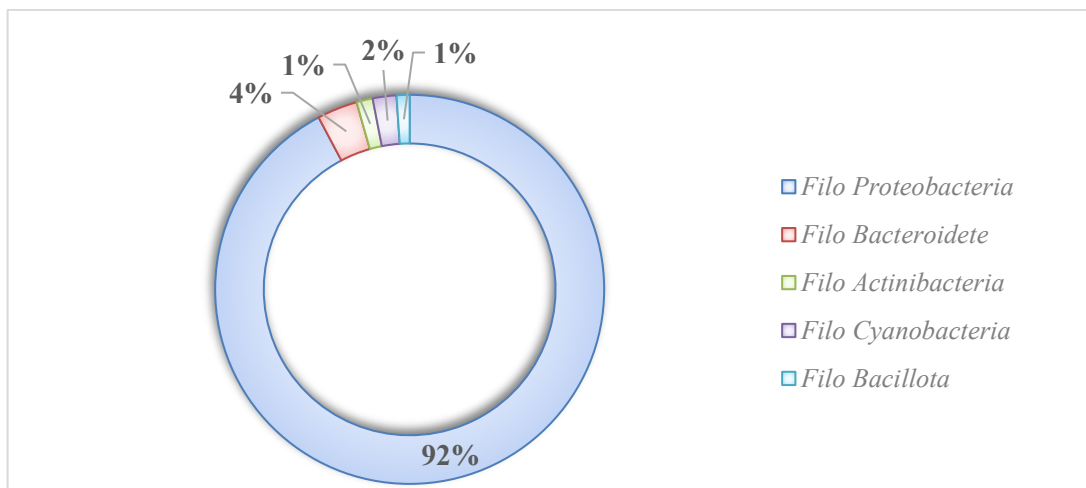


Figura 20. Porcentagem (%) de Filos mais abundantes identificados nas amostras de água Salobra.

O Filo de maior abundância na água salina foi *Proteobacteria*, com 9169 sequências compreendendo 85% do total de sequências. O segundo Filo mais abundante foi *Cyanobacteria* com 1222 sequências (11%) e o terceiro *Bacteroidete* com 254 sequências (2%). O quarto e o quinto Filo em abundância na água salina foram respectivamente, *Bacillota* com 93 sequências e *Actinobacterias* com 83 sequências (1%). (Fig. 21).

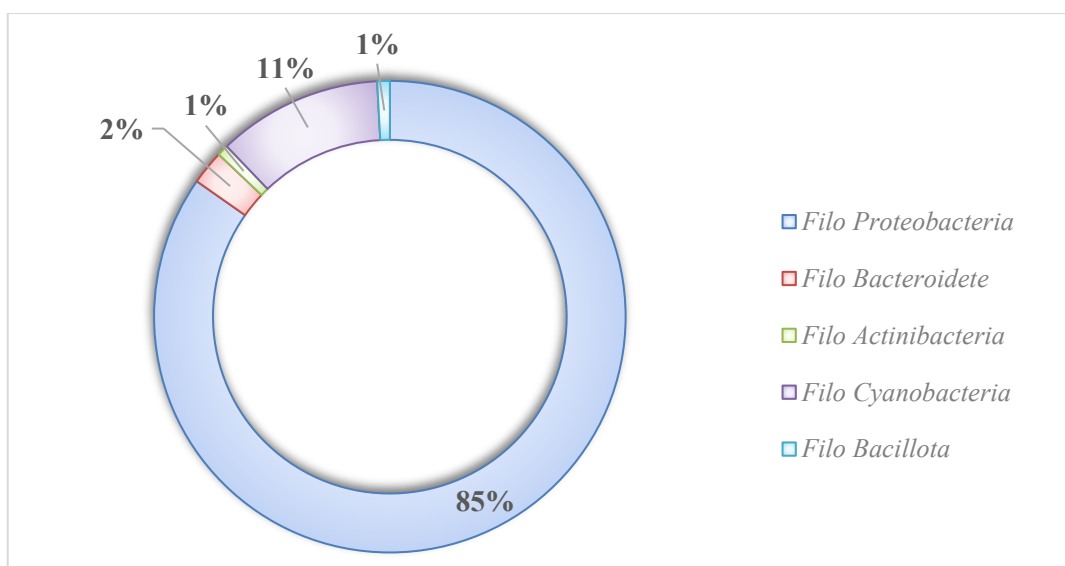


Figura 21. Porcentagem (%) de Filos mais abundantes identificados nas amostras de água Salina.

4.3.3.2 Diversidade das Espécies

Já, a diversidade de sequências em água salgada foi muito semelhante àquelas da água salobra, 145 e 135 espécies, respectivamente. Já em água doce, foram obtidas 98 espécies. Estes resultados mostram maior diversidade bacteriana ocorrendo em águas salobras e salinas.

4.3.3.2.1 Diversidade das Espécies mais Abundantes

As espécies mais abundantes em águas doces foi a *Polynucleobacter necessarius* enquanto que, *Aestuarium zhoushanense* foi mais abundante tanto em águas salobras quanto em águas salgadas (Tabela 14 e Figura 22)

Foram observadas 2 espécies que ocorreram apenas em água doce, a *Methylocella* sp e a *Bacteroidetes bacterium*. (Tabela 14 e Figura 22)

Já em relação as espécies que ocorreram apenas em águas salobras e salgadas, foram 4 espécies, *Marinebacterium* sp, *Roseivivax lentus*, *Gammaproteobacteria bacterium* e *Citricella marina* (Tabela 14 e Figura 22).

Tabela 14. Microrganismos mais abundantes, total de sequências por espécie e a distribuição dos organismos em água Doce, Salobra e Salina e suas porcentagens

Microrganismos	Água doce Sequencias	Água doce %	Água Salobra Sequencias	Água Salobra %	Água Salgada Sequencias	Água Salgada %
<i>Aestuarium zhoushanense</i>	50	<1	5197	52	4032	54
<i>Polynucleobacter necessarius</i>	2608	35	218	2	111	2
<i>Marinobacterium</i> sp.	0	0	1247	12	930	12
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	18	<1	1339	13	773	1
<i>Methylocella</i> sp.	2017	27	0	0	0	0
<i>Aquirufa antheringensis</i>	1484	20	114	1	43	1
<i>Roseivivax lentus</i>	0	17	849	9	680	9
<i>Bacteroidetes bacterium</i>	1323	18	0	0	0	0
<i>Gammaproteobacteria bacterium</i>	0	0	505	5	561	7
<i>Citricella marina</i>	0	0	632	6	406	5

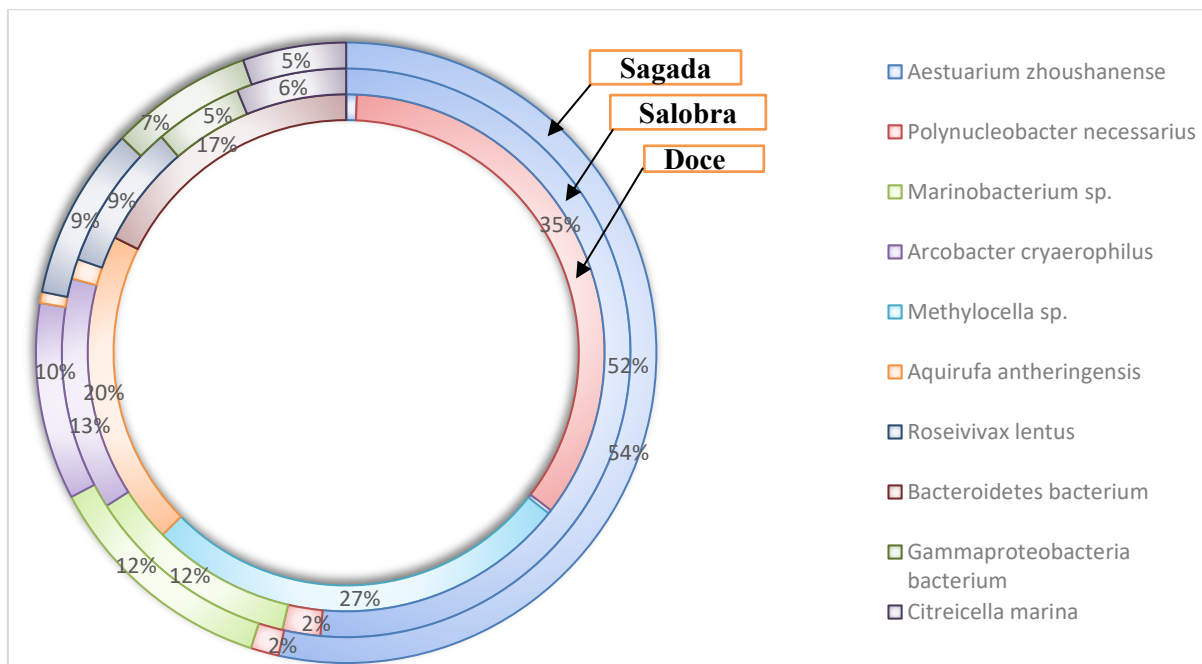


Figura 22. Bactérias mais abundantes e suas porcentagens de ocorrência em águas Doces, Salobras e Salinas

4.3.3.2.2 Diversidade das Espécies mais Frequentes

Em relação à frequência, foram 3 as espécies que mais apareceram nas coletas de água doce, *Limnohabitans curvus*, *Curvibacter delicatus* e *Candidatus Rhodoluna limnophila*. Já as espécies mais frequentes foram as mesmas para água salobra e salgada, *Arcobacter cryaerophilus*, *Synechococcus sp* e *Candidatus Pelagibacter ubique*. Embora *Synechococcus sp* tenha sido frequente nos 3 ambientes, sua ocorrência foi maior em água salgada (Tabela 15 Figura 23).

Tabela 15. Microrganismos mais frequentes, total de sequências por espécie e a distribuição dos organismos em água doce, salobra e salgada e suas porcentagens.

Microrganismos	Água doce Sequencias	Água doce %	Água Salobra Sequencias	Água Salobra %	Água Salgada Sequencias	Água Salgada %
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	18	2	1339	83	773	47
<i>Synechococcus</i> sp.	25	3	101	6	664	40
<i>Limnohabitans curvus</i>	310	36	25	2	14	11
<i>Candidatus Pelagibacter ubique</i>	2	<1	76	5	142	9
<i>Curvibacter delicatus</i>	174	20	6	< 1	5	<1
<i>Candidatus Rhodoluna limnophila</i>	170	20	12	1	2	<1
<i>Escherichia coli</i>	50	6	18	1	38	2
<i>Novosphingobium resinovorum</i>	48	6	25	2	7	<1
<i>Methylocystis parvus</i>	45	5	5	<1	2	<1
<i>Sulfuricurvum kujiense</i>	15	2	13	1	6	<1

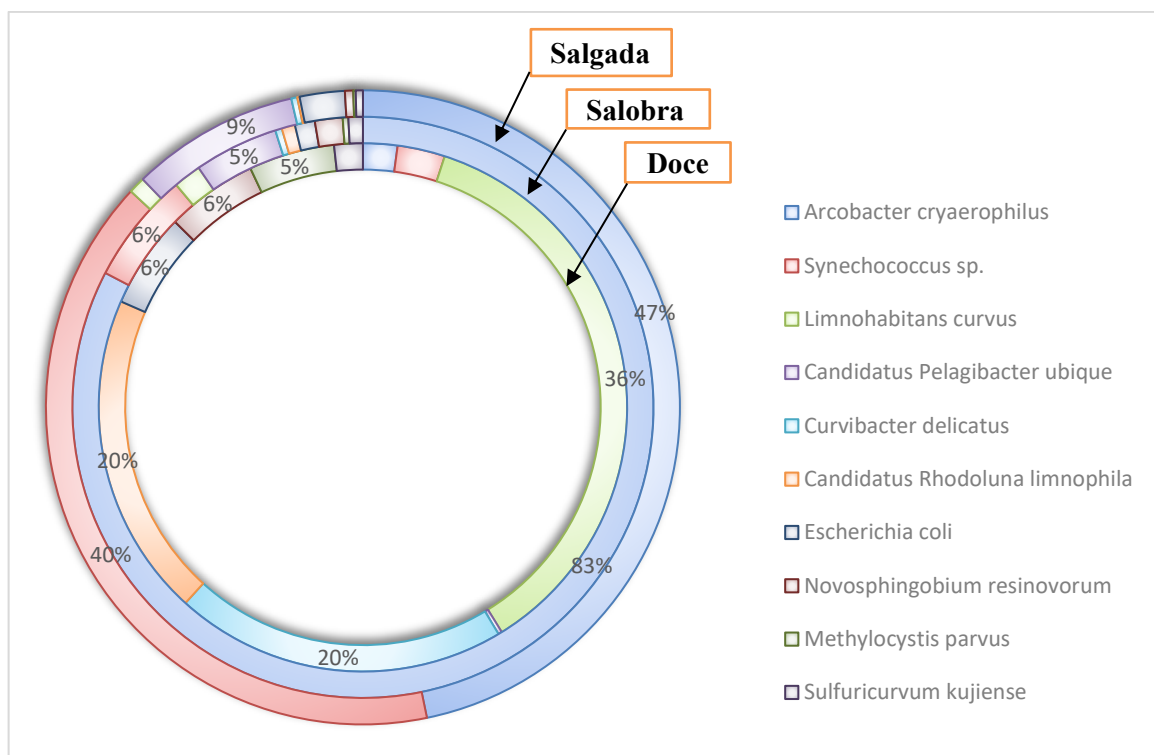


Figura 23. Espécies mais frequentes e suas porcentagens de ocorrência, identificadas em amostras de águas Doce, Salobra e Salina

4.3.4 Índice de Diversidade

A diversidade foi avaliada pelo índice de Shannon, enquanto a riqueza foi determinada pelo número de OTUs sequências identificadas. Os valores de diversidade de Shannon foram 2,54; 2,59 2,67 e a riqueza bacteriana foi determinado pelo número de sequências 10821; 12967 e 11189 respectivamente, água doce, água salobra e água salgada.

Os índices de diversidade obtidos em águas doce, salobra e salina podem ser classificados como elevados de acordo com o índice Shennon-Wiener (Tabela 16), não havendo diferenças expressivas entre os 3 tipos de águas. Ou seja, a comunidade bacteriana na parte doce do rio é tão diversa quanto aquelas de águas salobras e salinas.

Na água salgada foi observado o maior valor do índice de Shennon-Wiener 2,67.

Tabela16: Índice de diversidade de Shannon-Wiener e Equabilidade de Pielou

Índice	Água doce	Água Salobra	Água Salgada	Faixa de Valores
Diversidade Shennon-Wiener	2,54	2,59	2,67	1,5 a 3,5
Equabilidade Pielou	0,55	0,53	0,54	0 a 1

5. DISCUSSÃO

5.1 Bactérias Indicadoras Fecais

Os estuários marinhos urbanos estão frequentemente impactados por contaminação de diversas origens lançadas no meio desde efluentes industriais, processo de drenagem agrícola (fertilizantes e agrotóxicos), derrames acidentais e não acidentais de lixo químico e domiciliares, bem como esgoto doméstico e industriais compostos orgânicos e inorgânicos por fontes pontuais e difusas, que acabam chegando aos rios aos mares gerando a contaminação do sistema hídrico (Crowell, et al., 2007; Prakit, et al. 2020).

Embora a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) tenha programas de monitoramento da qualidade dos corpos hídricos interiores, no caso dos rios, este monitoramento é mais esporádico e no caso das águas superficiais do rio Itanhaém, ocorre em apenas um ponto no píer da sede da DAEE e com a periodicidade mensal. Deste modo, as informações sobre a qualidade microbiológica das águas do Rio Itanhaém e de outros na região são bastante escassas e, na maioria das vezes, índices elevados de contaminação fecal são justificados pelos órgãos ambientais municipais, como ocasionados pela precipitação elevada.

Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que, outros fatores, além da precipitação, são responsáveis pelo aumento da contaminação fecal do rio pois, apesar da alta precipitação ocorrida no mês de maio, a salinidade apresentou valores bastante altos comparados aos verificados no mês de março, no qual houve baixa precipitação. Isto ocorreu porque, no final de abril, mês anterior à coleta, foram registradas chuvas intensas, ventos e grande ressaca (Figura 11) ocasionando a entrada de água salgada e o aprisionamento da mesma no estuário do rio, resultando em valores de salinidade mais altos e maiores índices de contaminação já que o rio apenas recebeu os efluentes, não ocorrendo sua dispersão e diluição. (Boumgarten et al. 2001; Anderson et al. 2005; Melo 2015; Prakit et al. 2020).

No presente estudo, os valores obtidos para as densidades das bactérias indicadoras de contaminação fecal foram bastante elevados, sendo que, do total de amostras analisadas 89% excederam os valores permitidos pela legislação para *Escherichia coli* (CONAMA 357/05) enquanto que, do total de amostras analisadas de *Enterococcus* sp, 69% excederam a legislação (CONAMA 274/00). Ou seja, as densidades de bactérias indicadoras mostram elevados índices de contaminação, o que indica potenciais riscos à saúde humana e animal, associados a utilização da água do rio para fins de balneabilidade, pesca e uso domésticos a violação dos padrões de qualidade da água já foi relatada em outros estudos (Melo, 2015). Foi constatado que o ano todo, durante todas as coletas, as densidades de *E. coli* permanecem elevadas nos pontos próximos a foz do rio, com densidades acima da legislação. A medida em que os pontos avançaram em direção à nascente, as densidades de bactérias foram diminuindo, ou seja, as maiores densidades ocorreram na área de maior urbanização.

De fato, vários estudos mostraram que, na ausência de um tratamento de esgotos eficiente, o aumento da urbanização tem impactos significativos na qualidade das águas dos corpos hídricos (Pinto, et al. 2012; Garcia-Aljaro et al. 2018; Prakrit et al. 2020)

Já nos pontos inseridos em áreas menos urbanizadas, as densidades bacterianas foram bem menores, o que indica que a contaminação fecal por fontes pontuais é menor

A mesma tendência foi observada nas análises das densidades de *Enterococcus* sp, com as maiores densidades ocorrendo próximo a foz e as menores próximos à nascente.

De acordo com este padrão é possível inferir que, na região do rio próxima a nascente existe a predominância de poluição difusa com grande influência da precipitação no aumento das densidades de bactérias, pela lixiviação das áreas adjacentes. Enquanto que, na região do rio próxima à foz a predominância é de poluição pontual, intensa e constante, a qual não permite identificar a influência de outros fatores menos significativos (Maipa, et al. 2001)

A relação direta entre, urbanização sem saneamento adequado e perda da qualidade das águas (Sangodkar et al. 2020; Melo E Sarmiento, 2019), foi corroborada pelo aumento das densidades de *E. coli* e *Enterococcus* sp no mês de janeiro, período no qual a população flutuante tem aumentos expressivos (Melo, 2015) e, conseqüentemente também dos resíduos domésticos produzidos.

No período das férias escolares, a população de Itanhém que é de 112476 habitantes (Censo IBGE, 2022), chega a 300.000 habitantes, mais que o dobro de aumento na produção de resíduos.

Além do aumento da população do município, durante o período de veraneio, ocorrem grandes concentrações de pessoas em região próxima à foz do rio, na qual se concentram várias atividades turísticas tais como, bares, restaurantes, marinas, piers, entre outras (Camargo & Cancian, 2016).

A interferência das estações chuvosa e seca sobre a estrutura microbiana já vem sendo discutida em diversos trabalhos que fazem uso de bioindicadores, tais como Bouskill et al. (2010) e Islam et al. (2017).

No presente trabalho, as densidades de *E. coli* apresentaram correlação negativa com a precipitação nos pontos próximos a Foz enquanto que, em pontos mais próximos a nascente esta correlação foi positiva, embora fosse esperado que a correlação entre densidades de bactérias e precipitação fosse sempre direta (Maipa, et al. 2001) ou seja, aumento da precipitação com aumento nas densidades.

Neste estudo, a contaminação constante e persistente pelo despejo de esgotos domésticos provenientes da zona urbanizada e das áreas rurais foi tão elevada que mascarou o efeito da precipitação no aumento das densidades de bactérias. Em outras palavras, a salinidade teve um efeito muito menor do que aquele efeito constante ocasionado pelo despejo de efluentes domésticos.

Do mesmo modo, alguns estudos já avaliaram a influência da salinidade nas densidades de bactérias do grupo *Enterococcus* sp (Bernardo, 2007; Pinto et al. 2012. Em relação à salinidade, a relação com as densidades de *E. coli* foi positiva na grande maioria dos pontos. Este fato é muito importante pois pode indicar a existência de alguma afinidade da *E. coli* com ambientes salobros e salinos. (Prakit, et al. 2020)

Contrariamente, a correlação entre salinidade e *Enterococcus* sp foi negativa indicando que, quando aumenta a salinidade, diminui a densidade de bactérias o que pode indicar que, neste ambiente, as bactérias do grupo *Enterococcus* parece não ter afinidade por sal. Embora seja diferente do obtido em muitos estudos (Byappanahalli et al. 2006) outros trabalhos já apontaram (Pinto et al. 2012; Stradiotto, 2013)

Segundo os estudos realizados por Prakit, et al. (2020) no canal Ala Wai no Havai e por Graig et.al. (2004) em sedimentos, águas superficiais marinhas e salobra em Adelaide as densidades de *E. coli* foram maiores do que as de *Enterococcus* sp. em águas de maior salinidade.

A bactéria *Escherichia coli* geralmente é considerada mais susceptível ao estresse osmótico causado por altos níveis de salinidade do que *Enterococcus* sp e, portanto, decairia mais rapidamente nessas condições (Cabelli et al. 1982; Evison, et al. 1988). Esta foi uma das razões importante para a seleção de *Enterococcus* sp como indicadora ideal para avaliar a qualidade microbiológica de águas salobras e salinas (USEPA, 2012) (CONAMA 274/2000).

No presente trabalho, a observação de densidades mais elevadas de *E. coli* em águas salobras (até 18,33), contraria as bases e os conhecimentos nos quais se baseiam algumas legislações para o monitoramento da qualidade microbiológica das águas.

Alguns trabalhos têm comentado sobre a relação inversa entre a detecção de *Enterococcus* sp e a salinidade (Bernardo, 2007; Pinto et al. 2012; Stradiotto, 2013). Na Nova Zelândia, Sinton et al. (2002) mediante experimentos com mesocosmos utilizando águas doces e marinhas observaram maior persistência dos *Enterococcus* sp em águas doces que em águas marinhas. Anderson, et al. (2005) pesquisaram a persistência e a sobrevivência de *E. coli* e *Enterococcus* sp em águas doces e marinha. As taxas de diminuição de *E. coli* foram, significativamente, mais baixas que as de *Enterococcus* sp em águas doces, mas não foram, significativamente, diferentes em águas marinhas. Além disto, temos que considerar que os estudos que fundamentam as legislações vigentes foram realizados em outros países, no hemisfério norte, sob condições ambientais diferentes das nossas na América do Sul.

Maiores densidades bacterianas nos pontos com maiores salinidades podem indicar que o fator salinidade não seja tão estressante para a *E. coli* e a afinidade por sal de *Enterococcus* sp seja variável, de acordo com as características climáticas e ambientais dos locais avaliados.

De fato, comparando os resultados obtidos neste trabalho para as densidades de *E. coli* e de *Enterococcus* sp, é possível afirmar que a *E. coli* foi mais restritiva considerando águas salobras, já que, considerando os critérios para estas bactérias presentes na legislação, apenas 13% das amostras estariam dentro dos limites enquanto que, ao considerar os parâmetros da densidade de *Enterococcus* sp, 31% das amostras atenderiam aos valores da legislação.

5.2. Diversidade das Comunidades Bacterianas

A abundância de bactérias pertencentes ao filo *Proteobacteria* corrobora a informação de que este filo é um dos mais diversos e abundantes de microrganismos, contribuindo para funções ecológicas essenciais, como a degradação da matéria orgânica (Meyer et al. 2016),

também é o maior e o mais diverso grupo filogenético em ambientes aquáticos (Kerstens, et.al., 2006), compreendendo uma das maiores divisões de procariontes.

As 5 classes deste filo que ocorreram em maior abundância e diversificação de espécies nesse estudo, tanto em água doce quanto em águas salobras e salinas são caracterizadas por terem diferentes habitat como solo e água e sob diferentes condições de salinidade, temperatura, pH, oxigênio e nutrientes. Além disto, a presença e a abundância deste filo nas águas do rio Itanhaém indicam a presença e a influência de esgoto doméstico (Leite et.al., 2024).

Em relação as classes deste filo, a ocorrência da Classe *Alphaproteobacteria* predominando em águas salgadas e salobras e apresentando uma maior diversidade de espécies, corroboram os resultados obtidos por Cury, et al. (2011). As bactérias desta classe foram encontradas em maior abundância no trabalho de Gregoracci et al. (2012) em águas marinhas onde as atividades antropogênicas (descarga de esgoto) também eram maiores.

A Classe *Gammaproteobacteria* foram identificadas com maior abundância e diversidade nas águas salgadas e salobras. Em geral, a maior abundância relativa de sequências relacionadas a *Gammaproteobacteria* correspondeu aos achados de (Bernhard et al., 2005; Gregoracci et.al. 2012), que também estudaram a distribuição dos genes do 16S rRNA em maior abundância no sistemas estuarinos e marinhos.

A Classe *Epsilonproteobacteria* representa a menor e a mais recente linhagem reconhecida dentro das *Proteobactérias* (Garrity et.al., 2005; Hsu e Lee, 2015; Levican et al., 2016). A maior parte dessas bactérias encontradas no presente trabalho são patogênicas corroborando com o trabalho de Fera et.al. (2004); Merga et al., (2014) detectadas no ambiente costeiro do mar Mediterrâneo no Estreito de Messina Itália com atividade antropogênica.

O Filo *Cyanobacteria* são bactérias fotossintetizantes produtoras de oxigênio com alta capacidade adaptativa por isso vivem bem em vários ambientes como solo úmidos, água doce, salobra e salgada inclusive em ambientes extremos, são bactérias de grande importância para o meio ambiente desde os primórdios (Wang et al. 2017). No presente trabalho estão representadas por 2 classes, sendo a maior abundância é da classe *Synechococcales* em águas salgadas.

O Filo *Proteobacteria* também é um grupo predominante em água doce com a Classe *Betaproteobactéria* com uma maior diversidade de espécies corroborando com o trabalho de Newton et al., (2011) onde a correlação encontrada entre a abundância desse grupo de bactérias e sua produção ao longo de um gradiente salino, sugerindo que a diminuição na abundância

dessas bactérias em altas salinidades foi causada por seu crescimento lento nessas condições, também são comum em regiões com atividades antropogênicas

O Filo Bacteroidetes compreendia 3 classes (*Bacteroidia*, *Flavobacteriia* e *Sphingobacteriia*) recentes estudos, baseados na análise de sequência do gene 16S rRNA, justificam a formação de uma quarta classe *Cytophagy*, Nakagawa (2010) a qual foi identificada neste estudo como o segundo Filo mais abundante em água doce. Estas descobertas são consistentes com outros estudos que sugerem um dos Filos dominante em sistemas de água doce associadas à descargas de esgoto corroborando com os trabalhos de Nascimento, et al., (2018); Shi et al. (2021); Xie et al. (2022); Newton et al. (2011).

O Filo *Actinobacterias* são amplamente distribuídas no solo e água doce Newton, et. al. (2012), Han, et.al. (2016), No presente trabalho este Filo está representado por 2 classes sendo a maior abundância da classe *Actinobacteria* encontra-se representada pelas espécies nativas do bacteriopancton de água doce característicos de climas tropicais corroborando com o trabalho de Hahn, et.al. (2009).

5.2.1. Espécies mais abundantes em Água Doce:

As espécies *Polynucleobacter necessarius* (*Betaproteobacteria*), *Methylocella* sp (*Alphaproteobacteria*), *Aquirufa antheringensis* e *Bacteroidete bacterium* *Bacteroidetes* (*Cytophagy*) foram identificadas no presente trabalho em maior abundancia na água doce conforme descrito por Hosen et al., (2017); Mcdonald (2006); Thomas, et.al. (2012), são bactérias importantes para a reciclagem de nutrientes tanto no solo como na água associadas a atividades antropogênicas, muitas vezes podem ser carreadas do solo para rios e estuários mais próximos (Hahn et.al, 2009). A *Methylocella* sp é uma bactéria Metanotróficas facultativas, devido a sua versatilidade metabólica e fácil adaptação em ambientes de água doce e em solos úmidos (Tanvir- Rahman 2011). O *Bacteroidete bacterium* além de realizar a reciclagem de nutrientes também fazem a degradação de substâncias tóxicas como hidrocarbonetos e metais pesados tanto no solo como em rios auxiliando a preservação do meio (Thomas, et.al. 2011).

5.2.2 Espécies mais abundantes em Águas Salobra e Salgada

Aestuarium zhoushanense (*Alphaproteobacteria*), *Marinobacterium* sp. (*Gammaproteobacteria*), *Roseivivax lentus* (*Alphaproteobacteria*), *Citreicella marina* (*Alphaproteobacteria*), *Gammaproteobacteria bacterium* (*Gammaproteobacteria*) foram

bactérias identificadas em águas salobras e salinas em maior abundância o que corrobora com os trabalhos de Xiao-Yun et.al. (2017), Sooyeon et.al. (2010), Lai, et.al. (2011), Jiang et al. (2007), Durán-Viseras et.al. (2021), são bactérias que realizam a ciclagem de nutrientes em ambientes costeiros, estuarinos e lagos salinos são halofílicas e algumas moderadamente halofílicas, crescem em uma ampla variedade de temperatura, são associadas a áreas com atividades antropogênicas. A *Citricella marina*, *Gammaproteobacteria bacterium* e *Marinobacterium* sp são bactérias comum de sedimentos costeiros e estuarinos (Lai, et.al. 2011; Jiang et al. 2007; Durán-Viseras et.al. 2021). Segundo Xiao-Yun et.al. (2017), Durán-Viseras, et al. (2021), A *Aestuarium zhoushanense* e *Marinobacterium* sp são bactérias bioindicadores de substâncias tóxicas conhecidas por sua capacidade de degradar monóxido de carbono, compostos aromáticos, hidrocarbonetos e metais pesados tanto no estuário como em ambientes marinhos contribuindo para a limpeza de ambientes contaminados.

5.2.3 Espécies mais frequentes Água Doce

Limnohabitans curvus (Betaproteobacteria), *Curvibacter delicatus* (Betaproteobacteria), *Candidatus Rhodoluna limnophila* (Actinobacteria) são bactérias que embora ocorram em águas doce, salobra e salina foram identificadas com maior frequência em água doce. Segundo Kasalický et. Al. (2013), Deneff et. al. (2020), são bactérias mais comum em ambientes dulcícolas com atividades humanas/antropogênicas são responsáveis pela ciclagem de nutrientes, com uma grande capacidade de responder a condições de mudanças chamado “QI metabólico” permitindo a utilização de mais de um substrato (bactérias oportunistas). *Curvibacter delicatus* e *Candidatus Rhodoluna limnophila* segundo Le et.al. (2023) e Hahn et.al., (2009) são bactérias que podem servir como indicação de contaminação orgânica, e para a biorremediação de diferentes compostos propiciando principalmente a diversidade bacteriana nesses ambientes.

5.2.4 Espécies mais frequentes em Água Salobra e Salgada

Synechococcus sp. (Cyanophyceae) é um importante picoplâncton fotossintético, possui um mecanismo bastante eficiente para se adaptar às mudanças de salinidade e na intensidade de luz (Kim et. al. 2018), possuem também a capacidade de sobreviver em uma ampla faixa de temperatura. Mastala et al (1996) demonstrou que os microrganismos do gênero corresponde às condições de temperatura encontrada em países tropicais, o que torna propícia a

sobrevivência do grupo em tais localidades (Rasconi et al, 2015). Os fatores descritos permitem explicar a abundância do mesmo nas amostras estudadas, uma vez que o gênero possui ferramentas para adaptação e crescimento perante as variações físico-químicas, nos três ambientes estudados com uma maior abundância identificada na água salgada.

A espécie *Arcobacter cryaerophilus* (*Epsilonproteobactéria*) anteriormente classificada como *Campylobacter cryaerophilus*, Vandamme, et. al. (1991), podem ser utilizadas como indicadores fecais por serem patógenos para animais e humanos, Oliveira et al (2020), foram isolados de diferentes ambientes, solo, água doce, águas salobras e águas marinhas, assim como em, animais (frango, porco, caprinos e equinos) e frutos do mar, Fernandez et al. (2001) e Collado et al. (2009). Nos estudos realizados a *Arcobacter cryaerophilus* foi frequente nos três ambientes com uma maior abundância na água salobra, onde os níveis de contaminação fecal também são mais elevados, na água salgada foram identificados com menor frequência, indicando uma certa versatilidade dos mesmos em relação a variação do gradiente de salinidade.

Como esperado, o resultado final deste estudo, incluindo a metagenômica, foi a determinação de diferentes comunidades bacterianas, nos diferentes ambientes analisados nas águas doces, salobra e Região Costeira próxima a desembocadura do rio Itanhaém. No entanto, a característica mais marcante do estudo foi a descrição inédita das comunidades microbianas nesses ambientes, sua dinâmica e interação com o ecossistema aquático, por meio de análises Metagenômicas DNA ambiental (eDNA).

A salinidade foi um fator abiótico fundamental na modulação da composição microbiana da comunidade aquática corroborando com (Lozupone e Knight 2007; Silveira et al. 2011). Além disso, as análises de sobreposições demonstraram os números de OTUs agrupou com 97% de similaridade entre bibliotecas geradas a partir dos métodos metagenômicos (eDNA).

As análises das coordenadas principais também demonstraram uma clara separação entre as comunidades reveladas a partir do DNA ambiental e entre as amostras da água doce (Rio Itanhaém), da águas salobras (Boca da Barra Foz do rio Itanhaém) e da água salgada, demonstrando que a salinidade foi um fator importante na modulação da composição microbiana da comunidade corroborando com (Lozupone et.al., 2007; Silveira et al, 2011).

Pesquisas anteriores demonstraram que o status trófico dos ambientes aquáticos desempenha um papel fundamental na formação da estrutura taxonômica e diversidade das comunidades microbianas planctônicas Shen et al., (2019); Li et al., (2022).

Estudos frequentemente associaram a eutrofização e o lançamento de esgoto com a diminuição da diversidade bacteriana Xie et al., (2022); Shen et al., (2019); Wang et al., (2022) o que é uma aparente contradição quando observada a maior diversidade na área em estudo impactada pelo esgoto. Isso pode ser explicado pelo “input” de microrganismos via efluente doméstico bruto misturado com comunidades bacterianas do escoamento natural e urbano, bem como esgoto tratado de uma estação de tratamento (ETE) que drena para essa parte das águas fluviais. O estudo de Li, Y., et.al (2022) descobriu um aumento na riqueza da comunidade bacteriana ao longo de uma seção de rio que recebe esgoto bruto, mas que é misturado com esgoto tratado, bem como outros aportes hídricos de outros rios que contribui para o aumento da diversidade microbiana.

6 CONCLUSÃO

6.1 Bactérias indicadoras fecais:

Durante todo período de estudo e, em praticamente todos os pontos de coleta do Rio Itanhaém, as densidades de bactérias indicadoras fecais *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp foram bastante elevadas caracterizando a região de estudo como um estuário urbano impactado pelas atividades antropogênicas.

- A região do entorno da Foz do rio, mais urbanizada e mais populosa tem sua contaminação causada principalmente por fontes pontuais enquanto que, na região do entorno da nascente do rio, menos urbanizadas e com áreas agrícolas, a contaminação pode ser classificada como sendo principalmente de fontes difusas.
- Os efeitos da salinidade e da precipitação, nas densidades bacterianas, foram diferentes para as 2 espécies de bactérias indicadoras estudadas. *Enterococcus* sp, indicadora “ideal” para águas salobras e salinas, sofreu mais influência negativa da salinidade no ambiente de água salobra do que a *E. coli*, mais indicada para ambientes de água doce o que indica a necessidade de mais estudos relacionados a escolha da melhor indicadora

de contaminação por esgotos domésticos, considerando nos mesmos, as diferenças climáticas, sócio- ambientais e epidemiológicas.

6.2 Diversidade Bacteriana

A investigação da diversidade bacteriana através da abordagem metagenômica é pioneira no ecossistema aquático do rio Itanhaém e permitiu o conhecimento das diversas espécies bacterianas presentes no rio, no estuário e no ambiente marinho.

- As comunidades bacterianas foram diferentes em águas doce, salobra e salgada). Em nível de espécie, maior abundância e maior riqueza ocorrem em águas salobras e salinas.
- As espécies bacterianas de águas salgadas e salobras divergem bastante das espécies de água doce.
- As espécies bacterianas em maior abundância encontradas nos 3 diferentes gradientes de salinidade, são características de ambientes com maior atividade antropogênica, indicando a presença de bactérias especializadas capazes de utilizar componentes orgânicos, isso aponta para um provável potencial de autodepuração.
- A ocorrência de uma espécie abundante (*Arcobacter cryaerophilus*), utilizada como indicadora fecal e com potencial patogênico zoonótico, corrobora com os elevados índices de contaminação da região.
- As águas da região do rio Itanhaém podem ser uma fonte potencial para obtenção de espécies bacterianas de importância biotecnológica;
- É possível concluir que o presente estudo abre perspectivas para novos trabalhos relacionados tanto à busca da bactéria indicadora de contaminação fecal ideal para ambientes aquáticos tanto quanto pode auxiliar nos estudos para a gestão desse ecossistema produtivo e vulnerável.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AHMED, W. HAMILTON, K., TOZÉ, S., COOK S., PAGE, D. – A review on microbial contaminants in stormwater runoff and outfalls: potential health risks and mitigation strategies Sci. Total Environ.692, 1304-1321 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.055>

AMIR, A.; MCDONALD, D.; NAVAS-MOLINA, J. A.; KOPYLOVA, E., MORTON, J. T.; XU, Z. Z. & KNIGHT, R. Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. mSystems, 2(2), e00191-16. (2017). DOI: 10.1128/mSystems.00191-16.

ANDERSON K.L.; WHITLOCK J.E.; HARWOOD V.J. - “Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments,”.Acento. Microbiol.71: 3041-3048, 2005. [Artigo livrepmc] [PubMed] [GoogleScholar].

ANDRIOLO, A., PREZOTO, F. & BARBOSA, C.B. (2018). Impactos Antrópicos: Biodiversidade Aquática & Terrestre. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4024947>

APHA - American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nded. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2013.

ARCEIVALA, S.J. Wastewater and disposal: engineering and ecology in pollution control. New York: Marcel Dekker, 1981 (Series: Pollution Engineering Technology).

ARIKAWA K. e HOSOKAWA M. - Uncultured prokaryotic genomes in the spotlight: An examination of publicly available data from metagenomics and single-cell genomics – 2023 Computational and Structural Biotechnology journal. Vol. 21 Pgs 4508-4518 - <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.09.010>

BAUMGARTEN, M. D. G., NIENCHESKI, L. F. H., & VEECK, L. (2001). Nutrientes na coluna da água e na água intersticial de sedimentos de uma enseada rasa estuarina com aportes de origem antrópica (RS-Brasil). Atlântica, 23 (December), 101-116.

BERNARDO, M.S.M.V. Comparação dos métodos aplicados na detecção de bactérias coliformes, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. em águas para fins recreativos. 121f. Dissertação (Mestrado em Qualidade em Análises. Especialização em Análises de Águas). Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Algarve, Faro, 2007.

BERNHARD A. E., COLBERT D., MCMANUS J., FIELD K.G. - Microbial community dynamics based on 16S rRNA gene profiles in a Pacific Northwest estuary and its tributaries *FEMS Microbiology Ecology* 52 2005 115–128

BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. 20. ed. São Paulo: Melhoramentos 1980.

BOUSKILL, N. J. et al. “Temporal bacterial diversity associated with metal contaminated river sediments”. *Ecotoxicology*, v. 19, n. 2, p. 317–328, 2010.

BRAGA, B. et al. *Introdução à engenharia ambiental*. 2ª ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BRASIL, 2000 CONAMA – RESOLUÇÃO nº 274 de 29 de novembro de 2000. Dispõe sobre a Balneabilidade.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n.º 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos d’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*, 18 de março de 2005, p. 58-63.

BRIDLE, H, *Waterborne pathogens. Detection Methods and applications*. Academic Press: London 2014.

BRUCE, T.; DE CASTRO, A., KRUGER, R., THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L. - Microbial diversity of Brazilian Biomes. In: Nelson KE, Jones-Nelson B (eds) *Genomics applications for the developing world*. (2012). Springer, Berlin, pp 217–247

BYAPPANAHALLI, M.N.; SHIVELY, D.A.; NEVERS, M.B.; SADOWSKY, M.J.; WHITMAN, R.L. Growth and survival of *Escherichia coli* and enterococci opulations in the macro-alga *Cladophora* (Chlorophyta). *FEMS Microbiology Ecology*. Amsterdam, v. 46, p. 203-211, 2003.

BYAPPANAHALLI, M.N.; WHITMAN, R.L.; SHIVELY, D.A.; EVERT, W.T.; TING, W.T.E.; TSENG, C.C.; NEVERS, M.B. Seasonal persistence and population characteristics of *Escherichia coli* and enterococci in deep backshore sand of two freshwater beaches. *Journal of Water and Health*. London, v. 4, n.3, p. 313-320, 2006.

CABELLI, VJ; DUFOUR, A. P; MCCABE, L. J.; LEVIN, M. - A swimming-associated gastroenteritis and water quality American Journal of Epidemiology, Volume 115, Issue4, April 1982, Pages 606–16, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113342>

CAI L., ZHANG T. Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique. *Environ Sci Technol* 2013 May 21- 47 (10):5433-4. Doi: 10.1021/es400275r.

CALLAHAN, B. J., MCMURDIE, P. J., & HOLMES, S. P. - Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639-2643. 2017. DOI: 10.1038/ismej.2017.119

CAMARGO, A F M.; CANCIAN, L F -Ecologia da bacia do rio Itanhaém: características limnológicas e uso do solo. In: MORAES, MEB; LORANDI, R. (Orgs.) *Métodos e técnicas de pesquisa em bacias hidrográficas* [online]. Ilhéus, BA: Editus, p. 197-218, 2016. Disponível em: <<http://books.scielo.org>>

CAMPOS C.J.A.; SIMON R.; KERSHAW; RON J. L. - Environmental Influences on Fecal Indicator Organisms in Coastal Waters and Their Accumulation in Bivalve Shellfish Estuaries and Coasts 36:834–853, 2013. DOI 10.1007/s12237-013-9599-y

CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE): RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005* Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000.

CAPORASO, JG; LAUBER, CL; WALTERS, WA; BERG, LD; HUNTLEY, J; FIERER N. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. ISME J. 2012; 6: 1621–1624, 2012. doi.org/10.1038/ismej.

CAPORASO, J. G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J., BITTINGER, K., BUSHMAN, F. D., COSTELLO, E. K., KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature methods, 7(5), 335-336 (2010).

CAPORASO JG, LAUBER CL, WALTERS WA, BERG-LYONS D, LOZUPONE CA, TURNBAUGH PJ, FIERER N, KNIGHT R. - Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4516-22. doi: 10.1073/pnas.1000080107. Epub 2011 Jun 3. PMID: 20534432; PMCID: PMC3063599.

CASTRO, M. A. S, LIMA, A. O. D. S., GERCHENSKI, A. V., JAQUES, D. B., RODRIGUES, A. L., SOUZA, P. L. D., & RÖRIG, L. R. (2003). Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. Brazilian Journal of Microbiology, 34, 45-47.

CARR M. R, WANG SY, MCLEAN TI, FLOOD CJ, ELLENDER RD. Salmonella rarely detected in Mississippi coastal waters and sediment. J. Appl. Microbiol. 109, 2010.
CETESB <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>

CPTEC/INPE Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos/Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais em 2021 e 2022).

CRAIG DL, FALLOWFIELD HJ, CROMAR NJ. -Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *Journal of Applied Microbiology* 2004; 96(5): 922-930.

COLLINS MD, RODRIGUES UM, PIGOTT NE, FACKLAM RR. 1991. *Enterococcus dispar* sp. nov.: a new *Enterococcus* species from human sources. *Lett. Appl. Microbiol.* 12: 95–98 [PubMed] [Google Scholar]

CURY JC, ARAUJO FV, COELHO-SOUZA SA, PEIXOTO RS, OLIVEIRA JAL, SANTOS HF. - Microbial Diversity of a Brazilian Coastal Region Influenced by an Upwelling System and Anthropogenic Activity. Gilbert J, editor. *PLoS ONE*. 2011, Jan 27; 6(1): e16553.

DONG X., KLEINER M., SHARP C.E., THORSON E., LIU C. LI, D., Strous M., Fast and simple analysis of MiSeq amplicon sequencing data with MetaAmp, *Front. Microbiol.* 8 2017 1461. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01461>.

DUFOUR AP. Bacterial indicators of recreational water quality. *Can J Public Health*. 1984 Jan-Feb; 75 (1):49-56. PMID: 6367923.

DORSEY JH, CARTER PM, BERGQUIST S, SAGARIN R. Reduction of fecal indicator bacteria (FIB) in the Ballona Wetlands saltwater marsh (Los Angeles County, California, USA) with implications for restoration actions. *Water Res.* 44: 4630–4642, 2010. [PubMed] [Google Scholar].

DUFOUR AP. Bacterial indicators of recreational water quality. *Can J Public Health*. 1984 Jan-Feb; 75 (1):49-56. PMID: 6367923.

DURÁN-VISERAS A, CASTRO DJ, REINA JC, BÉJAR V, MARTÍNEZ-CHECA F. Taxogenomic and Metabolic Insights into *Marinobacterium ramblicola* sp. nov., a New Slightly Halophilic Bacterium Isolated from Rambla Salada, Murcia. *Microorganisms*. 2021 Aug 3;9(8):1654. doi: 10.3390/microorganisms9081654. PMID: 34442733; PMCID: PMC8398569. EEA (European Environmental Agency): Bathing Water Quality.

EVISON, L. M. Comparative studies on the survival of indicator organisms and pathogens in fresh and sea water. *Water Science and Technology*, v. 20, n. 11-12, p. 309-315, 1988.

FAHNENSTIEL, G.L. E HUNTER J., CARRICK, RI - Physiological characteristics and food-web dynamics of *Synechococcus* in Lakes Huron and Michigan *Limnology e Oceanography*, 1991Vol. 36: 219-234.

EEA (European Environmental Agency): Bathing Water Quality.

ESTEVES, F, A. Fundamentos de Liminologia. 3ª ed. Rio de Janeiro, Interciência, 2011.

FAHNENSTIEL, G.L. E HUNTER J., CARRICK, RI - Physiological characteristics and food-web dynamics of *Synechococcus* in Lakes Huron and Michigan *Limnology e Oceanography*, 1991Vol. 36: 219-234.

FERA MT, MAUGERI TL, GUGLIANDOLO C, BENINATI C, GIANNONE M, LA CAMERA E, CARBONE M. - Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea. *Appl Environ Microbiol.* (2004) 70(3):1271-6. doi: 10.1128/AEM.70.3.1271-1276.2004. PMID: 15006743; PMCID: PMC368354.

GARCIA-ALJAROL, C.; BLANCH, A.R.; CAMPOS, C.; JOFRE1 J.; AND LUCENA, F. - Review article Pathogens, fecal indicators and human-specific microbial source-tracking markers in sewage *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072 – 2018 - doi:10.1111/jam.14112.

GIRAFFA G. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol.* 2003 Dec 1; 88(2-3):215-22. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00183-1. PMID: 14596993.

Ghosh A, Bhadury P. Exploring biogeographic patterns of bacterioplankton communities across global estuaries. *MicrobiologyOpen*. 2019; 8:e741. <https://doi.org/10.1002/mbo3.741>

GHOSH, A.; MEHTA, A & KAHN, AM. Análise Metagenômica e suas aplicações, Enciclopédia de bioinformática e biologia computacional [Internet]. Editores Ranganathan, SM; GRIBSKOV, KN E SHONBAC, C. Oxford, (Reino Unido, Academic Press). 184-193, 2019.

GRAIG D.L., FALLOWFIELD H.J. AND CROMAR N.J. - Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements - *Journal of Microbiology*, 96, 922–930, 2004 doi:10.1111/j.1365-2672.2004. 02243.

GREGORACCI GB, NASCIMENTO JR, CABRAL AS, PARANHOS R, VALENTIN JL, THOMPSON CC. - (2012) Estruturação da diversidade do bacterioplâncton em uma grande baía tropical. *PLoS ONE* 7(2): e31408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031408>

GREGORACCI, G.B.; RUA, C.P.J. *Biotecnologia Marinha - Biodiversidade microbiana: Bactérias arqueias e vírus* cap. 6, pg 135 - 159 – Rio Grande. Ed. FURG, 2020.

HAHN, MW. (2003) Isolation of Strains Belonging to the Cosmopolitan Polynucleobacter necessarius Cluster from Freshwater Habitats Located in Three Climatic Zones - *Appl Environ Microbiol.* 2003 Sep; 69(9): 5248–5254. doi: 10.1128/AEM.69.9.5248-5254.2003 PMID: PMC194981 PMID: 12957910.

HAHN MW. Description of seven candidate species affiliated with the phylum Actinobacteria, representing planktonic freshwater bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009 Jan; 59 (Pt 1):112-7. doi: 10.1099/ijs.0.001743-0. PMID: 19126733; PMID: PMC4266461.

HANSON CA, FUHRMAN JA, HORNER-DEVINE MC, Martiny JB. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nat Rev Microbiol.* 2012 May 14;10 (7):497-506. doi: 10.1038/nrmicro2795. PMID: 22580365.

HEGEDŰS B, KÓS PB, BÁLINT B, MARÓTI G., GAN HM, PEREI K., RÁKHELY G. Complete genome sequence of *Novosphingobium resinovorum* SA1, a versatile xenobiotic-degrading bacterium capable of utilizing sulfanilic acid. *Journal of Biotechnology*. 2017 Jan; 241:76-80. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.11.013. PMID: 27851894.

HOSEN J. D., FEBRIA C. M., CRUMP B. C., PALMER M. A. - Watershed Urbanization Linked to Differences in Stream Bacterial Community Composition. *Front. Microbiol* 8:1452. 10.3389/fmicb. 2017.01452 doi.org/10.3389/fmicb.2017.01452 [Artigo gratuito PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Acadêmico].

HSU, T. D. AND LEE, J., 2015. "Global distribution and prevalence of *Arcobacter* in food and water." *Zoonoses and Public Health* 62 (8): 579–89.

Itanhaém (SP) | Cidades e Estados | IBGE». www.ibge.gov.br

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - IPT. PREFEITURA MUNICIPAL DE ITANHAÉM – PMI. Indicadores ambientais. In: *Atlas ambiental do município de Itanhaém 2012*. São Paulo: Imprensa Oficial, 2012. Cap. 07, p. 77-88. Disponível em: <<http://www.itanhaem.sp.gov.br/atlasambiental/conteudo/Atlas-Ambiental-Capitulo-7.pdf>>

ISLAM, M. M. MAJEDUL & HOFSTRA, NYNKE & ISLAM, MD. (2017). The Impact of Environmental Variables on Faecal Indicator Bacteria in the Betna River Basin, Bangladesh. *Environmental Processes*. 4. 1-14. 10.1007/s40710-017-0239-6.

INSTITUTO ÁGUA E SANEAMENTO (CENSO 2022):

<https://www.aguaesaneamento.org.br/municipios-e-saneamento/sp/itanhaem>

JEFFRIES TC, SCHMITZ FONTES ML, HARRISON DP, VAN-DONGEN-VOGELS V, EYRE BD, RALPH PJ AND SEYMOUR JR (2016) Bacterioplankton Dynamics within a Large Anthropogenically Impacted Urban Estuary. *Front. Microbiol.* 6:1438. doi: 10.3389/fmicb.2015.01438

JENG, HAC; ENGLANDE, AJ; BAKEER, RM; BRADFORD HB - Impact of urban stormwater runoff on estuarine environmental quality. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* Volume 63, Issue 4, June 2005, Pages 513-526 <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2004.11.024>.

Kerstens, K.; De Vos, P.; Gillis, M.; Swings, J.; Vandamme, P.; and Stackebrandt, E. (2006) Introduction to the Proteobacteria. *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. 5: Proteobacteria : alpha and beta subclasses. p. 3-37.

KAY D, STAPLETON CM, WYER MD, MCDONALD AT, CROWTHER J, PAUL N, JONES K, FRANCIS C, WATKINS J, WILKINSON J, HUMPHREY N, LIN B, YANG L, FALCONER RA, and GARDNER S. - Decay of intestinal enterococci concentrations in high-energy estuarine and coastal waters: towards real-time T90 values for modelling faecal indicators in recreational waters. *Water Res.* 2005. Doi: 10.1016/j.watres.2004.11.014. PMID: 15707639.

KIM Y, JEON J, KWAK MS, KIM GH, KOH I, RHO M. Photosynthetic functions of *Synechococcus* in the ocean microbiomes of diverse salinity and seasons. *PLoS One*. 2018 Jan 2; 13 (1):e0190266. doi: 10.1371/journal.pone.0190266. PMID: 29293601; PMCID: PMC5749766.

KLEIN G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract - *International Journal of Food Microbiology* Volume 88, Issues 2–3, 1 December 2003, Pages 123-131

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLÖCKNER, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 2013.

LAI Q., FU Y., WANG J., CHEN S, ZHONG H., SUN F., SHAO Z. - *Citricella marina* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 2011, Apr; 61 (Pt 4):728-731. doi: 10.1099/ijs.0.022376-0.

Le VV, Ko S, Kang M, Jeong S, Oh H, Ahn C. Comparative Genome analysis of the Genus *Curvibacter* and the Description of *Curvibacter microcystis* sp. nov. and *Curvibacter cyanobacteriorum* sp. nov., Isolated from Fresh Water during the Cyanobacterial Bloom Period. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2023;33:1428-1436. <https://doi.org/10.4014/jmb.2306.06017>

LEITE, A.M.O., MOLISANI M.M, OLIVEIRA R.M., PONTES P.V.M., FONSECA R.N., MENEZES J.S. - Bacterial community dominance in a sewage-driven eutrophic coastal lagoon by next generation sequencing: initial findings. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 2024, vol. 36, e5.<https://doi.org/10.1590/S2179-975X8523>

LEVICAN, A., COLLADO, L., FIGUERAS, J. M. 2016. “The use of two culturing methods in parallel reveals a high prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in a wastewater treatment plant.” *BioMed Research International*, 1–9.

LIU XJ. ZHU KL., YE YQ., HAN Z.T., XY T., DU ZJ., MENG-QI YE MQ. - Phenotypic and genotypic characterization of *Marinobacterium weihaiense* sp. November. And *Marinobacterium marinum* sp. nov., isolated from marine sediments, and genomic properties of the genus *Marinobacterium* 2024 PMID: 38265428 IDPM: PMC10868613 DOI: 10.1099/mgen.0.001182.

LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 27, p. 11436-11440, 2007. ISSN 0027-8424.

MADIGAN M; MARTINKO J (editors). *Brock Biology of Microorganisms* 11th ed. [S.l.]: Prentice Hall. ISBN 0131443291 (2005).

MAIPA V., ALAMANOS Y., BEZIRTZOGLU E. - Seasonal fluctuation of bacterial indicators in coastal waters. (2001). *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13(3), 143–146. <https://doi.org/10.1080/089106001750462687>

MARTINEZ-MURCIA AJ, COLLINS MD. 1991. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. FEMS Microbiol. Lett. (80): 69–73 [PubMed] [Google Scholar]

Mastala, Z; Herodek, S.; Balogh-Katalin, V.; Borbély, G.; Shafik, H.; Vörös, L. (1996). Nutrient Requirement and Growth of a *Synechococcus* Species Isolated from Lake Balaton. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie. 81. 503 - 512. 10.1002/iroh.19960810403.

MAUGERI T.L., GUGLIANDOLO C., CARBONE M., CACCAMO D., FERA M.T. - Isolation of *Arcobacter* spp. from a brackish environment. New Microbiol. 2000 Apr; 23(2):143-9. PMID: 10872684.

MCDONALD RI, CARLOS B. MIGUEZ , GERLINDE ROGGE , DENIS BOURQUE , KARIN D. WENDLANDT , DENIS GROLEAU & J. COLIN MURRELL - Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments FEMS Microbiol Lett 2006 - 225–232 doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00090.x

MELO, M.L. AND SARMENTO, H. - Anthropogenic impacts on aquatic bacteria: a perspective from the tropics. Acta Limnologica Brasiliensia, 2019, vol. 31, e 111.

MELO, R.R., - Análise da qualidade microbiológica do peixe (*Eugeres brasiliensis*) e das Águas do Estuário do Rio Itanhaém, SP, Brasil. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

MERGA, J. Y.; ROYDEN, A.; PANDEY, A. K.; WILLIAMS, N. J., 2014. “*Arcobacter* spp. isolated from untreated domestic effluent.” Letters in Applied Microbiology 59 (1): 122–26.

MIGNANI, L.; BARBIERI E.; MARQUES H.L.A; OLIVEIRA, A.J.F.C. Coliform density in oyster culture waters and its relationship with environmental factors. Pesq. agropec. bras. vol.48 no.8 2013. Brasília <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800004>.

MIRANDA, L.B., CASTRO B.M., KJERFVE B., Princípios de oceanografia física de estuários. São Paulo: Editora USP. 2002

MORAES, D.S.L e JORDÃO, B.Q. - Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana Rev Saúde Pública 2002; 36(3):370-4 www.fsp.usp.br/rsp

MURRAY, P.R. Microbiologia Médica 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004

Nakagawa Y "Class IV. Cytophagia class. nov.". In Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4 (2nd ed.). New York, NY: Springer. p. 370. (2010).

NAKATSU C.H., BYAPPANAHALLI N.M., NEVERS M.B. – BACTERIAL COMMUNITY 16S rRNA Gene sequencing Characterizes Riverine Microbial Impact on Lake Michigan. *Microbiolfrontal*. DOI:org/10.3389/fmicb.2019.00996 DPM:PMC6527805 PMID:31139161

NASCIMENTO, A. L., SOUZA, A. J., ANDRADE, P. A. M., ANDREOTE, F. D., COSCIONE, A. R., OLIVEIRA, F. C., & REGITANO, J. B. (2018). Sewage sludge microbial structures and relations to their sources, treatments, and chemical attributes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1462.

NEWTON RJ, JONES SE, EILER A, MCMAHON KD, BERTILSSON S. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011 Mar; 75(1):14-49. doi: 10.1128/MMBR.00028-10. PMID: 21372319; PMCID: PMC3063352.

NOVOTNY, V.; OLEM, H. Water quality: prevention, identification, and management of diffuse pollution. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993.

OKABE, S., AND SHIMAZU, Y. Persistence of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers in environmental waters: Effects of temperature and salinity. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007 76 935–944. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1048-z>.

Oliveros, JC (2007-2015) Venny. Uma ferramenta interativa para comparar listas com diagramas de Venn. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

Painel de Saneamento Brasil (2022)
<https://www.painelsaneamento.org.br/explore/localidade?SE%5B%5D=352210>

PARK S, KANG SJ, OH TK, YOON JH. *Roseivivax lentus* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment, and emended description of the genus *Roseivivax* Suzuki et al. 1999. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010 May;60(Pt 5):1113-1117. doi: 10.1099/ijms.0.014795-0. Epub 2009 Aug 7. PMID: 19666792.

PATEL, V. et al. “Response of bacterial community structure to seasonal fluctuation and anthropogenic pollution on coastal water of Alang-Sosiya ship breaking yard, Bhavnagar, India”. *Bioresource Technology*, v. 161, p. 362–370, 2014.

PINHEIRO, M.A.A.; OLIVEIRA, A.J.F.C.; FONTES, R.F.C. 2008. Introdução ao Panorama Ambiental da Baixada Santista, Cap. 01, 1-4p. In: Oliveira, A.J.F.C.; Pinheiro, M.A.A.; Fontes, R.F.C. (Orgs.) *Panorama Ambiental da Baixada Santista*. Universidade Estadual Paulista – Campus Experimental do Litoral Paulista, 1ª Edição, ISBN 978-85-61498-02-3, São Vicente, 127p.

PINTO, A.B.; PEREIRA, C.R.; OLIVEIRA, A.J.F.C. Densidade de *Enterococcus* sp em águas recreacionais e areias de praias do município de São Vicente-SP, Brasil e sua relação com parâmetros abióticos. *O Mundo da Saúde*. São Paulo, v.36, n.4, p. 587-593, 2012.

PITT, A.; SCHMIDT J., KOLL U., HAHN M.W. - *Rhodoluna limnophila* sp. nov., a bacterium with 1.4 Mbp genome size isolated from freshwater habitats located in Salzburg, Austria. Taxonomic description Pitt et al., *Int J Syst Evol Microbiol* 2019; 69:3946–3954 DOI 10.1099/ijsem.0.003720 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

PITT, A.; SCHMIDT J., KOLL U. AND HAHN M.W. - *Aquirufa antheringensis* gen. nov., sp. nov. and *Aquirufa nivalisilvae* sp. nov., representing a new genus of widespread freshwater bacteria J Syst Evol Microbiol 2019; 69:2 2739–2749 DOI 10.1099/ijsem.0.003554.

PORTER, K. G.; FEIG, Y. S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr., v. 25, p. 943-948.

PRAKIT S.; LI, B; YAN, T. Fecal indicator bacteria, direct pathogen detection, and microbial community analysis provide different microbiological water quality assessment of a tropical urban marine estuary Water Research 185, 2020.

PRAYOGO FA, BUDIHARJO A, KUSUMANINGRUM HP, WIJANARKA W, SUPRIHADI A, NURHAYATI N. Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: a review. J Genet Eng Biotechnol. 2020 Aug 4;18(1):39. doi: 10.1186/s43141-020-00043-9. PMID: 32749574; PMCID: PMC7403272.

PROPS R., DENEFF, VJ- Temperature and Nutrient Levels Correspond with Lineage-Specific Microdiversification in the Ubiquitous and Abundant Freshwater Genus *Limnohabitans*. Environ Microbiol. 2020 May 5. 86 (10):e0014020. doi: 10.1128/AEM.00140-20.

QILIANG L., FU Y., WANG J., CHEN S, ZHONG H., SUN F., SHAO Z. - *Citreicella marina* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. Int J Syst Evol Microbiol. 2011, Apr; 61 (Pt 4):728-731.doi: 10.1099/ijs.0.022376-0.

RAHMAN T., M.D., CROMBIE A., CHEN Y., STRALIS-PAVESE N., BODROSSY L., MEIR P., MCNAMARA N.P., MURRELL J.C. - Environmental distribution and abundance of the facultative methanotroph *Methylocella* The ISME Journal (2011) 5, 1061–1066 & 2011 International Society for Microbial Ecology All rights reserved 1751-7362/11.

RAMEES, T. P., DHAMA, K., KARTHIK, K., RATHORE, R. S., KUMAR, A., SAMINATHAN, M., TIWARI, R., MALIK, Y. S., & SINGH, R. K. *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control

- a comprehensive review. *The veterinary quarterly*, (2017). 37(1), 136–161. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1323355>

RASCONI S, GALL A, WINTER K, KAINZ MJ (2015) Aumento da temperatura da água desencadeia dominância de pequenos plânctons de água doce. *PLoS ONE* 10(10): e0140449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140449>

RAZZAQ, A., SHAMSI, S., ALI, A., ALI, Q., SAJJAD, M. E MALIK, A. Aplicações de proteases microbianas. *Frente. Bioeng. Biotecnologia*. 7, 110 2019. doi:10.3389/fbioe.2019.00110.

REICHENBACH, H. (2006). The Order Cytophagales. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_20

RUMAH, BL, STEAD, CE, CLAXTON STEVENS, BH et al. Isolamento e caracterização de *Methylocystis* spp. para produção de poli-3-hidroxibutirato usando matérias-primas residuais de metano. *AMB Expr* 1, 6 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01159-4>

SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; HORN, D. J. V. WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.75, p. 7537-7541, 2009. SAINGAM P., LI B., YAN, T. - Fecal indicator bacteria, direct pathogen detection, and microbial community analysis provide different microbiological water quality assessment of a tropical urban marine estuary *Water Research* 185 (2020)

SANGODKAR, N., GONSALVES, M.J., SHANBHAG, Y. et al. Prevalence of indicator and potential pathogenic bacterial groups in the Chapora bay-estuarine system, Goa, central west coast of India. *Environ Monit Assess* 192, 397 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08368-1>

SCHMIDT, T.M.; E.F. DELONG E.F., RITMO N.R. - Análise de uma comunidade de picoplâncton marinho por clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA PMID: 2066334PMCID: PMC208098DOI: 10.1128/jb.173.14.4371-4378.1991

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; HORN, D. J. V.WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.75, p. 7537-7541, 2009.

SHANNON, C. E., AND W. WEAVER - The Mathematical Theory of Communication. Urbana, University of Illinois Press, 117 pp. 1949

SILVA, M.B. - Estudos da Influência da Poluição Difusa na Qualidade da água de reservatórios de usinas hidrelétrica (Especialização) - Instituto de Eletrotécnica e Energia Universidade de São Paulo, 2010.

SILVEIRA C.B, VIEIRA R.P, CARDOSO A.M, PARANHOS R, ALBANO R.M, et al. (2011) Influence of Salinity on Bacterioplankton Communities from the Brazilian Rain Forest to the Coastal Atlantic Ocean. *PLoS ONE* 6(3): e17789. doi:10.1371/journal.pone.0017789

SINTON, L.W.; HALL, C.H.; LYNCH, Ph.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*. Washington, v.68, n.3, p. 1122-1131, 2002.

SMITH, D.P.; THRASH J.C., NICORA C.D., LIPTON M.S., BURNUM-JOHNSON K.E., CARINI P., SMITH R.D., AND GIOVANNONI S.J. - Proteomic and Transcriptomic Analyses of “*Candidatus Pelagibacter ubique*” Describe the First PII-Independent Response to Nitrogen Limitation in a Free-Living Alphaproteobacterium mBio. Published doi: 10.1128/mBio.00133-12

SPELLERBERG, I. & FEDOR, P. A - Tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon–Wiener’ Index. *Global Ecology & Biogeography*. 2003 12. 177-179. 10.1046/j.1466-822X.2003.00015.x.

STRADIOTTO, G.C. Densidade e resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* sp e *Escherichia coli* isolados de águas, areias e algas do gênero *Sargassum* de praias recreacionais do Litoral Norte do Estado de São Paulo. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas. Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências do campus de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Campus de Rio Claro/SP, 2013.

TAKACS, D. The idea of biodiversity. The John Hopkins University Press, Londres, 1996
TAVANO OL, BERENGUER-MURCIA A, SECUNDO F, FERNANDEZ-LAFUENTE R. - Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2018 Mar;17 (2):412-436. doi: 10.1111/1541-4337.12326. Epub 2018 Jan 19. PMID: 33350076.

TEILING, C., TECOTZKY, R. 2011. Base Space: Simplifying metagenomic analysis. Illumina, Inc., San Diego, CA Murray, P.R. et al. 2007. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed., ASM Press, Washington, DC.

THOMANN, R.V. AND MUELLER, J.A. (1987) *Principles of Surface Water Quality Modeling and Control*. Harper-Collins, New York, 644 p.

THOMAS T, GILBERT J, MEYER F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp*. 2012 Feb 9;2(1):3. doi: 10.1186/2042-5783-2-3. PMID: 22587947; PMCID: PMC3351745.

THOMPSON, F. e THOMPSON, C. (Organizadores) *Biotecnologia Marinha*, Cap. 3 Rio Grande: Editora FURG 2020. <https://cienciasdomarbrasil.furg.br/>.

UGRHI 07- ITANHAÉM (SP). Prefeitura Municipal. Secretaria do Planejamento e Meio Ambiente. Dados ambientais. Disponível em: <<http://www2.itanhaem.sp.gov.br/secretarias/planejamento-e-meio-ambiente/dados-ambientais.pdf>>

USEPA- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2004. Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria. EPA-823-B-04-002. US Environmental Protection Agency, Washington, DC

VANDAMME P, FALSEN E, ROSSAU R, HOSTE B, SEGERS P, TYTGAT R, DE LEY J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1991 Jan;41(1):88-103. doi: 10.1099/00207713-41-1-88. PMID: 1704793.

Venny Diagram By Oliveros, Juan Carlos. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>

VERAART, A. J.; P. GARBEVA, F. VAN BEERSUM, A. HO, C. A. HORDIJK, M. MEIMA-FRANKE, A. J. ZWEERS & P. L. E. BODELIER. - Living apart together—bacterial volatiles influence methanotrophic growth and activity. (2018) *The ISME Journal* volume 12, pages 1163–1166.

VIAU EJ, et al. Bacterial pathogens in Hawaiian coastal streams—associations with fecal indicators, land cover, and water quality. *Water Res*. 45: 3279–3290, 2011. [PubMed] [Google Scholar]

VIEIRA, R. H. S. F; SILVA, A. I. M; SOUSA, O V.H, E; VIEIRA, G. H. F.; SAMPAIO, S. S.LIMA, E. A. Análise experimental sobre a viabilidade de *Escherichia coli* em água do Mar 2001. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/54390>

Walters, W., Hyde, E. R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., Gilbert, J. A., Jansson, J. K., Caporaso, J. G., Fuhrman, J. A., Apprill, A., Knight, R. (2015). Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems*. Vol. 1 (1)

WANG Y, QIAN P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PLoS One. 4: e7401. 10.1371/journal.pone.0007401, 2009.

WANG Y, LIN H, HUANG R AND ZHAI W (2023) Exploring the plankton bacteria diversity and distribution patterns in the surface water of northwest pacific ocean by metagenomic methods. Front. Mar. Sci. 10:1177401. doi: 10.3389/fmars.2023.1177401

WANG, J.; WANG C.; LI J.; BAI P.; LI Q. ; SHEN M.; LI R.; LI T. ZHAO J. - Comparative Genomics of Degradative *Novosphingobium* Strains With Special Reference to Microcystin-Degrading *Novosphingobium* sp. THN1 Front Microbiol. 2018 Sep 25;9:2238. doi: 10.3389/fmicb.2018.02238.

WOESE, C.R, STACKEBRANDT, E., MACKE, T.J E FOX, G.E. Uma definição filogenética dos principais táxons eubacterianos. Sist. Apl. Microbiol. 6, 143–151, 1985. doi:10.1016/s0723-2020(85)80047-3

WASHINGTON, W.J.; ALLEN, S.D. et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Programa "R" 2006 ([HTTP://www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

YARZA, P., YILMAZ, P., PRUESSE, E. et al. - Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences (2014). Nat Rev Microbiol 12, 635–645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>

Yu, X.Y.; ZHAI, JY; FU, G.Y. et.al. *Aestuarium zhoushanense* gen. novembro, sp. nov., Isolated from Tidal Flat. Curr Microbiol 74, 1469–1476 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1342-7>.

ZAMPIERI, B.D.B., DA COSTA ANDRADE, V., CHINELLATO, R.M., GARCIA, C.A.B., DE OLIVEIRA, M.A., BRUCHA, G. e OLIVEIRA, A.J.F.C. (2020). Heavy metal

concentrations in Brazilian port areas and their relationships with microorganisms: can pollution in these areas change the microbial community?. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192, 1-17.

ANEXOS

Espécies encontradas em águas continentais (doce)

Acetoanaerobium noterae
Acinetobacter junii
Acinetobacter parvus
Acinetobacter proteolyticus
Acinetobacter seohaensis
Acinetobacter sp.
Acinetobacter tjernbergiae
Actibacter sediminis
Aeromonas caviae
Aestuarium zhoushanense
Aquaspirillum putridiconchylum
Aquiluna borgronia
Aquirufa antheringensis
Arcobacter aquimarinus
Arcobacter cryaerophilus
Arcobacter defluvii
Arcobacter ellisii
Aurantimicrobium minutum
Aureimarina marisflavi
Bacillus cereus
Bacteroides graminisolvens
Bacteroides uniformis
Bacteroidetes bacterium
Beijerinckia indica
Bifidobacterium adolescentis
Blautia wexlerae
Bradyrhizobium elkanii
Bradyrhizobium genosp. SA-1
Candidatus Flaviluna lacus
Candidatus Pelagibacter ubique
Candidatus Planktoluna difficilis
Candidatus Rhodoluna
limnophila
Candidatus Rhodoluna
planktonica
Chakrabartia godavariana
Citricella thiooxidans
Clostridium beijerinckii
Clostridium disporicum

Clostridium guangxiense
Collinsella aerofaciens
Curvibacter delicatus
Donghicola eburneus
Escherichia coli
Faecalibacterium prausnitzii
Flavipsychrobacter stenotrophus
Flavobacterium aquatile
Flavobacterium cucumis
Flavobacterium keumense
Flavobacterium koreense
Flavobacterium macrobrachii
Flavobacterium succinicans
Fluviibacter
phosphoraccumulans
Formosa spongicola
Frankiales bacterium X5
Frigidibacter albus
Gaetbulibacter aquiaggeris
Hoeflea prorocentri
Hyphomicrobium facile
Limnohabitans australis
Limnohabitans curvus
Limnohabitans parvus
Methylobacterium fujisawaense
Methyloceanibacter caenitepidi
Methylocella sp.
Methylocystis bryophila
Methylocystis parvus
Methylosinus trichosporium
Novosphingobium barchaimii
Novosphingobium bradum
Novosphingobium fuchskuhlense
Novosphingobium
ginsenosidimutans
Novosphingobium
naphthalenivorans
Novosphingobium resinovororum
Ottowia flava
Paracoccus carotinifaciens
Parasynechococcus marenigrum
Polynucleobacter
cosmopolitanus
Polynucleobacter necessarius
Polynucleobacter rarus
Polynucleobacter wuianus

Pseudorhodobacter aquaticus
Pseudorhodobacter
psychrotolerans
Rhizobium halophytocola
Rhodobacter megalophilus
Rhodobacter vinaykumarii
Rhodoblastus acidophilus
Rhodoblastus sphagnicola
Rhodoferax sediminis
Rhodoluna laticola
Romboutsia sp. LA1
Romboutsia timonensis
Sandaracinomonas limnophila
Sinirhodobacter hankyongi
Streptococcus equinus
Sulfuricurvum kujiense
Synechococcus sp.
Thalassolituus marinus
Thioclava arenosa
Trichococcus pasteurii

Espécies encontradas em água salobra

Acetoanaerobium noterae
Acinetobacter haemolyticus
Acinetobacter johnsonii
Acinetobacter junii
Acinetobacter parvus
Acinetobacter proteolyticus
Acinetobacter seohaensis
Acinetobacter sp.
Acinetobacter tjernbergiae
Aequoribacter fuscus
Aeromonas caviae
Aeromonas dhakensis
Aeromonas sanarellii
Aeromonas veronii
Aestuariicola
saemankumensis
Aestuarium zhoushanense
Aquaspirillum
putridiconchylum
Aquaspirillum serpens

Aquiluna borgnonia
Aquirufa antheringensis
Arcobacter acticola
Arcobacter aquimarinus
Arcobacter bivalviorum
Arcobacter butzleri
Arcobacter cibarius
Arcobacter cryaerophilus
Arcobacter defluvii
Arcobacter ellisii
Arcobacter thereius
Aurantimicrobium minutum
Aureimarina marisflavi
Bacteroides graminisolvens
Bacteroides luti
Bacteroides uniformis
Bacteroides vulgatus
Bifidobacterium
adolescentis
Bifidobacterium longum
Blautia luti
Blautia wexlerae)
Bradyrhizobium elkanii
Campylobacter sp.
Candidatus Actinomarina
minuta
Candidatus Flaviluna lacus
Candidatus Limnoluna
rubra
Candidatus Pelagibacter
ubique
Candidatus Planktoluna
difficilis
Candidatus Rhodoluna
limnophila
Candidatus Rhodoluna
planktonica
Chakrabartia godavariana
Citreicella marina
Citreicella thiooxidans
Cloacibacterium haliotis
Cloacibacterium
normanense
Clostridium beijerinckii
Clostridium disporicum

Collinsella aerofaciens
Curvibacter delicatus
Desulfovibrio desulfuricans
Donghicola eburneus
Dorea longicatena
Escherichia coli
Eubacterium rectale
Faecalibacterium
prausnitzii
Flavobacterium cucumis
Flavobacterium keumense
Flavobacterium koreense
Flavobacterium succinicans
Fluviibacter
phosphoraccumulans
Formosa spongicola
Frankiales bacterium X5
Frigidibacter albus
Fusicatenibacter
saccharivorans
Gaetbulibacter aquiaggeris
Gammaproteobacteria
bacterium
Gemmobacter nectariphilus
Hoeflea prorocentri
Laribacter hongkongensis
Leisingera caerulea
Limnohabitans australis
Limnohabitans curvus
Limnohabitans parvus
Loktanella hongkongensis
Loktanella soesokkakensis
Lutimaribacter litoralis
Macellibacteroides
fermentans
Marinobacterium sp.
Marivita cryptomonadis
Megamonas funiformis
Methylobacterium
fujisawaense
Methyloceanibacter
caenitepidi
Methylocystis parvus
Novosphingobium
barchaimii

Novosphingobium
fuchskuhlense
Novosphingobium
ginsenosidimutans
Novosphingobium
resinovorum
Oceanobacterium insulare
Parabacteroides chartae
Parabacteroides merdae
Paracoccus carotinifaciens
Paracoccus fistulariae
Parasynechococcus
marenigrum
Phaeobacter gallaeciensis
Photobacterium profundum
Polynucleobacter
cosmopolitanus
Polynucleobacter
necessarius
Polynucleobacter rarus
Porphyrobacter tepidarius
Prevotella copri
Proteocatella sphenisci
Pseudomonas aestusnigri
Pseudomonas
anguilliseptica
Pseudorhodobacter
aquaticus
Pseudorhodobacter
psychrotolerans
Psychrobacter nivimaris
Psychromarinibacter
halotolerans
Rhodobacter vinaykumarii
Rivicola pingtungensis
Romboutsia sp. LA1
Romboutsia timonensis
Roseivivax lentus
Ruminococcoides bili
Ruminococcus bromii
Ruminococcus faecis
Sinirhodobacter hankyongi
Streptococcus equinus
Sulfuricurvum kujiense
Sulfurospirillum deleyianum

Synechococcus sp.
Thalassolituus marinus
Tolumonas auensis
Tolumonas osonensis
Trichococcus collinsii
Trichococcus pasteurii
Vibrio sagamiensis
Ruminococcus obeum

Espécies encontradas em água salgada

Acetoanaerobium noterae
Acinetobacter haemolyticus
Acinetobacter johnsonii
Acinetobacter junii
Acinetobacter parvus
Acinetobacter proteolyticus
Acinetobacter seohaensis
Acinetobacter sp.
Acinetobacter tjernbergiae
Actibacter sediminis
Aequoribacter fuscus
Aeromonas caviae
Aeromonas dhakensis
Aeromonas sanarellii
Aeromonas veronii
Aestuariicola
saemankumensis
Aestuarium zhoushanense
Aquaspirillum
putridiconchylum
Aquaspirillum serpens
Aquiluna borgronia
Aquirufa antheringensis
Arcobacter acticola
Arcobacter aquimarinus
Arcobacter bivalviorum
Arcobacter butzleri
Arcobacter cibarius
Arcobacter cryaerophilus
Arcobacter defluvii
Arcobacter ellisii
Aurantimicrobium minutum

Aureimarina marisflavi
Bacteroides graminisolvens
Bacteroides luti
Bacteroides uniformis
Bacteroides vulgatus
Bifidobacterium adolescentis
Bifidobacterium longum
Blautia luti
Blautia wexlerae
Bradyrhizobium elkanii
Campylobacter sp.
Candidatus Actinomarina
minuta
Candidatus Flaviluna lacus
Candidatus Limnoluna rubra
Candidatus Pelagibacter ubique
Candidatus Planktoluna
difficilis
Candidatus Rhodoluna
limnophila
Chakrabartia godavariana
Citricella marina
Citricella thiooxidans
Cloacibacterium halotis
Cloacibacterium normanense
Clostridium beijerinckii
Clostridium disporicum
Clostridium guangxiense
Collinsella aerofaciens
Curvibacter delicatus
Desulfovibrio desulfuricans
Donghicola eburneus
Dorea longicatena
Enterobacter cloacae
Escherichia coli
Eubacterium rectale
Faecalibacterium prausnitzii
Flavipsychrobacter
stenotrophus
Flavobacterium cucumis
Flavobacterium keumense
Flavobacterium koreense
Flavobacterium succinicans
Fluviibacter
phosphoraccumulans
Formosa spongicola

Frigidibacter albus
Fusicatenibacter
saccharivorans
Gaetbulibacter aquiaggeris
Gammaproteobacteria
bacterium
Gemmobacter nectariphilus
Hoeflea prorocentri
Laribacter hongkongensis
Leisingera caerulea
Limnohabitans australis
Limnohabitans curvus
Limnohabitans parvus
Loktanella hongkongensis
Loktanella soesokkakensis
Lutimaribacter litoralis
Macellibacteroides fermentans
Marinobacterium sp.
Marivita cryptomonadis
Megamonas funiformis
Methylobacterium
fujisawaense
Methyloceanibacter
caenitepidi
Methylocystis parvus
Moraxella osloensis
Novosphingobium barchaimii
Novosphingobium
fuchskuhlense
Novosphingobium
ginsenosidimutans
Novosphingobium
resinovorum
Oceanobacterium insulare
Parabacteroides chartae
Parabacteroides merdae
Paracoccus carotinifaciens
Paracoccus fistulariae
Parasynechococcus
marenigrum
Phaeobacter gallaeciensis
Photobacterium profundum
Polynucleobacter
cosmopolitanus
Polynucleobacter necessarius
Polynucleobacter rarus
Porphyrobacter tepidarius
Prevotella copri

Proteocatella sphenisci
Pseudoalteromonas
fenneropenaei
Pseudomonas aestusnigri
Pseudomonas anguilliseptica
Pseudorhodobacter aquaticus
Pseudorhodobacter
psychrotolerans
Psychrobacter nivimaris
Psychromarinibacter
halotolerans
Rhodobacter megalophilus
Rhodobacter vinaykumarii
Rhodoluna laticola
Rivicola pingtungensis
Romboutsia sp. LA1
Romboutsia timonensis
Roseivivax lentus
Ruminococcoides bili
Ruminococcus bromii
Ruminococcus faecis
Ruminococcus obeum
Sandaracinomonas limnophila
Sinirhodobacter hankyongi
Skermania piniformis
Streptococcus equinus
Sulfuricurvum kujiense
Sulfurospirillum deleyianum
Synechococcus sp.
Thalassolituus marinus
Thioclava arenosa
Tolumonas auensis
Tolumonas osonensis
Trichococcus collinsii
Trichococcus pasteurii
Vibrio azureus
Vibrio chagasii
Vibrio sagamiensis