

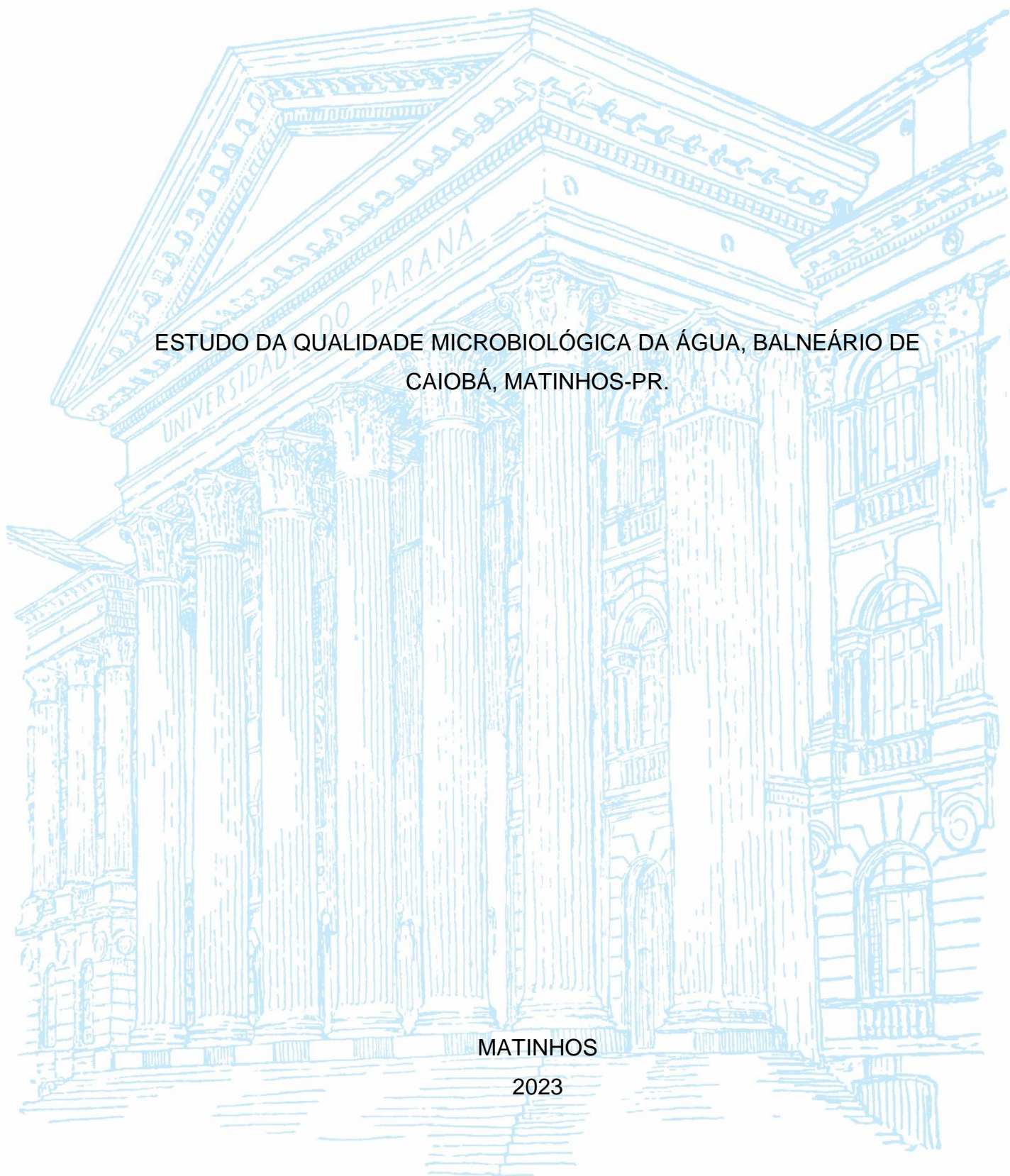
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – SETOR LITORAL
CURSO CIÊNCIAS AMBIENTAIS

HUMBERTO MARCHESI

ESTUDO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA, BALNEÁRIO DE
CAIOBÁ, MATINHOS-PR.

MATINHOS

2023



HUMBERTO MARCHESI

ESTUDO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA, BALNEÁRIO DE
CAIOBÁ, MATINHOS-PR.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Graduação em Ciências Ambientais, Setor de Litoral, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo.

MATINHOS


2023

TERMO DE APROVAÇÃO

HUMBERTO MARCHESI


ESTUDO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA, BALNEÁRIO DE CAIOBÁ, MATINHOS-PR.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Graduação em Ciências Ambientais, Setor de Litoral, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Documento assinado digitalmente
 LUCIANO FERNANDES HUERGO
Data: 24/12/2023 15:04:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Luciano Huergo

Orientador: Setor Litoral, Universidade Federal do Paraná

Documento assinado digitalmente
 LEONARDO MAGALHAES CRUZ
Data: 01/12/2023 14:13:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

Departamento Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Documento assinado digitalmente
 EZEQUIEL ALE
Data: 07/12/2023 14:57:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Ezequiel Ale

PGSISCO, Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná

Matinhos, 28 de Novembro de 2023.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DA CÂMARA CURSO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS
Rua XV de Novembro, 1299, - Bairro Alto da XV, Curitiba/PR, CEP 80060-000
Telefone: - <http://www.ufpr.br/>

ATA DE REUNIÃO

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (TCC) DO CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

Aos 28 dias do mês de Novembro do ano de dois mil e vinte e três, às 14 horas, na sala 24A do Setor Litoral da Universidade Federal do Paraná, reuniram-se sob a presidência do docente prof. Dr Luciano Fernandes Huergo, os seguintes participantes: a estudante **HUMBERTO MARCHESI**, **GRR20192430**, discente da turma de 2019, e os docentes Prof. dr. Leonardo Magalhães Cruz (UFPR) e o Dr. Ezequiel Ale (UFPR), convidados como membros da Banca de Avaliação. O presidente cumprimentou os presentes e iniciou, às 14 horas e 10 minutos, a apresentação pública do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) do supracitado discente, cujo título é: "**ESTUDO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA, BALNEÁRIO DE CAIOBÁ, MATINHOS-PR**", como requisito curricular indispensável à integralização do curso de Bacharelado em Ciências Ambientais. Depois de encerrada a sessão, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela **aprovação** do referido trabalho com conceito APL, divulgando formalmente ao discente o resultado e estabelecendo que a entrega da versão final do TCC deverá ser feita ao orientador no prazo estipulado, conforme as normativas do Trabalho de Conclusão de Curso. Às 18 horas e 00 minutos, eu, na qualidade de presidente da Banca Examinadora, lavrei a presente ata que foi lida e aprovada, sendo a primeira via pertencente à Câmara e a segunda via disponibilizada à discente.



Documento assinado eletronicamente por **LUCIANO FERNANDES HUERGO**, **COORDENADOR(A) DE CURSO DE GRADUACAO (CURSO DE CIENCIAS AMBIENTAIS - BACHARELADO) - SL**, em 30/12/2023, às 00:29, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **6283539** e o código CRC **14A723FB**.

Dedico este trabalho à minha filha Lorena, minha parceira incansável de todas as horas e luz do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Huergo pela inspiração, por todo apoio, orientação, paciência e parceria. Obrigado pela confiança e por me abrir as portas do laboratório e da Ciência.

Agradeço às professoras e professores do Curso de Ciências Ambientais da UFPR Litoral por todo conhecimento compartilhado, pelas incríveis saídas de campo e aulas transformadoras. Ao professor do curso de Licenciatura em Ciências, Emerson Joucoski, pela ajuda na reta final.

Ao Professor Paulo Marques, muito obrigado por todas as aulas e *insights*, principalmente neste último semestre do curso.

Em especial, agradeço às Profas. Dras. Liliani Tiepolo e Juliana Quadros, por me apresentarem os incríveis mistérios da evolução e da biodiversidade e à Profa. Dra. Camila Domit por seu trabalho inspirador.

Muito obrigado à Aldeia Guaviraty e aos estudantes Danilo, Elenilson, Jussara, Paulina e Priscila, por fazerem parte deste trabalho e por me levarem por seus caminhos, às professoras Nahyr e Patricia por propiciarem essa importante experiência e ao coordenador pedagógico da escola Guavira Poty, Mateus Bravo por todo o suporte.

Obrigado a todas as colegas e aos colegas da turma de 2019, pela paciência e parceria, também às colegas e aos colegas das outras turmas de Ciências Ambientais, agradeço à Thais Allipradini pela parceria, apoio e pelo empenho frente ao Centro Acadêmico Teresa Urban.

E à Técnica Vera Chicora, muito obrigado por toda atenção, gentileza, disposição, por me ensinar tanto no laboratório e por ser essa profissional incrível. Aos colegas Ezequiel e Nigella Mendes, pela ajuda e incentivo. Em especial, agradeço à jovem amiga Ana Carolina por todo conhecimento compartilhado e disposição em todos os momentos, poder dividir a bancada com você é um privilégio. Ao amigo Marcelo Conzentino agradeço pelo apoio e por desbravar os caminhos da Bioquímica.

Agradeço ao meu amigo de aventuras e filosofias, Thiago Ventura e sua companheira Débora por toda força e amizade durante esses anos.

Aos meus amigos Edison Ribeiro, Danilo Gomes, José Neto e Vinícius Seraco, muito obrigado pela inspiração durante todos esses anos de amizade e por me ensinarem o valor da irmandade e da fraternidade.

Quero agradecer à minha família, por toda a torcida e apoio. À minha Avó Palmira pelo exemplo de força, à minha tia Marly, pelo incentivo aos estudos e carinho de sempre com todos, aos primos Felipe e Daniela obrigado pela força, mesmo à distância, à minha sogra Maria Jurema, por toda ajuda e entusiasmo.

Ao meu Irmão Mario agradeço pelo exemplo de determinação, de talento e parceria e à minha Mãe Maria Luzinete, pelo exemplo de força, dedicação, resiliência e retidão de caráter.

Por fim, agradeço à minha companheira Giselly Brasil, pela vida de aventuras incríveis, pela inspiração diária, pelo amor e cuidado, pela dedicação a mim e à nossa filha. À Lorena, minha filha linda, agradeço por estar ao meu lado em todos os momentos, por frequentar as aulas comigo, por ser minha parceira e por pintar minha vida com as cores do amor e da alegria.

RESUMO

O litoral do Paraná é classificado como área prioritária para a conservação da Natureza, a diversidade de biomas da região produz vários serviços ecossistêmicos que são fundamentais para a manutenção da biodiversidade, agindo nos ciclos globais do carbono, do nitrogênio e da água. No centro de conflitos socioambientais, a costa paranaense sofre pressões antrópicas diversas, como expressivo crescimento populacional, desigualdades sociais, mudanças no uso e ocupação do solo, etc. A geração de dados, por intermédio do biomonitoramento ambiental, está entre as mais importantes estratégias para a conservação de ecossistemas e espécies ameaçadas. Foi desenvolvido neste trabalho, um estudo de qualidade microbiológica da água, por meio da quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*, durante um período de 13 meses (entre abril de 2022 e maio de 2023), em três pontos do Balneário de Caiobá Matinhos-PR (Praia Mansa, Praia Brava e Pico de Matinhos) durante as obras na orla marítima de Caiobá. O método de análise foi desenvolvido, a partir da adaptação de duas técnicas amplamente consolidadas nas análises laboratoriais (múltiplos tubos e reagente Colilert), para se determinar o Número Mais Provável (NMP/100mL), de acordo com os parâmetros da Resolução CONAMA 274/2000. As médias dos valores aferidos apontam uma expressiva variação nos números de coliformes totais e *E.coli* durante o período das obras na orla. A Matriz de coeficiente Spearman demonstrou valores para r entre 0,28 e 0,62, sugerindo correlação entre os pontos amostrais. Em sua maioria, os números para os três pontos estudados ficaram dentro dos limites definidos como próprios para balneabilidade pela CONAMA 274/2000. Entretanto, das nove coletas que apresentaram a condição imprópria (acima de 1000 coliformes totais/100mL) sete estão no período de execução das obras. Além das intervenções na orla, o aumento na concentração da população circulante em datas festivas e os altos índices pluviométricos, são fatores que podem intensificar os índices de poluição ambiental e possíveis impactos ambientais resultantes. O presente trabalho reforça a necessidade de novas pesquisas sobre o microbioma costeiro paranaense, bem como, o desenvolvimento de planos de biomonitoramento, principalmente para as áreas de preservação. Foi realizado também, um experimento para extração de eDNA (DNA Ambiental) a partir da filtragem de amostras de água marinha dos referidos pontos, e amplificação por reação PCR de genes de interesse, como 16s rRNA (bactérias), COI (invertebrados) e ITS (fungos). A análise das técnicas de eletroforese

demonstraram que o ensaio piloto foi bem sucedido. Por fim, foram realizadas duas oficinas com a temática análises ambientais e microbiologia, utilizando abordagens de ciência cidadã e monitoramento participativo com estudantes da Escola Indígena Guavira Poty, localizada na Aldeia Guaviraty, no balneário Shangrilá, em Pontal do Paraná-PR.

Palavras-chave: Qualidade microbiológica da água; biomonitoramento ambiental; bioindicadores; Litoral do Paraná;

ZUSAMMENFASSUNG

Die Küste von Paraná ist als vorrangiges Naturschutzgebiet eingestuft. Die Vielfalt der Biome in der Region erbringt verschiedene Ökosystemleistungen, die für die Erhaltung der biologischen Vielfalt von grundlegender Bedeutung sind und auf den globalen Kohlenstoff-, Stickstoff- und Wasserkreislauf einwirken. Diese Region, die im Zentrum sozio-ökologischer Konflikte steht, leidet unter verschiedenen anthropogenen Belastungen, wie z. B. einem erheblichen Bevölkerungswachstum, sozialen Ungleichheiten, Veränderungen in der Landnutzung und -besetzung usw. Die Gewinnung von Daten durch Umwelt-Biomonitoring ist eine der wichtigsten Strategien zur Erhaltung bedrohter Ökosysteme und Arten. In dieser Studie wird eine mikrobiologische Wasserqualitätsstudie durchgeführt, indem es über einen Zeitraum von 13 Monaten (zwischen April 2022 und Mai 2023) an drei Stellen im Ferienort Caiobá Matinhos-PR (Praia Mansa, Praia Brava und Pico de Matinhos) während der Bauarbeiten an der Strandpromenade von Caiobá die Gesamtcoliforme und *Escherichia coli* quantifiziert wird. Die Analysemethode wurde durch die Anpassung von zwei in der Laboranalyse weit verbreiteten Techniken (Mehrfachröhrchen und Colilert-Reagenz) entwickelt, um die höchstwahrscheinliche Anzahl (MPN/100mL) in Übereinstimmung mit den Parametern der CONAMA-Resolution 274/2000 zu bestimmen. Die Durchschnittswerte der gemessenen Werte deuten darauf hin, dass die Anzahl der gesamtcoliformen Bakterien und *E.coli* während des Zeitraums der Baustelle. Die Matrix des Spearman-Koeffizienten ergab Wertebereichen von r zwischen 0,28 und 0,62, was auf eine Korrelation zwischen den Probenahmestellen hindeutet. Die Werte für die drei untersuchten Punkte blieben größtenteils innerhalb der Grenzen, die in der CONAMA 274/2000 als zum Baden geeignet definiert sind. Von den neun Proben, die einen ungeeigneten Zustand aufwiesen (über 1000 gesamtcoliforme Bakterien/100 ml), fielen jedoch sieben in den Zeitraum, in dem die Bauarbeiten durchgeführt wurden. Neben den Bauarbeiten sind die erhöhte Konzentration der reisenden Bevölkerung na Festtagen und die hohen Niederschlagsraten Faktoren, die die Umweltverschmutzung und die sich daraus ergebenden möglichen Umweltbelastungen verstärken können. Diese Arbeit unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Forschungen über das Mikrobiom der Küsten von Paraná sowie die Entwicklung von Biomonitoring-Plänen, insbesondere für Schutzgebiete. Es wurde auch ein Experiment zur Extraktion von eDNA (Umwelt DNA)

durchgeführt, indem Meerwasserproben von den oben genannten Punkten gefiltert und die interessierenden Gene wie 16s rRNA (Bakterien), COI (Invertebraten) und ITS (Pilze) mittels PCR amplifiziert wurden. Die Analysen der Elektrophorese-Techniken zeigten, dass der Pilotversuch erfolgreich war. Schließlich fanden zwei Workshops zu Umweltanalysen und Mikrobiologie statt, die mit Hilfe von Bürgerwissenschaft und partizipativen Überwachungsansätzen mit Schülern der indigenen Schule Guavira Poty im Dorf Guaviraty im Badeort Shangrilá in Pontal do Paraná (PR) durchgeführt wurden.

Schlüsselwörter: Mikrobiologische Wasserqualität; Umwelt-Biomonitoring; Bioindikatoren; Küste von Paraná;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa das Unidades de conservação da Bacia Litorânea. Adaptada pelo autor,2023. Fonte: Plano de Bacias Hidrográficas – Aguas Paraná, 2019	18
Figura 2:Mapa da localização do município de Matinhos, adaptada pelo autor,2023. Fonte: ABRAHÃO, C. M. S. et al (2023)	19
Figura 3: Projeto de recuperação da orla de Matinhos. Adaptada pelo autor,2023. Fonte :Parecer técnico UFPR/ITI 2020.	20
Figura 4: NMP: Técnica: Número mais provável. Adaptada pelo autor, 2023 de MARQUEZI, 2010	23
Figura 5: Amostras positivas para coliformes totais e <i>E.coli</i> . Fonte: IDEXX 2019.....	25
Figura 6:Tubos contendo reagente Colilert e amostras. Fonte: O autor, 2022.....	26
Figura 7:Tubos à esquerda positivados para coliformes totais e tubos à direita positivados para E.Coli. Fonte: O autor.	26
Figura 8: Calculadora NMP - FDA-USA; Adaptada pelo autor, 2022 de M. Ferguson, J. Ihrie, (https://mpnncalc.galaxytraker.org/ 2019).	27
Figura 9: Mapa dos pontos de coleta. Fonte: O autor, 2022.	28
Figura 10 – Gráficos das médias para cada um dos três períodos amostrais, entre abril de 2022 e maio de 2023 (valores plotados em escala log10). Fonte: O autor, 2023. Realizado com GraphPad Prism 8.4.1 para Windows.....	33
Figura 11 - Quadro as imagens do ponto B – Praia Brava em cada fase do estudo e os respectivos gráficos dos resultados obtidos. Fonte: O autor, 2022.	34
Figura 12: Matriz de Correlação Spearman. Fonte: O autor, 2023. Realizado com GraphPad Prism 8.4.1 para Windows.	35
Figura 13: Gráficos dos pontos analisados e os valores unitários para cada coleta, em destaque vermelho o período das obras, em laranja os valores limites da Resolução Conama 274/2000 e em verde os índices pluviométricos. Fonte: O autor, 2023	38
Figura 14: Processo de extração de eDNA, amostra do ponto C Pico de Matinhos. 41	
Figura 15: Perfil eletroforético (gel Agarose 1%) da primeira reação PCR: marcadores de peso molecular indicado como M em bp (pares de	

base), somente o gene número 2 ITS atingiu o tamanho esperado, 500 pares de base. Fonte: O autor, 2023	43
Figura 16: Perfil eletroforético (gel Agarose 1%) da segunda reação PCR: marcadores de peso molecular indicado como M em bp (pares de base), os genes, 16s com ~350 pares de e COI com ~750 pares de base, atingiram o tamanho esperado. Fonte: O autor, 2023	45
Figura 17: Registos das oficinas de análises ambientais e microbiologia, com a participação dos estudantes da Escola Indígena Guavira Poty, localizada na Aldeia Guaviraty, no balneário Shangrilá, em Pontal do Paraná-PR.	48
Figura 18: Laboratório Metagenômico portátil, adaptada pelo autor (2023) de <i>Metagenomic water quality monitoring with a portable laboratory</i> ACHARYA, K et al. (2020):	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados obtidos: Quantidade de coliformes totais e <i>E.coli</i> em número mais provável por 100 mL (NMP/100 mL), Ponto A: Praia Mansa, Ponto B: Praia Brava e Ponto C: Pico de Matinhos.	30
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	16
3 ÁREA DE ESTUDO: O LITORAL DO PARANÁ	16
3.1 O MUNICÍPIO DE MATINHOS.....	18
3.2 A ORLA MARÍTIMA DE MATINHOS E AS ALTERAÇÕES EM 2022	19
4 ESTUDO DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA	21
4.1 METODOLOGIA.....	21
4.2 MÉTODOS E TÉCNICAS DE ANÁLISES DA QUALIDADE DA ÁGUA.....	23
4.3 MÉTODO DE ANALISE LABORATORIAL	25
4.4 OS PONTOS E O PROCEDIMENTO DE COLETAS	27
4.5 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	28
4.6 RESULTADOS E DISCUÇÃO.....	29
4.6.1 DADOS OBTIDOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.	29
4.6.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	30
4.6.3 PERÍODOS AMOSTRAIS E SEUS RESULTADOS	31
5 DNA AMBIENTAL – EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE INTERESSE DE UMA AMOSTRA PILOTO	39
5.1 METODOLOGIA.....	40
5.2 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE POR REAÇÃO DE PCR E ANÁLISE POR ELETROFORESE.	41
6 AÇÕES EXPERIMENTAIS DE CIÊNCIA CIDADÃ E MONITORAMENTO PARTICIPATIVO	46
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
8 REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Toda vida na Terra depende direta ou indiretamente do oceano. Sua área cobre 71% da superfície do planeta e contém cerca de 97% da água da Terra. O oceano e a criosfera apoiam habitats únicos e estão interligados com outros componentes do sistema climático através do intercâmbio global de água, energia e carbono (IPCC, 2019: SROCC).

As pressões advindas das atividades humanas, como a poluição dos ambientes marinhos e a pesca predatória, somadas às alterações climáticas, representam uma séria ameaça à vida no Oceano. Em alguns lugares, especialmente em águas próximas da superfície, observa-se impactos dramáticos em animais marinhos, plantas e microorganismos (IPCC, 2019: SROCC).

Estes fatores e seus efeitos combinados são prejudiciais para praticamente todos os organismos, cadeias alimentares e ecossistemas. Os maiores impactos negativos foram observados na África, na Ásia e na América Latina. (IPCC, 2023: Summary for Policymakers).

A geração de dados, através de projetos de monitoramento e biomonitoramento ambiental, está entre as mais importantes estratégias para a conservação dos referidos ecossistemas, preservação de espécies ameaçadas e para a manutenção dos serviços ecossistêmicos entregues pelos biomas.

A utilização de indicadores biológicos é muito útil por sua especificidade em relação a certos tipos de impacto, índices podem ser criados para detectar agentes de poluição orgânica, alteração de pH da água, etc. Além disso, contribuirão para a redução de custos com aumento da eficiência de análise e simplificação dos resultados (BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F. & NESSIMIAN, J. L, 2001).

A legislação ambiental vigente, como as resoluções do CONAMA nº 274, de 2000 e 357 de 2005, a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (Portaria de Potabilidade), define parâmetros a serem monitorados para que se avalie a qualidade da água.

O litoral do Paraná é classificado como área prioritária para a conservação, de extrema importância para a biodiversidade brasileira (Portaria MMA 126/2004, as Áreas Prioritárias para a Biodiversidade). A diversidade de biomas da região produz vários serviços ecossistêmicos que são fundamentais para a manutenção da biodiversidade (Watanabe e Ortega, 2011).

Epicentro de conflitos socioambientais, a costa paranaense sofre as pressões causadas pelo expressivo crescimento populacional, desigualdades sociais e pelas transformações nas dinâmicas de uso e ocupação do solo, fatores que resultam em grande vulnerabilidade socioambiental (TIEPOLO, 2015).

Fatores como aumento populacional do município de Matinhos, acima dos 30% em 12 anos (IBGE,2022), a busca por lazer e turismo ao livre no período pós-pandêmico e as reformas na orla de Matinhos, contribuíram para o incremento no fluxo de pessoas no Litoral e possivelmente, intensificaram as pressões antrópicas sofridas pelos ecossistemas da região.

A informação sobre as condições de balneabilidade nas praias de Matinhos são disponibilizadas pelo Instituto Água e Terra somente durante a alta temporada (<https://www.iat.pr.gov.br/Pagina/Balneabilidade>). Os dados aferidos não são apresentados, somente o status “própria” ou “imprópria”.

O presente trabalho é fruto do caminho investigativo percorrido durante as aulas, saídas de campo e experimentos em laboratório no âmbito do curso de Bacharel em Ciências Ambientais do setor Litoral, onde as questões acima descritas, foram analisadas.

A Microbiologia Ambiental e a Química analítica aplicadas a ações de monitoramento ambiental, seus desdobramentos e possíveis aplicações no contexto do Litoral do Paraná foram definidos como foco central desde trabalho.

Assim, um estudo experimental da qualidade microbiológica da água (balneabilidade), avaliando a quantidade de coliformes totais e de bactérias *Escherichia coli* (bioindicadores) presentes na água mar foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular da UFPR Litoral, a partir da adaptação de duas técnicas consolidadas, de acordo com os padrões determinados pelas agências de controle de saúde e meio ambiente. Dentre elas as resoluções do CONAMA nº 274, de 2000 e 357 de 2005, a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (Portaria de Potabilidade) e o Manual prático de análise da água da FUNASA (2013).

Ações experimentais de Ciência Cidadã e monitoramento ambiental participativo, a partir dos temas e protocolos laboratoriais desenvolvidos, também foram objetos investigados, uma vez que se mostram fundamentais para as ações de conservação da natureza e para o empoderamento das comunidades (CONSTANTINO, P et al. 2012).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo realizar um estudo da qualidade microbiológica da água, na cidade de Matinhos-PR, no contexto das intensas alterações costeiras de origem antrópica no ano de 2022 e seus possíveis reflexos.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- a- Realizar um estudo de qualidade microbiológica da água, através de análise da quantidade de coliformes totais e *Escherichia coli*, por um período de 12 meses em três pontos do Balneário de Caiobá (Praias Mansa, Brava e Pico de Matinhos), durante as obras na orla marítima de Matinhos.
- b- Extração de eDNA (DNA ambiental) e amplificação por reação PCR de genes de interesse como 16S rRNA, ITS e COI de uma amostra piloto de água marinha.
- c- Desenvolvimento e aplicação experimental de protocolo ciência cidadã, por meio de oficina de monitoramento participativo, com participação de jovens e crianças, a partir dos assuntos e técnicas presentes neste trabalho.

3 ÁREA DE ESTUDO: O LITORAL DO PARANÁ

No contexto das emergências climáticas, as regiões tidas como *hotspot* de biodiversidade tornam-se foco central das ações de conservação e pesquisa. Como é o caso do litoral do Paraná.

Região que faz parte do complexo LAGAMAR (Complexo Estuarino Lagunar-Paranaguá-Cananeia-Iguape) e que somado aos outros ecossistemas de Mata Atlântica presentes é considerada o terceiro ecossistema mais produtivo do Atlântico Sul. Além disso, os importantes complexos estuarinos, (o de Paranaguá com 612km² de área superficial, e o de Guaratuba com 50km²) compõe essa área que foi tombada

como *Patrimônio da Humanidade* pela UNESCO (Unesco 1999), por sua incrível beleza cênica natural e pela sua enorme biodiversidade. (DOMIT.C, et al 2019).

A costa paranaense apresenta geomorfologia diversa, com praias arenosas, costões rochosos, planícies de maré, ilhas costeiras e extensas bacias hidrográficas. A região costeira sofre forte ação da influência estuarina, das correntes de marés, e de importantes rios que carregam os sedimentos da serra para as regiões dos estuários e manguezais. (BIGARELLA, 2001)

O clima da região é subtropical com verão quente (com temperaturas maiores que 22°C) e altos índices pluviométricos (mais de 30 mm de chuva no mês mais seco do ano. (ÁGUAS PARANA, 2019)

O bioma predominante em todo o litoral é a Mata Atlântica (Lei Federal nº 11.428/2006), sua formação florestal basicamente composta pelas florestas Ombrófila Densa, Ombrófila Mista, Manguezais, por vegetações de restinga, campos de altitude e brejos interioranos. (BIGARELLA, 2001)

Com tantos habitats, a região abriga um variado número de espécies ameaçadas de extinção como o Boto-Cinza (*Sotalia guianensis*), o Mero (*Epinephelus itajara*), a tartaruga-verde, (*Chelonia mydas*), além das migratórias que visitam a região para alimentação, reprodução, etc., (DOMIT.C, et al 2019).

Além disso, a diversidade de biomas da região produz vários serviços ecossistêmicos que são fundamentais para a manutenção da biodiversidade, agindo nos ciclos do carbono, do nitrogênio e da água, contribuem para a regulação climática associada ao equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos globais (Watanabe e Ortega, 2011).

A riqueza cultural é outra importante característica do litoral paranaense, com suas inúmeras comunidades indígenas, quilombolas, caiçaras, de pescadores artesanais que guardam e mantêm vivo um enorme patrimônio cultural brasileiro (BIGARELLA, 2001).

Por reunir todos esses fatores, o litoral do Paraná apresenta um conjunto de Unidades de Conservação de variadas classificações e é definido como área prioritária para a conservação, de extrema importância para a biodiversidade brasileira (Portaria MMA 126/2004, as Áreas Prioritárias para a Biodiversidade).

FIGURA 1: MAPA DAS UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DA BACIA LITORÂNEA.

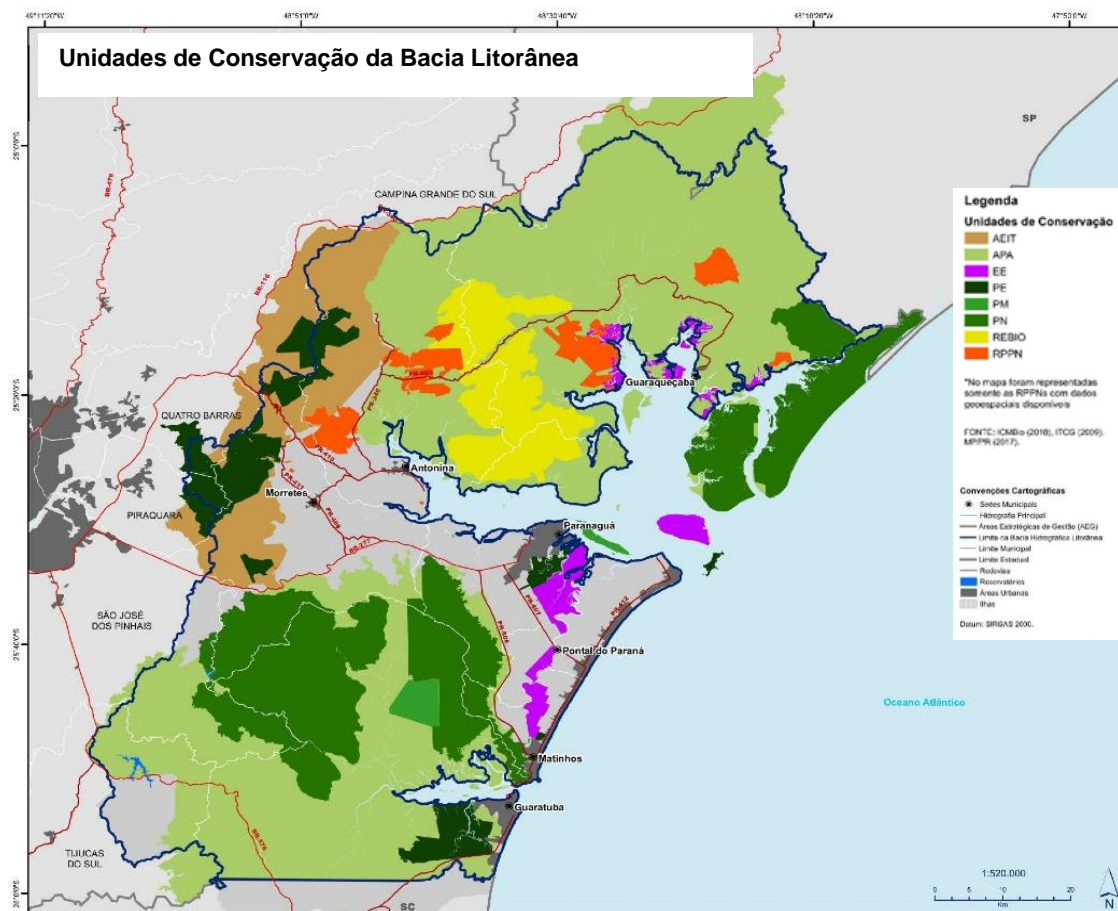


Figura 1: Mapa das Unidades de conservação da Bacia Litorânea. Adaptada pelo autor, 2023.
 Fonte: Plano de Bacias Hidrográficas – Aguas Paraná, 2019

3.1 O MUNICÍPIO DE MATINHOS

Matinhos é um dos sete municípios da planície litorânea do estado do Paraná e está delimitado entre o oceano atlântico e a Serra do Mar, fazendo divisa ao sul e oeste com Guaratuba, a norte com Pontal do Paraná e a Noroeste com Paranaguá (ABRAHÃO, C. M. S. et al, 2023)

O Censo Demográfico do ano 2022 apontou que Matinhos possui 39.259 habitantes, tendo um aumento de 33,41% da população, em relação ao Censo de 2010, 29.172 (IBGE, 2022)

O turismo é a principal atividade econômica no município e nos meses de temporada recebe centenas de milhares de pessoas. Somente nos dias do feriado da

virada do ano de 2023, aproximadamente 600 mil turistas estiveram presentes na cidade (Prefeitura Municipal de Matinhos, 2023).

FIGURA 2: MAPA DA LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE MATINHOS.

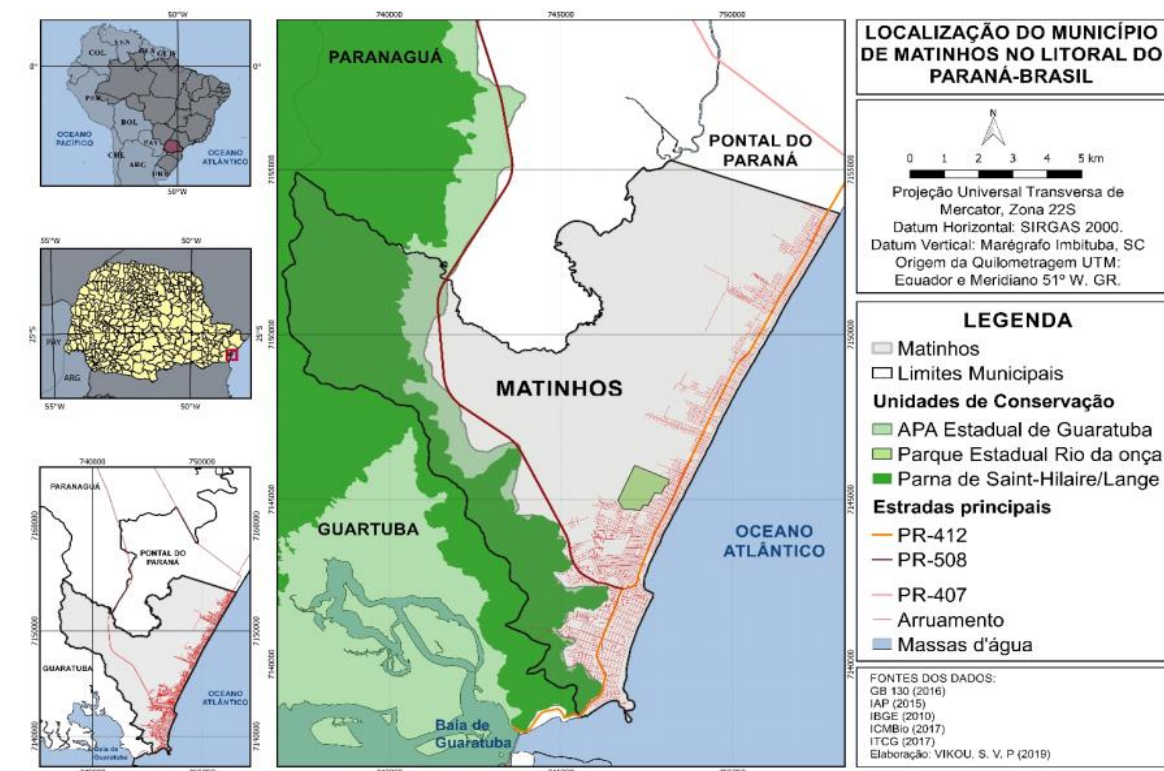


Figura 2: Mapa da localização do município de Matinhos, adaptada pelo autor, 2023. Fonte: ABRAHÃO, C. M. S. et al (2023)

3.2 A ORLA MARÍTIMA DE MATINHOS E AS ALTERAÇÕES EM 2022

O município de Matinhos sofre com altos índices de erosão em sua costa, reflexo dos processos de urbanização das faixas costeiras.

No final da década de 1970, foram implantados gabiões na Praia Mansa, no balneário de Caiobá, que obtiveram resultados satisfatórios. No entanto, a mesma solução aplicada à extensão total de Caiobá até Matinhos, não foi eficiente em virtude da maior energia das correntes marítimas nestas regiões.

Em 2010, um estudo de Estudo de Impacto Ambiental (EIA-AMB, 2010), obteve a Licença Prévia nº 24.234/201 propondo, a partir do Morro do Boi até o Balneário Flórida, a construção de *headlands*, com extensão maior de 100 metros e com extremidades alargadas e a adoção de estruturas como guias-corrente a fim de

amenizar os efeitos erosivos das correntes marítimas, além da recomposição da faixa de areia.

No ano de 2015 foi concedido a Licença de Instalação nº 18098/2015 ao projeto executivo da empresa Aquamodelo, que incluiu novas estruturas e um espigão na Praia Brava, vinculando determinadas condicionantes à execução de programas ambientais de monitoramento e controle dos impactos ambientais decorrentes da implantação. (UFPR/ITI 2020 – *Parecer técnico*).

FIGURA3: PROJETO DE RECUPERAÇÃO DA ORLA DE MATINHOS

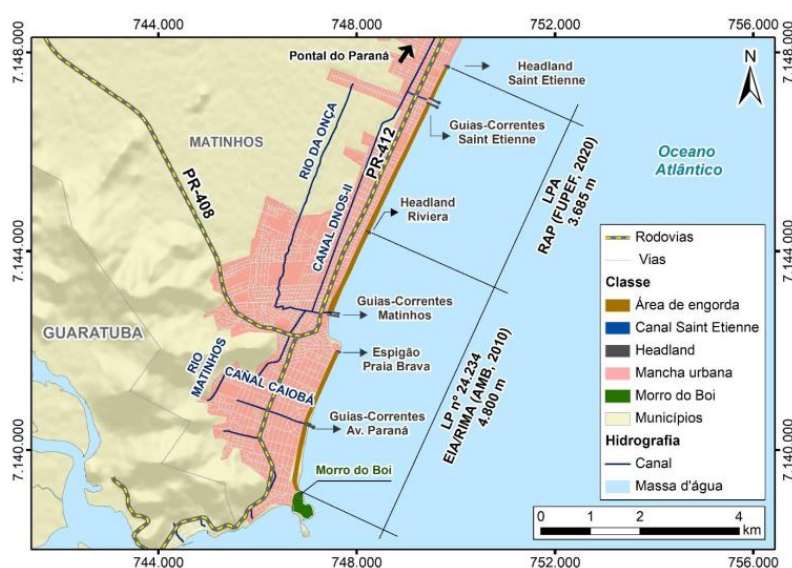


Figura 3: Projeto de recuperação da orla de Matinhos. Adaptada pelo autor, 2023. Fonte: Parecer técnico UFPR/ITI 2020.

O Grupo de trabalho da UFPR (GT-UFPR), composto por pesquisadores especialistas, levantou uma série de questionamentos acerca do projeto, suas características e impactos, como consta na 2ª Nota Técnica de 30 de novembro 2020. Na ocasião, o texto apontava a necessidade de um novo processo de licenciamento ambiental, além dos aspectos já citados.

O Ministério Público Federal propôs uma ação civil pública (nº 50561654720214047000) questionando os processos de licenciamento ambiental. As decisões judiciais reconheceram as falhas, mas deram aval para a continuidade das obras no ano de 2022. (Fonte: MPF, 2022 <<https://www.mpf.mp.br/pr/sala-de-imprensa/noticias-pr/mpf-recorre-de-decisao-que-permitiu-a-continuidade-da-obra-na-orla-maritima-de-matinhos>>)

Atualmente, o projeto está praticamente finalizado, com as estruturas marítimas e intervenções urbanas quase prontas. No entanto, parte das obras encontram-se suspensas pelo IBAMA, e o IAT foi multado em R\$ 835 mil, por conta de irregularidades no replantio da restinga, fato amplamente divulgado na imprensa (Fonte site G1, 2023: <https://g1.globo.com/pr/parana/noticia/2023/08/19/iat-e-multado-em-r-835-mil-por-interferencias-na-restinga-na-orla-de-matinhos.ghtml>).

Segundo Onofre, et al. (2022), as inconsistências dos processos de licenciamento e dos estudos de impactos ambientais, no contexto do Litoral do Paraná, representam um cenário de risco complexo e incerto, devido aos impactos que o conjunto de empreendimentos previsto desencadeará às comunidades costeiras mais vulnerabilizadas, aos ambientes naturais e culturais importantes.

De acordo com a renovação da licença de instalação do projeto (nº: 18098/2023, validade de 20/04/2025), foram estabelecidas, entre outras, as seguintes condicionantes para a continuidade da obra:

Monitorar e propor programas de monitoramento para: a) A fauna de tetrápodes associados ao ambiente costeiro marinho e praial, o supralitoral (faixa de areia e restinga), o mesolitoral e o infralitoral; b) A qualidade da água nos pontos de amostragem dos programas de monitoramento de fauna; c) A colonização das estruturas rígidas a serem construídas; d) A colonização e recolonização dos ambientes criados e restaurados; e) Os manguezais do rio Matinhos e Baía de Guaratuba, visando detectar possíveis alterações sobre esses ambientes. (SEDEST-IAT,2022-pg2).

O Instituto Água e Terra - IAT não disponibiliza informações ou dados sobre os programas de monitoramento ambiental. Não houve retorno para as tentativas de contato realizadas e no site do IAT não há referência a não ser a matéria jornalística, disponível em: (<https://www.aen.pr.gov.br/Noticia/Programas-ambientais-garantem-bom-andamento-das-obras-na-Orla-de-Matinhos>).

4 ESTUDO DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

4.1 METODOLOGIA

No monitoramento ou análise da qualidade de água são utilizados indicadores biológicos específicos como bactérias do grupo coliforme. O termo “indicadores biológicos específicos” indica que um tipo de microrganismo, estando presente na água é uma suspeita que ela está poluída com material fecal de origem humana ou de outros animais de sangue quente (YAMAGUCHI et al., 2013).

A Resolução CONAMA nº 274, de 2000 conceitua os dois grupos de bactérias que são alvos das análises de controle da qualidade da água:

- a) Coliformes fecais (termotolerantes): bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais caracterizadas pela presença da enzima β -galactosidase e pela capacidade de fermentar a lactose com produção de gás em 24 horas à temperatura de 44-45°C em meios contendo sais biliares ou outros agentes tenso-ativos com propriedades inibidoras semelhantes. Além de presentes em fezes humanas e de animais podem, também, ser encontradas em solos, plantas ou quaisquer efluentes contendo matéria orgânica;
- b) *Escherichia coli*: bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, caracterizada pela presença das enzimas β -galactosidase e β -glicuronidase. Cresce em meio complexo a 44-45°C, fermenta lactose e manitol com produção de ácido e gás e produz indol a partir do aminoácido triptofano. A *Escherichia coli* é abundante em fezes humanas e de animais, tendo, somente, sido encontrada em esgotos, efluentes, águas naturais e solos que tenham recebido contaminação fecal recente;

O Artigo 2º, da mesma resolução, define a categoria das águas destinadas a balneabilidade, bem como seus parâmetros para o uso:

As águas doces, salobras e salinas destinadas à balneabilidade (recreação de contato primário) terão sua condição avaliada nas categorias própria e imprópria.

§ 1º As águas consideradas próprias poderão ser subdivididas nas seguintes categorias:

a) Excelente: quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo, 250 coliformes fecais (termotolerantes) ou 200 *Escherichia coli* ou 25 enterococos por 100 mililitros;

b) Muito Boa: quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo, 500 coliformes fecais (termotolerantes) ou 400 *Escherichia coli* ou 50 enterococos por 100 mililitros;

c) Satisfatória: quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo 1.000 coliformes fecais (termotolerantes) ou 800 *Escherichia coli* ou 100 enterococos por 100 mililitros.” (CONAMA, 2000).

4.2 MÉTODOS E TÉCNICAS DE ANÁLISES DA QUALIDADE DA ÁGUA

O método de análise empregado surgiu da adaptação de duas técnicas amplamente usadas e consolidadas no campo das análises laboratoriais, são elas:

a) Método convencional que realiza a contagem de coliformes totais termotolerantes e *Escherichia coli* em água pelo Número Mais Provável (NMP) ou Técnica de Múltiplos Tubo.

É uma técnica de análise quantitativa que permite conhecer o *Número Mais Provável* (NMP) de micro-organismos presentes na amostra original. Em tubos de ensaios são colocados os meios e alíquotas de amostras das diversas diluições. Após o período de incubação os tubos são especificados como positivo ou negativo. Com a ajuda da tabela do Número Mais Provável é possível identificar aproximadamente quantos dos micro-organismos que foram analisados se fazem presentes na amostra (MARQUEZI, 2010, apud SILVA et al.,2010).

FIGURA 4: TÉCNICA DE MÚLTIPLOS TUBOS – NÚMERO MAIS PROVÁVEL

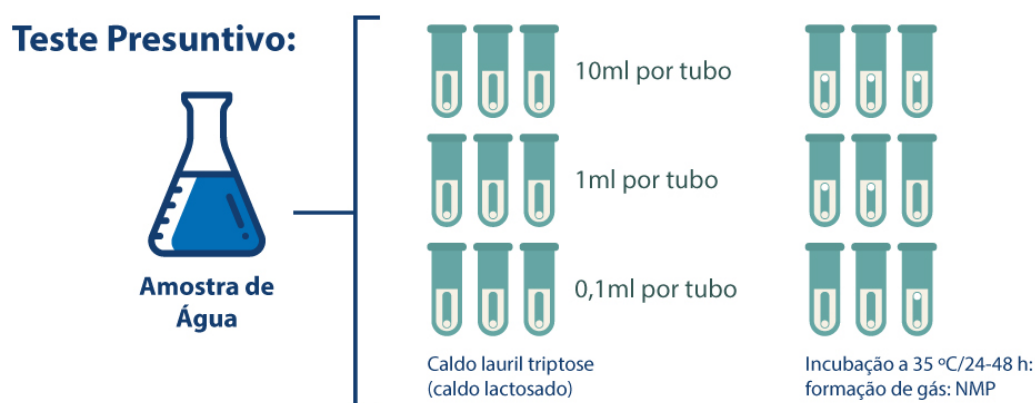
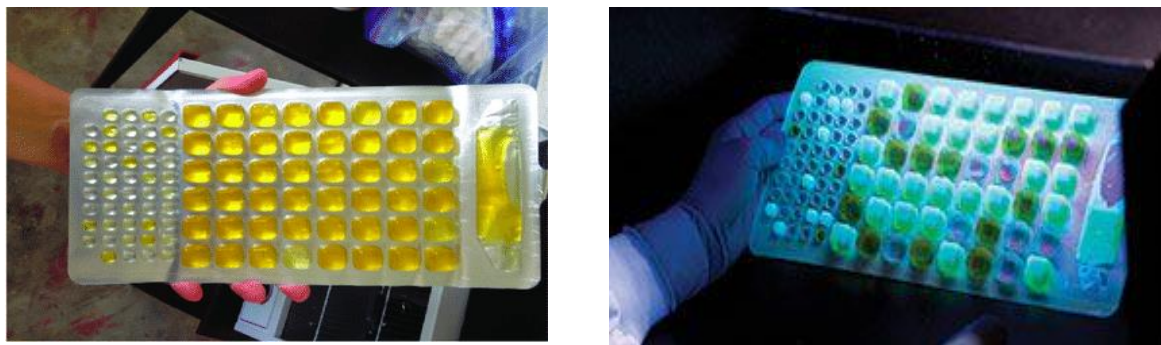


Figura 4: NMP: Técnica: Número mais provável. Adaptada pelo autor, 2023 de MARQUEZI, 2010

b) Método de contagem rápida Colilert (IDEXX): Técnica do Substrato Cromogênico Enzimático:

- Baseia-se na identificação dos microrganismos pela análise de suas enzimas constituintes (COVERT et al., 1989).
- Contém os substratos cromogênico orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) e o fluorogênico 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG), que detectam simultaneamente as bactérias do grupo coliforme total e *E.coli* em amostras de água (MANAFI, 2000).
- Não há necessidade de se realizar testes confirmatórios ou complementares nem isolar culturas puras, necessitando apenas de uma estufa a 35°C e uma luz ultravioleta (365nm) (MARQUEZI 2010, apud ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001; EDBERG; ALLEN; SMITH, 1988).
- O substrato cromogênico ONPG é usado na detecção da enzima típica do grupo coliformes totais, a β -galactosidase, que hidrolisa o ONPG a orto-nitrofenol resultando na alteração da cor do meio para amarelo (MARQUEZI,2010 apud GREGHI, 2005; HUNT; RICE, 2005; SILVA et al., 2005).
- Para a detecção de *E.coli*, o substrato MUG sofre a ação da enzima β -glucuronidase, que é característica desta bactéria. Ao ser degradado, o MUG libera a 4-metilumbeliferona que, quando submetida à luz ultravioleta, apresenta fluorescência (MARQUEZI 2010, apud COVERT et al., 1989; SILVA et al., 2005).
- Para a aferição do resultado, o método Colilert, utiliza o sistema Quanti-Tray, uma amostra de 100 ml é dividida na cartela que contém 51 poços, possibilitando a determinação do número de bactérias pela técnica NMP utilizando a “*tabela de determinação do NMP Sistema Quanti-Tray*” fornecida pelo fabricante.

FIGURA 5: AMOSTRAS POSITIVA PARA COLIFORMES TOTAIS E *E.coli*Figura 5: Amostras positivas para coliformes totais e *E.coli*. Fonte: IDEXX 2019

4.3 MÉTODO DE ANALISE LABORATORIAL

O desenvolvimento de uma técnica que dispensasse a aquisição do sistema Quanti-Tray (por conta do elevado custo), mas que possibilitasse a utilização do reagente Colilert (material disponível no Laboratório de Microbiologia Molecular da UFPR-Setor Litoral) foi possível substituindo a cartela Quanti-Tray por um modelo de tubos múltiplos, de forma que o reagente diluído em água esterilizada é inoculado com as amostras de água coletadas, em seguida os tubos são incubados em uma estufa por 24 horas em uma temperatura de 36 ° C .

O modelo de tubos múltiplos adotados para todos os pontos de coleta foi:

- a) Diluição do frasco com reagente Colilert em 100ml de água esterilizada.
- b) Primeira série de diluição 10^{-1} = 3 tubos Falcon por ponto, contendo 9ml de reagente Colilert e 1 ml de amostra de água do mar.
- c) Segunda série de diluição: 10^{-2} = 3 microtubos de 1,5 ml, contendo 900 μ l de reagente Colilert e 100 μ l de amostra de água do mar.
- d) Terceira série de diluição: 10^{-3} = 3 microtubos de 1,5 ml, contendo 900 μ l de reagente Colilert e 100 μ l da diluição anterior.

FIGURA 6 :TUBOS COM REAGENTE COLILERT INOCULADOS COM AMOSTRAS.



Figura 6:Tubos contendo reagente Colilert e amostras. Fonte: O autor, 2022.

FIGURA 7 :TUBOS POSITIVADOS COM COL.TOTAIS E E.COLI

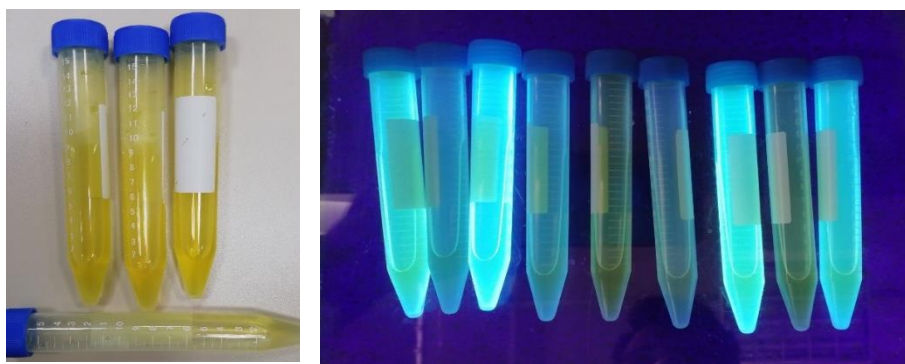


Figura 7:Tubos à esquerda positivados para coliformes totais e tubos à direita positivados para E.Coli. Fonte: O autor.

A determinação do NMP é realizada utilizando a calculadora desenvolvida por M. Ferguson, J. Ihrie (<https://mpncalc.galaxytracr.org/>), do “*Bacteriological Analytical Manual – BAM*” da “*FDA Foods and Drugs Administration*” (órgão do governo dos Estados Unidos equivalente a ANVISA no Brasil).

Nessa ferramenta online, determina-se a quantidade de tubos utilizados, seu volume e a diluição das amostras, além de informar a quantidade de positivos para cada leitura, como ilustra a figura abaixo:

FIGURA 8 :CALCULADORA NMP – (FDA's Bacteriological Analytical Manual - BAM)

Original Inoculum Amount (g)	Number of Tubes (per dil. step)	Positive Tubes (per dil. step)
0,1	3	1
0,01	3	1
0,001	3	1

Results

Assumes microbial contamination is randomly distributed throughout the dilution.

11
MPN / g

95% CI: (3.5, 35)

Confidence limits are calculated using a normal approximation to log(MPN)

Bias-corrected MPN: 8.7

Recommend bias correction if total number of tubes is less than 15.

MPN per 100 mL: 1100

Rarity Index: 5.81e-03

If Rarity Index < 1.00E-04, then outcome is improbable.

Figura 8: Calculadora NMP - FDA-USA; Adaptada pelo autor, 2022 de M. Ferguson, J. Ihrie, (<https://mpncalc.galaxytraker.org/> 2019).

4.4 OS PONTOS E O PROCEDIMENTO DE COLETAS

Os procedimentos foram adotados de acordo com o “*Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos.*” (CETESB, ANA. 2011). Para o referido estudo foram determinados três pontos de amostragem no Balneário de Caiobá:

Ponto A – (Coordenadas - 25.8493036, -48.5371509) - Canto da Praia Mansa, também conhecida como Praia do Belo. Ponto mais conservado em relação a ação antrópica, não há obras previstas para essa região.

Ponto B – (Coordenadas -25.825466, -48.532260) - Praia Brava (altura do Sesc Caiobá). Maior concentração de banhistas e grande incidência das ações antrópicas, principalmente pelas obras de engorda da orla, toneladas de areia do fundo do mar foram depositadas nesse ponto alterando estrutura da praia.

Ponto C – (Coordenadas -25.817934, -48.527634) - Pico de Matinhos (a frente do costão rochoso). Além da grande concentração de surfistas, a localidade abriga um rico ecossistema, com espécies de algas, pequenos siris, caranguejos,

peixes e é muito frequentado por espécies de tartarugas que buscam alimentar-se das algas que crescem nas pedras do costão, como a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) ameaçada de extinção e a tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*) que está vulnerável (2023, *The IUCN Red List of Threatened Species*).

FIGURA 9: PONTOS DE COLETAS NO BALNÁRIO CAIOBÁ – MATINHOS-PR

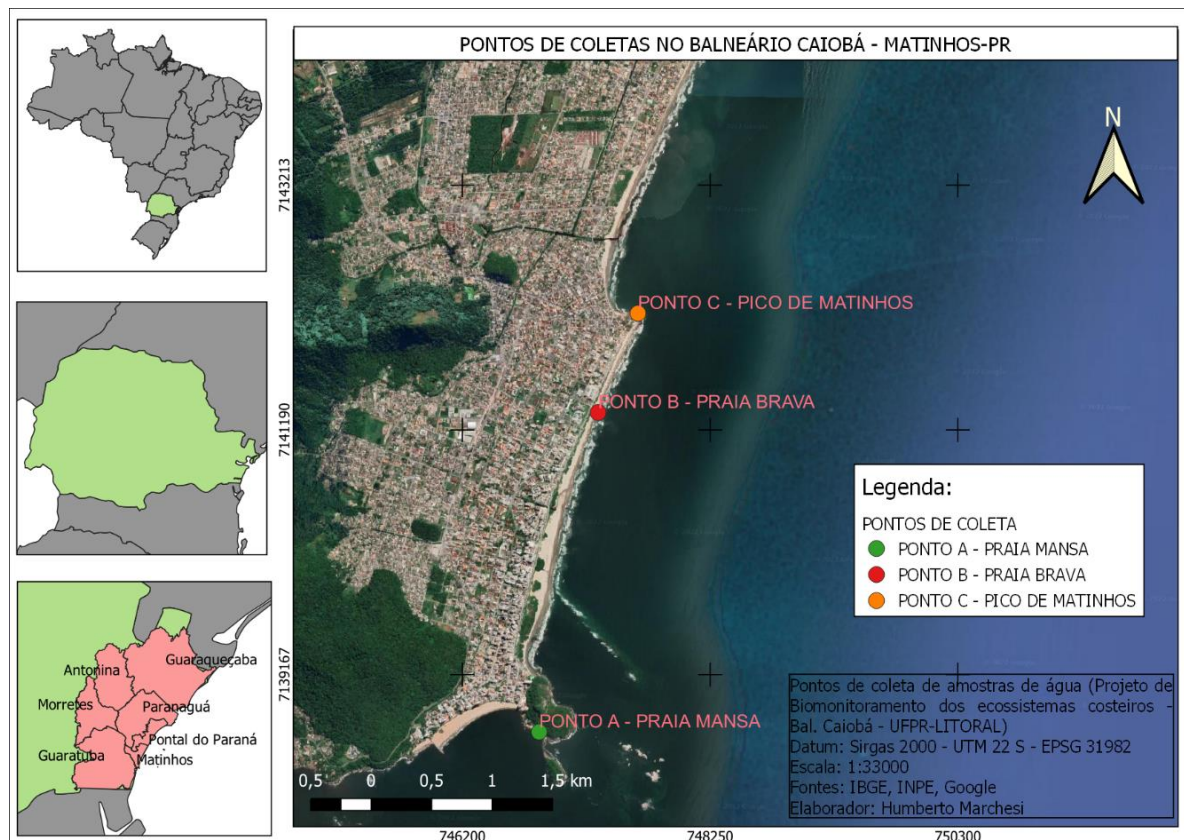


Figura 9: Mapa dos pontos de coleta. Fonte: O autor, 2022.

4.5 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Para a realização do estudo, foram estabelecidas as seguintes variáveis:

- Quantidade de Coliforme Totais e *E.coli* (NMP/100ml) para os pontos A, B e C.
- A somatória dos volumes de precipitação diários em milímetros, observados no intervalo de 7 dias na semana da coleta, sendo definido o dia da coleta como D 0 e o sexto dia anterior D -6. Fonte: Estação medidora

ETE SANEPAR – MATINHOS. ÁGUAS PARANÁ - Instituto das Águas do Paraná. Sec. Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

- c) Variação da amplitude da maré em metros, no período das coletas, entre 8h00 e 11h00. (Fonte: estação: Barra de Paranaguá - canal da Galheta - Marinha do Brasil,2023)
- d) Regime de maré no período das coletas, sendo Preamar (subindo) valor 1 e Baixa-mar (descendo) valor 0. (Fonte: estação: Barra de Paranaguá - canal da Galheta - Marinha do Brasil,2023).

As análises estatísticas foram desenvolvidas no software GraphPad Prism versão 8.4.1 para Windows.

4.6 RESULTADOS E DISCUÇÃO.

Ao todo foram realizadas 18 coletas num intervalo de 13 meses, de 19 de abril 2022 à maio de 2023. O período amostral foi subdividido em:

- ANTES DA OBRA – entre as coletas de 19/04/2022 à 20/05/2022.
- DURANTE A OBRA – entre as coletas de 26/05/2022 à 21/08/2022.
- DEPOIS DA OBRA – entre as coletas de 22/09/2022 à 15/05/2023.

4.6.1 DADOS OBTIDOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.

O conjunto de dados obtidos ao final do estudo está representado na tabela abaixo (tabela 1).

O período definido como “antes da obra”, conta com um menor números de dados, pois, o presente trabalho começou a ser desenvolvido após a confirmação da realização da obra pelas decisões judiciais em março de 2022. O início do levantamento dos dados ocorreu após a definição dos protocolos de análises laboratoriais, ajustando as duas técnicas já mencionadas (múltiplos tubos e Colilert), o que ocorreu em abril de 2022.

O intervalo de tempo definido como “durante a obra” foi determinado a partir do momento em que a areia começou a ser jogada no ponto B (Praia Brava), em 25 de junho de 2022. Ocasão em que foi realizada uma cerimônia pelas autoridades

estaduais e municipais (fonte: Governo do Estado <https://www.vicegovernadoria.pr.gov.br/Noticia/Governador-autoriza-inicio-das-obras-de-dragagem-e-revitalizacao-de-Matinhos>). E seu término foi determinado quando o processo de jogar areia na praia Brava foi finalizado.

TABELA 1: DADOS OBTIDOS A PARTIR DAS COLETAS E ANÁLISES LABORATORIAIS.

Período	Dta-Coletas	Pto A - Col.Totais	Pto A - E-coli	Pto B - Col.Totais	Pto B - E-coli	Pto C - Col.Totais	Pto C - E-Coli	Precip. Sem. (mm)	Ampl. da maré (m)	Sub. (1) ou Desc.(0)
Antes da obra	19/04/22	110	0	40	0	40	0	26,5	1	0
	27/04/22	450	110	110	40	110	110	31,6	0,8	0
	12/05/22	110	40	40	40	110	0	7,2	1	0
	20/05/22	40	0	120	40	170	110	0	0,2	1
Durante a obra	26/05/22	3600	110	3600	0	3600	110	0	0,6	0
	08/06/22	24000	170	9300	170	450	110	161,7	0,7	1
	15/06/22	24000	170	3100	40	170	170	8,3	1	0
	22/06/22	110	0	40	0	40	0	0	0,5	1
	06/07/22	450	0	110	110	110	110	0	0,4	1
	03/08/22	40	40	450	450	40	40	0	0,8	0
	31/08/22	0	0	40	40	66	0	3,4	1,1	0
Depois da obra	22/09/22	240	40	170	40	110	0	40,5	1	0
	29/09/22	110	0	450	40	110	0	24,3	1,2	0
	28/12/22	81	81	120	120	0	0	44,5	0,7	0
	10/01/23	320	40	170	170	240	81	12,5	1	1
	12/04/23	240	0	0	0	0	0	189,9	0,2	0
	03/05/23	46000	0	9300	0	81	0	41,1	1,4	0
	17/05/23	40	0	33	0	33	0	1,1	0,9	0

Tabela 1: Dados obtidos: Quantidade de coliformes totais e *E.coli* em número mais provável por 100 mL (NMP/100 mL), Ponto A: Praia Mansa, Ponto B: Praia Brava e Ponto C: Pico de Matinhos.

A tabela acima apresenta os dados obtidos para: Quantidade de coliformes totais e *E.coli* em número mais provável por 100 mL (NMP/100 mL), nos Ponto A: Praia Mansa, Ponto B: Praia Brava e Ponto C: Pico de Matinhos. Para a determinação do NMP a calculadora do *FDA's Bacteriological Analytical Manual (BAM)* foi calibrada para um intervalo de confiança de 95%.

4.6.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A primeira análise realizada foi o teste de normalidade dos dados. O resultado em sua maioria não apresentou um valor de P acima 0,05 (teste D'Agostino &

Pearson–Prism 8.4.1). O que indica um padrão de não normalidade no conjunto dos dados. Os valores fora da curva foram justamente observados, em sua maioria, no período “Durante a obra”.

Neste caso, foram realizados testes não paramétricos, além das análises das médias durante cada período. Foi aplicado o coeficiente de correlação de Spearman, cujo valores representam a relação entre cada uma das variáveis. (H. J. Motulsky, GraphPad Statistics, 2016).

4.6.3 PERÍODOS AMOSTRAIS E SEUS RESULTADOS

A resolução CONAMA 274/2000 define as águas, destinadas à balneabilidade, que apresentarem valores acima de 1000 colif. totais ou 800 *E. coli* por 100mL, em um conjunto mínimo de 5 amostras, considerando a forma mais restritiva, como impróprias.

Os padrões referentes às águas consideradas próprias são definidas conforme os valores abaixo:

- 250 coliformes totais ou 200 *E.coli* por 100 mL = Excelente.
- 500 coliformes totais ou 400 *E.coli* por 100 mL = Muito Boa.
- 1000 coliformes totais ou 800 *E.coli* por 100mL = Satisfatória.

4.6.3.1 COMPARATIVO ENTRE OS PERÍODOS AMOSTRAIS.

Os resultados obtidos, a partir das dezoito coletas, foram classificados da seguinte forma:

- a) Antes das obras: 4 coletas, entre os meses de abril e maio de 2022, os valores médios aferidos foram:
 - Coliformes totais: Praia Mansa: 177,5, Praia Brava: 77,5 e Pico de Matinhos: 107,5 (NPM/100mL).
 - E.Coli: Praia Mansa: 37,5, Praia Brava: 30,0 e Pico de Matinhos: 55,0 (NPM/100mL).
 - Os números ficaram bem abaixo da referência contida da Resolução Conama 274, apresentando uma qualidade “Excelente” para a balneabilidade.

- b) Durante as obras: 7 coletas, entre os meses de maio e agosto de 2022, o resultado aferido das médias foi:
- Coliformes totais: Praia Mansa: 7457,1, Praia Brava: 2377,14,5 e Pico de Matinhos: 639,4 (NPM/100mL).
 - E.Coli: Praia Mansa: 70,0, Praia Brava: 115,71 e Pico de Matinhos: 77,14 (NPM/100mL).
 - Um expressivo aumento nos números. Os pontos A e B, em especial, apresentaram alguns valores bem acima dos contidos da Resolução Conama 274, neste caso, a classificação seria “Imprópria” para balneabilidade.
- c) Depois das Obras: 7 coletas, entre os meses de agosto de 2022 e maio de 2023, o resultado das médias aferido foi:
- Coliformes totais: Praia Mansa: 6718,7, Praia Brava: 1463,2 e Pico de Matinhos: 82,4 (NPM/100mL).
 - E.Coli: Praia Mansa: 23,0, Praia Brava: 52,9 e Pico de Matinhos: 11,6 (NPM/100mL).
 - Os valores para ponto A e ponto B permaneceram acima dos parâmetros da Resolução Conama 274, sendo assim, a classificação continuaria “Imprópria” para a balneabilidade, entretanto, percebe-se uma tendência de queda.

A variação nos números acompanhando o avanço das obras é observada a partir da análise dos gráficos das médias por período. As imagens do ponto B-Praia Brava, em cada fase do estudo, ilustram a intensidade das alterações que podem ter contribuído para os resultados observados.

FIGURA 10: GRAFICOS DAS MÉDIAS DOS COLIF.TOTAIS E E.COLI, AGRUPADAS POR PERÍODO (NMP/100mL)

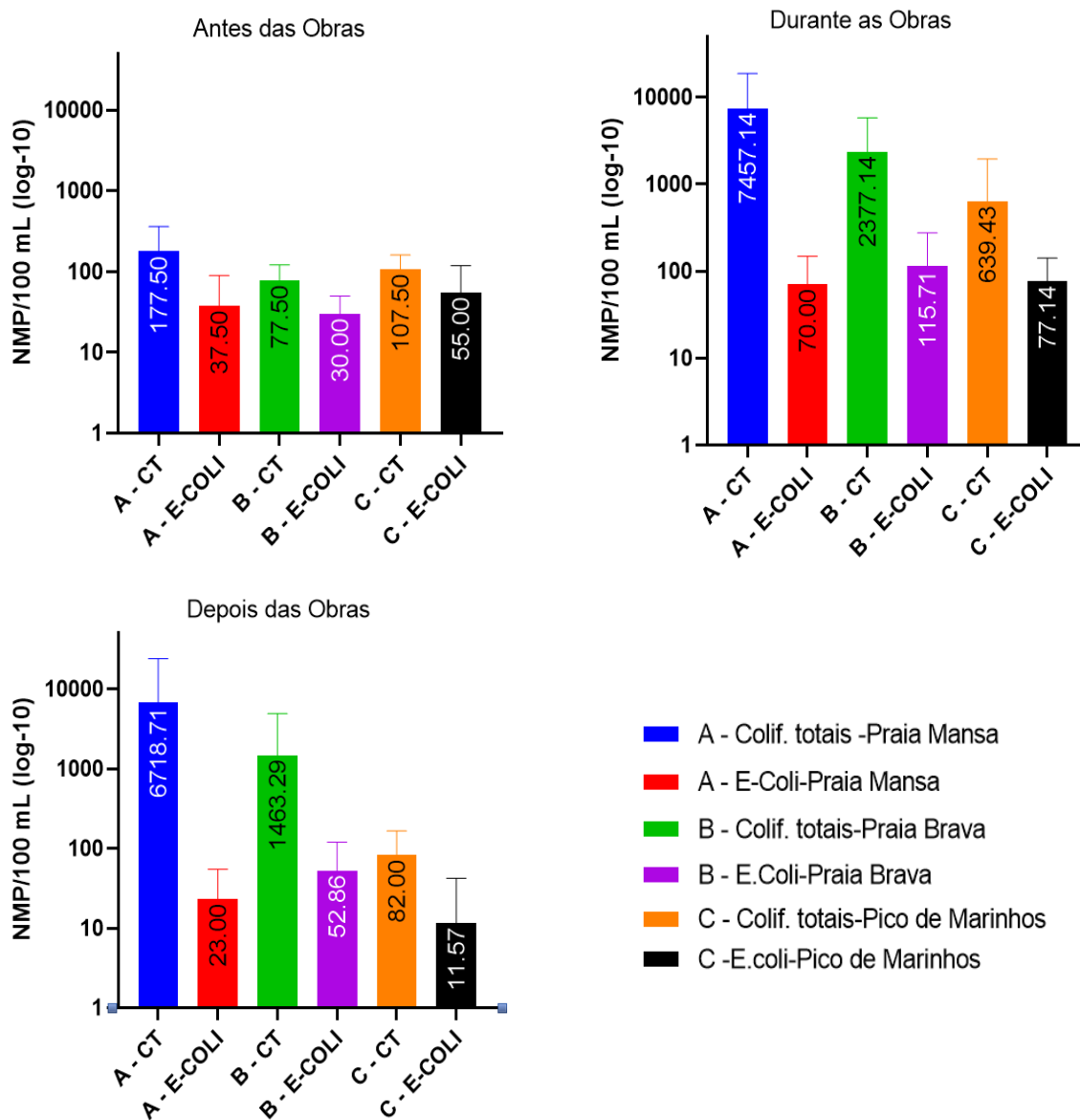


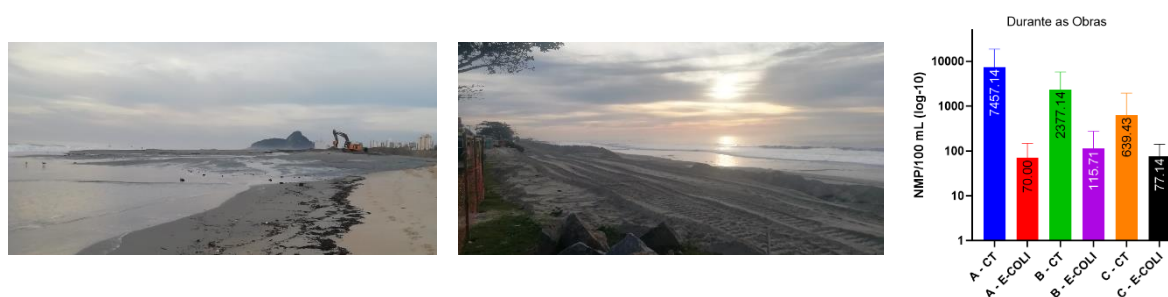
Figura 10 – Gráficos das médias para cada um dos três períodos amostrais, entre abril de 2022 e maio de 2023 (valores plotados em escala log10). Fonte: O autor, 2023. Realizado com GraphPad Prism 8.4.1 para Windows.

FIGURA 11: FASES DA OBRA NO PTO B-PRAIA BRAVA EM COMPARAÇÃO COM OS GRÁFICOS OBTIDOS (NMP/100mL)

Antes das obras: Imagens de 12 e 16 de maio de 2022



Durante as obras: Imagens de 06 de Julho de 2022



Depois das obras: Imagens de 28 de Dezembro de 2022

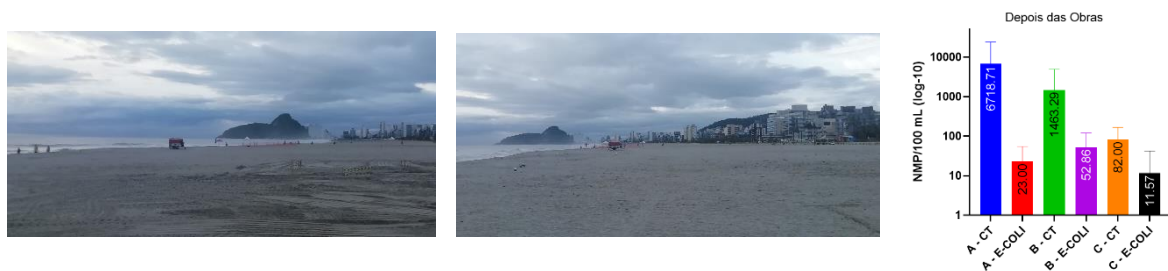


Figura 11 - Quadro as imagens do ponto B – Praia Brava em cada fase do estudo e os respectivos gráficos dos resultados obtidos. Fonte: O autor, 2022.

4.6.3.2 COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN

O coeficiente de Spearman é uma medida de correlação não paramétrica, avaliado no intervalo de valores de r entre -1 e 1. Diferente do coeficiente de Pearson, o de Spearman não exige a suposição de que a relação entre as variáveis seja linear (CONOVER, W. J, 1999).

O teste de correlação de Spearman foi realizado no software GraphPad Prism versão 8.4.1 para Windows, bem como a matriz de correlação. Os índices de correlação podem ser interpretados da seguinte forma (H. J. Motulsky, GraphPad Statistics, 2016):

$r = 1.0$ = Correlação perfeita

$r = 0$ a 1 = As duas variáveis tendem a aumentar ou diminuir em conjunto

$r = 0.0$ = As duas variáveis não estão correlacionadas

$r = -1$ a 0 = Uma variável aumenta à medida que a outra diminui

$r = -1,0$ Correlação negativa ou inversa perfeita

FIGURA 12: MATRIZ DE CORRELAÇÃO SPEARMAN r

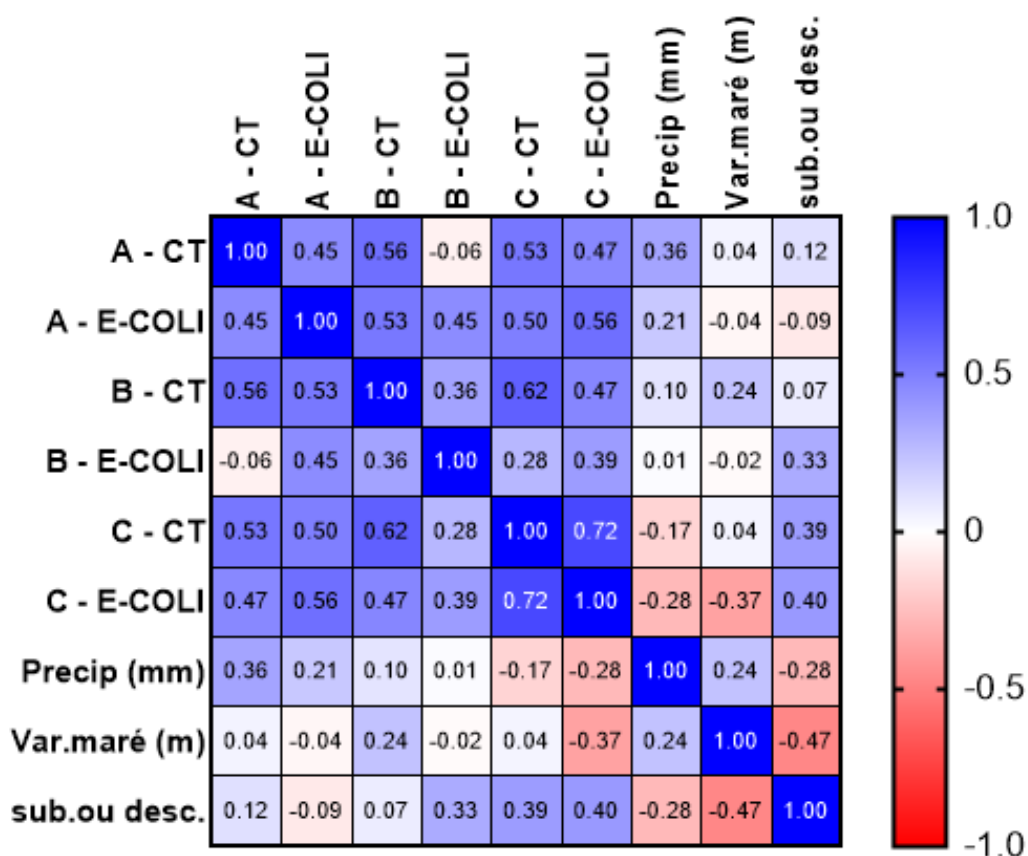


Figura 12: Matriz de Correlação Spearman. Fonte: O autor, 2023. Realizado com GraphPad Prism 8.4.1 para Windows.

Os resultados obtidos estão representados na matriz acima. Em sua maioria, os índices referentes às variáveis relacionadas aos pontos de coleta apresentaram valores para r entre 0,28 e 0,62, sugerindo correlação.

Em destaque os valores acima de 0,50, como os índices para as variáveis de coliformes totais: A e B $r = 0,56$, A e C $r = 0,53$ e B e C $r = 0,62$, apontando uma correlação entre os três pontos A, B e C. O valor de *E. coli* do ponto A, apresentou um valor de 0,56 com o ponto C e 0,53 em relação ao ponto B (colif. totais).

De acordo com os resultados, pode-se observar uma certa correlação ($r=0,40$ e $0,39$) entre a variação da maré com os índices do Ponto C – Pico de Matinhos.

4.6.3.3 APONTAMENTOS FINAIS E HIPÓTESES.

Foi observado, a partir das análises dos dados, que as alterações promovidas pelas obras podem ter impactado a dinâmica da área estudada. Os momentos mais críticos estão relacionados à execução da obra, em especial aos dias em que houve a colocação da área na Praia Brava, o que pode ter comprometido a dispersão dos poluentes, durante período estudado.

Este estudo realizou análises durante 13 meses (de abril de 2022 à maio de 2023). Considerando os valores unitários por coleta, em sua maioria, as condições de balneabilidade para os três pontos estudados ficaram dentro dos limites definidos, exceto os números aferidos nas coletas dos dias abaixo, que apresentaram uma condição imprópria para balneabilidade, segundo a Resolução CONAMA 274:

- Ponto A Praia Mansa: 26/05/2022, 08/06/2022, 15/06/2022, 03/05/2023
- Ponto B Praia Brava: 26/05/2022, 08/06/2022, 15/06/2022, 03/05/2023
- Ponto C Pico de Matinhos: 26/05/2022

A seguir estão representados os valores unitários por coleta. No conjunto de gráficos a seguir, pode-se observar:

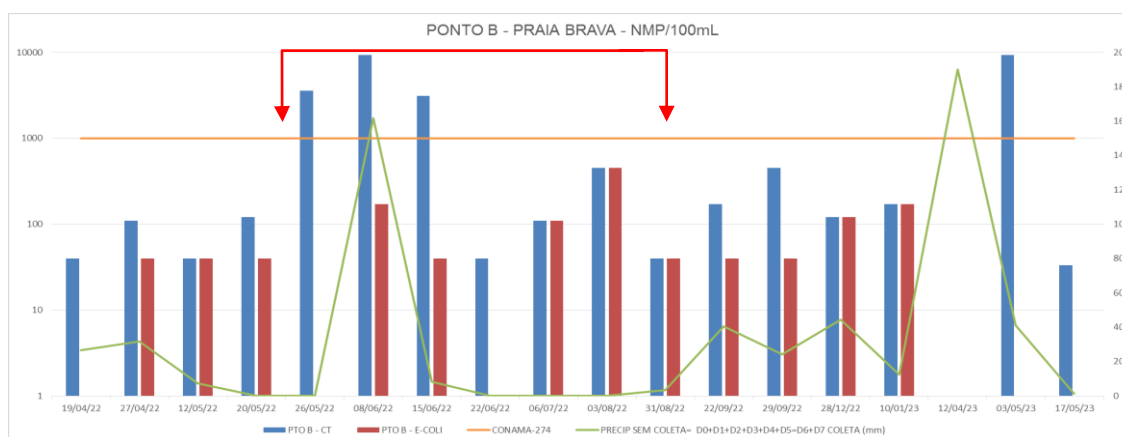
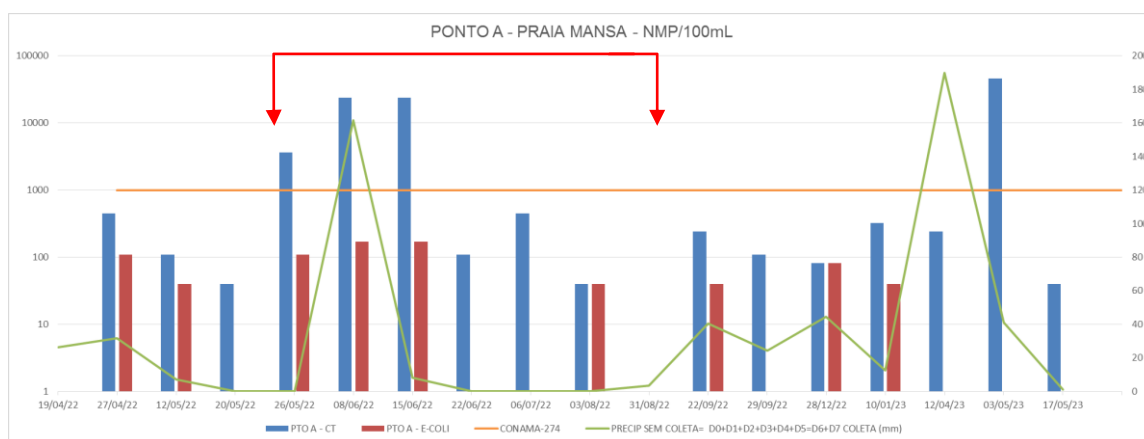
- O aumento dos números no período da obra (setas em vermelho).
- Os limites estabelecido pela Resolução CONAMA 270 (linha laranja), 1000 colif. totais /100 mL.

- A relação com os momentos em que houve um maior índice pluviométrico (linha verde).

De nove coletas que apresentaram a condição imprópria (acima de 1000 colif. totais / 100mL) sete estão no período de execução das Obras, (setas em vermelho).

No ponto B: Praia Brava, pode-se observar também, um aumento das amostras positivas para a presença de bactérias *E.coli*, durante os meses de execução da obra, com essa tendência se mantendo até as datas comemorativas de final de ano (barras vermelhas).

FIGURA 13: QUADRO DE GRAFICOS COM VALORES UNITÁRIOS POR COLETA



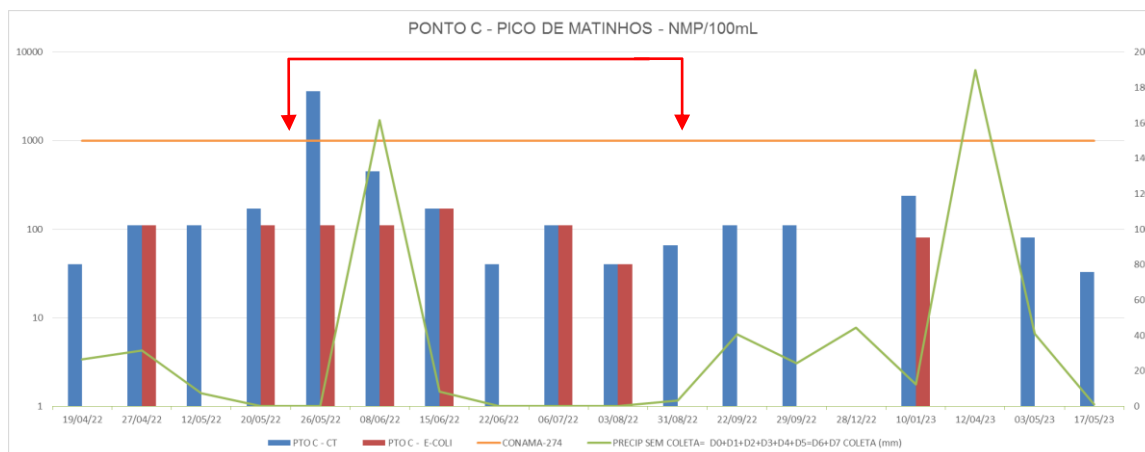


Figura 13: Gráficos dos pontos analisados e os valores unitários para cada coleta, em destaque vermelho o período das obras, em laranja os valores limites da Resolução Conama 274/2000 e em verde os índices pluviométricos. Fonte: O autor, 2023

Verificou-se também, um aumento na presença de colif. totais e *E.coli* nas amostras coletadas em dias próximos aos feriados, como em abril de 2022 (Páscoa e Dia do Trabalhador) e em dezembro e janeiro de 2023 (Virada do ano). Sugerindo uma sazonalidade, como esperado, nos períodos de aumento da população circulante.

O índice pluviométrico elevado esteve associado a alguns momentos de alta presença de colif. totais e *E.coli*, sugerindo que a drenagem urbana carrega possíveis contaminantes com o aumento das chuvas.

Os maiores valores unitários foram observados na Praia Mansa e Praia Brava. Apesar de não ter sofrido alterações, o ponto A: Praia Mansa sofre influência dos efluentes pluviais trazidos pelo canal da avenida Juscelino Kubistchek que desemboca no canto sul da praia. Avenida que, também está em obras por um período longo, com alterações no curso do canal.

O mesmo acontecendo com o ponto B: Praia Brava, que sofre a influência dos efluentes carregados pelo rio da avenida Paraná.

A *Escherichia coli* é classificada como uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete família Enterobacteriaceae. Ela habita principalmente o intestino grosso do trato de animais de sangue quente, incluindo humanos, e é frequentemente descartada no ambiente através de fezes ou efluentes de águas residuais. A presença de *E. coli* nas águas ambientais tem sido considerada há muito tempo como um indicador de recente poluição fecal e possível vetor de doenças (JANG J, et al., 2017).

Os dados aqui demonstrados apontam que a presença e a quantidade de coliformes totais e *E.coli*, nas três áreas estudadas, aumentaram nos períodos durante

e depois da obra, inclusive, a incidência dos momentos de condição imprópria para balneabilidade. Além da obra, o aumento na concentração da população circulante em datas festivas e os altos índices pluviométricos, são fatores que podem atuar de forma cumulativa nos índices de poluição ambiental, no possíveis impactos e degradação ambiental resultantes.

A Matriz de coeficiente Spearman apontou a correlação entre os três pontos estudados, sugerindo que os impactos sofridos e suas consequências podem ser compartilhados entre as Praias Mansa, Brava e o Pico de Matinhos.

A contaminação por esgotos de origem antrópica pode afetar a saúde ambiental, a saúde pública e também de espécies que vivem na área estudada. Como, por exemplo, as tartaruga-verdes (*Chelonia mydas*), que são consideradas sentinelas ambientais por estarem expostas a diferentes tipos de ameaças e podem sinalizar a magnitude dos impactos sofridos pelos ecossistemas ao longo do tempo.

Em estudos realizados pelo LEC/UFPR, a partir do projeto de monitoramento de praias (PMP-BS), na região costeira do Paraná, foram identificadas tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) com inflamações granulomatosas associadas a infecção por fungos e bactérias. (Domiciano, I.G., et al., 2022), (Domiciano, I. G.; Domit, C., et al., 2017).

Os dados apresentados aqui, associados aos referidos estudos do LEC/UFPR, podem indicar uma piora na qualidade ambiental relacionada ao aumento da contaminação por efluentes de origem antrópica na área estudada.

As hipóteses presentes neste trabalho sugerem a necessidade de se promover outros estudos e análises (microbiológicas) ambientais, por períodos mais longos, outros número de coletas, etc. Tais estudos podem ser o ponto de partida para a definição de planos de biomonitoramento, inclusive explorando abordagens modernas que apresentem maior capacidade na geração de dados e engajamento da população local.

5 DNA AMBIENTAL – EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE INTERESSE DE UMA AMOSTRA PILOTO

Em paralelo ao estudo microbiológico da água, foi desenvolvido um ensaio piloto para a extração de moléculas de eDNA (DNA ambiental) de uma amostra de

água marinha, seguido de amplificação por reação PCR de genes de interesse como 16S rRNA, ITS e COI.

As atividades biológicas realizadas pelos organismos deixam vestígios de DNA no ambiente. Essas partículas permanecem em amostras de solo, água ou ar, o chamado DNA Ambiental (Environmental DNA – eDNA).

As técnicas de análises de eDNA permitem um avanço em relação às técnicas clássicas de monitoramento de espécies, possibilitando o acesso a microrganismos e organismos que são difíceis de amostrar ou identificar morfológicamente em campo, mas que exercem funções essenciais na estrutura dos ecossistemas.

As estratégias de sequenciamento baseadas em genes de interesse como os genes ITS, COI e 16S rRNA, podem ser usadas para documentar a biodiversidade inexplorada, características ecológicas de comunidades microbianas no ambiente ou nos seres vivos. Aliadas ao desenvolvimento de ferramentas de bioinformática que possibilitam explorar os metadados, tornou-se possível relacionar centenas de amostras e identificar padrões biológicos claros (CAPORASO, et al. 2011; HINLO, R 2017 et al.).

5.1 METODOLOGIA

As mesmas amostras de água marinha que eram utilizadas para realizar o estudo microbiológico, foram utilizadas para a filtragem e posterior extração de eDNA. Ao todo, foram coletadas 9 amostras de cada um dos três pontos já descritos no mesmo período do estudo da qualidade da água. Ao todo são 21 filtros.

Para este ensaio experimental, o ponto da amostra escolhida foi o Ponto C: Pico de Matinhos, coletada no dia 28 de dezembro de 2022.

Após a filtragem, foi realizado o procedimento de extração de moléculas de eDNA e posterior reação de PCR para amplificação dos genes de interesse. Para a confirmação da amplificação dos genes de interesse foi realizado uma reação de eletroforese com gel agarose 1%.

Para a extração do material genético (eDNA) da água, foi utilizado:

- Para a filtragem da água: Seringas plásticas, filtros e holders da Sartorius Stedim. Os filtros de acetado de celulose com porosidade de 0,2 µm e os holders de 13mm, com o anel de vedação. Todo o conjunto

esterilizado em autoclave. Em média os volumes filtrados foram 300 mL de amostras de água do mar. Após isso, os filtros foram armazenados em freezer para posterior extração.

- Extração da Moléculas de eDNA: Foi utilizado o Kit de extração Qiagen DNeasy® PowerWater® (50). O controle negativo foi produzido a partir de um outro filtro de acetado de celulose com as mesmas dimensões e porosidade, esterilizado em autoclave.

FIGURA 14: PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE EDNA – AMOSTRA PILOTO



Figura 14: Processo de extração de eDNA, amostra do ponto C Pico de Matinhos.

5.2 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE POR REAÇÃO DE PCR E ANÁLISE POR ELETROFORESE.

A reação PCR (reação em cadeia da enzima DNA polimerase) é uma técnica enzimática *in vitro*, cujo resultado consiste em múltiplas cópias de uma sequência específica de DNA, pré-selecionada. Essa amplificação utiliza primers sintéticos, desenhados previamente, de acordo com a região alvo, e se ligam às sequências de interesse pela ação da enzima DNA polimerase (KOCHER; WILSON, 1991).

A análise de DNA por eletroforese é uma técnica consolidada e amplamente utilizada. O fato da molécula de DNA ter carga negativa em valores alcalinos ou pH neutro e quando aplicada em uma matriz de gel (agarose), permite deslocamento do polo negativo em direção ao polo positivo, pela ação do campo elétrico na cuba de eletroforese. O tamanho da molécula define a velocidade de migração. Desta forma,

moléculas com tamanhos distintos ocupam diferentes pontos do gel. (NAOUM C, P, et al. 2010)

Os protocolos de reação PCR foram extraídos do EMP (Earth Microbiome Project), foram realizadas duas reações, como segue:

1ª Reação PCR:

Para os genes rRNA 16s (Bactérias e Archea):

- Primer: 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA).
- Primer: 806R (GGAACNAGGGTGTCTAAT).
- Região V4 como alvo (CAPORASO, et al, 2011).
- Mix 46.5 µL vol. = [H₂O + Tampão Buffer 10x ThermoFisher® + MgCl₂ (3mM) + DNTP's (0,2mM) mM] + 1,0 µL Amostra DNA molde (1mM) + 1,0 µL Primer F (10pmol) + 1,0 µL Primer R (10pmol) + 0,5 µL Taq Polimerase (1unidade). Volume total da reação 50 µL.
- Tamanho esperado ~300 a ~350 pares de bases.

Para os genes ITS (Fungos):

- Primer: ITS1f (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA)
- Primer:ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (EMP.ITSkabir 2019).
 - Mix 46.5 µL vol. = [H₂O + Tampão Buffer 10x ThermoFisher® + MgCl₂ (3mM) + DNTP's (0,2mM) mM] + 1,0 µL Amostra DNA molde (1mM) + 1,0 µL Primer F (10pmol) + 1,0 µL Primer R (10pmol) + 0,5 µL Taq Polimerase (1unidade). Volume total da reação 50 µL.
 - Tamanho esperado ~ 250 a 600 pares de bases.

Para os genes COI (invertebrados):

- Primer: LCO 1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) (FOLMER O, et al.1994).
- Primer: HCO2198 (TTAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA)
- Mix 48,5 µL vol. = [H₂O + Tampão Buffer 10x ThermoFisher® + MgCl₂ (2,5mM) + DNTP's (0,2mM) mM] + 1,0 µL Amostra DNA molde (1mM) + 1,0 µL Primer F (10pmol) + 1,0 µL Primer R (10pmol) + 0,5 µL Taq Polimerase (1unidade). Volume total da reação 51.5 µL.

- Tamanho esperado ~ 700 a 750 pares de bases.

As três reações foram realizadas com o seguinte programa para o termociclador: 94°C - 3', 94°C - 45", 50°C - 60", 72°C - 90" e 72°C - 10'.

Os controles negativos oriundos das amostras extraídas dos filtros intactos esterilizados, também foram submetidos à reação de PCR.

Os produtos da reação PCR (amostras e controles) foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE (2 µL tampão + 5 µL de amostra.)

Conforme análise do gel representado na Figura 15 (abaixo), pode-se observar que, tanto o gene 16s na linha 1 e o gene COI na linha 3, não atingiram tamanho esperado.

Entretanto, fica claro pela banda na linha 2 que o gene ITS, ficou dentro do tamanho esperado ~500 pb.

FIGURA 15: PERFIL ELETROFORÉTICO DA PRIMEIRA REAÇÃO PCR

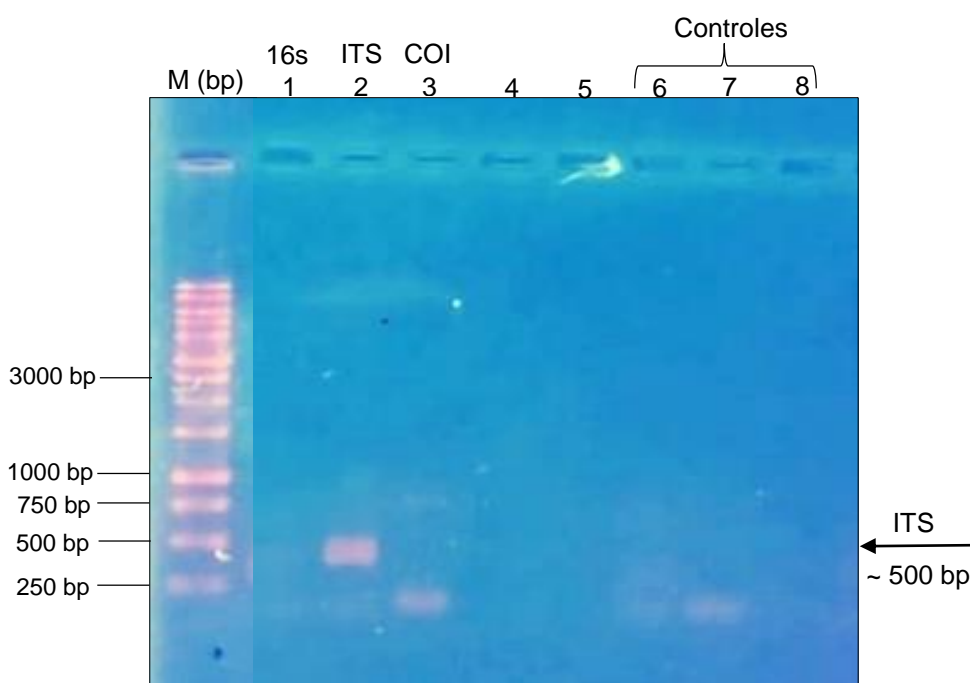


Figura 15: Perfil eletroforético (gel Agarose 1%) da primeira reação PCR: marcadores de peso molecular indicado como M em bp (pares de base), somente o gene número 2 ITS atingiu o tamanho esperado, 500 pares de base. Fonte: O autor, 2023

Para a segunda tentativa de amplificação por PCR, somente os genes 16s e COI foram utilizados. Desta vez, o volume das amostras de DNA molde em cada reação PCR foi incrementado de 1.0 μL (10pmol) para 4.0 μL (10pmol), seguindo o mesmo procedimento para os controles negativos:

2ª Reação:

Para os genes rRNA 16s (Bactérias e Archea):

- Primer: 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA).
- Primer: 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT).
- Região V4 como alvo (CAPORASO, et al, 2011).
- Mix 46.5 μL vol. = [H₂O + Tampão Buffer 10x ThermoFisher® + MgCl₂ (3mM) + DNTP's (0,2mM) mM] + 4,0 μL Amostra DNA molde (1mM) + 1,0 μL Primer F (10pmol) + 1,0 μL Primer R (10pmol) + 0,5 μL Taq Polimerase (1unidade). Volume total da reação 53 μL .
- Tamanho esperado ~300 a ~350 pares de bases.

Para os genes COI (invertebrados):

- Primer: LCO 1490 (GGTCAACAATCATAAAGATATTGG) (FOLMER O, et al.1994).
- Primer: HCO2198 (TTAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA)
- Mix 48,5 μL vol. = [H₂O + Tampão Buffer 10x ThermoFisher® + MgCl₂ (2,5mM) + DNTP's (0,2mM) mM] + 4,0 μL Amostra DNA molde (1mM) + 1,0 μL Primer F (10pmol) + 1,0 μL Primer R (10pmol) + 0,5 μL Taq Polimerase (1unidade). Volume total da reação 54.5 μL .
- Tamanho esperado ~ 700 a 750 pares de bases.

As duas reações foram realizadas com mesmo programa para o termociclador: 94°C - 3', 94°C – 45", 50°C – 60", 72°C – 90" e 72°C – 10'.

Os controles negativos oriundos das amostras extraídas dos filtros intactos esterilizados, também foram submetidos à reação de PCR novamente.

Os produtos da amplificação (amostras e controles) foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE (2 μL tampão + 5 μL de amostra.), desta vez o gene 16s foi aplicado em dois poços.

Conforme análise do gel representado na Figura 15 (abaixo), pode-se observar que, tanto o gene 16s na linha 1 e o gene COI na linha 3, não atingiram tamanho esperado.

Entretanto, fica claro pela banda na linha 2 que o gene ITS, ficou dentro do tamanho esperado.

Os produtos da reação PCR (amostras e controles) foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE (2 μ L tampão + 5 μ L de amostra.).

Conforme análise do gel representado na Figura 16 (abaixo), pode-se observar que desta vez, o gene 16s, representado pelas bandas nas linhas 6 e 7, atingiu o tamanho esperado entre ~300 e ~350 pb.

O gene COI, representado pela banda na linha 5, também atingiu o tamanho esperado ~750 pb.

FIGURA 16: PERFIL ELETROFORÉTICO DA SEGUNDA REAÇÃO PCR

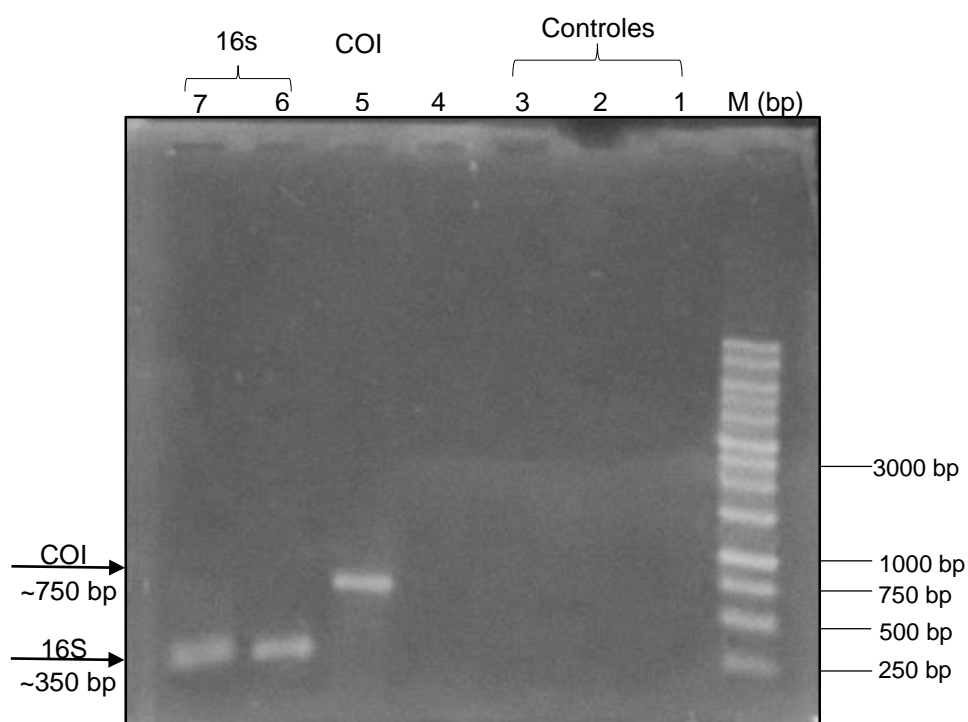


Figura 16: Perfil eletroforético (gel Agarose 1%) da segunda reação PCR: marcadores de peso molecular indicado como M em bp (pares de base), os genes, 16s com ~350 pares de e COI com ~750 pares de base, atingiram o

A partir da análise das técnicas de eletroforese realizadas com os produtos das duas ampliações por PCR, pode se concluir que o experimento de extração de

molécula de eDNA e amplificação de genes de interesse de uma amostra piloto foi bem sucedido e atingiu o seu objetivo.

As próximas etapas seriam o sequenciamento dos amplicons e posterior análise dos dados com ferramentas de bioinformática, como o software livre Quiime2, entre outros.

6 AÇÕES EXPERIMENTAIS DE CIÊNCIA CIDADÃ E MONITORAMENTO PARTICIPATIVO.

O exercício do monitoramento participativo da biodiversidade e dos recursos naturais é fundamental para as ações de conservação da natureza e para o processo de empoderamento das comunidades locais em diferentes escalas e dimensões (CONSTANTINO, P et al. 2012).

A ciência cidadã, promovendo o envolvimento de voluntários em seus processos de investigação, incrementou o número de estudos de campo.

Em grande escala, levou a novas abordagens quantitativas para questões emergentes, como estudar os efeitos de perda e fragmentação de habitats na biodiversidade, em escala paisagística, com ampla amostragem geográfica de espécies, variações dos ciclos vitais, status migratório, etc. (DICKINSON, J, 2010)

No âmbito deste trabalho, foram realizadas duas oficinas, com a temática análises ambientais e microbiologia, com a participação dos estudantes da Escola Indígena Guavira Poty, localizada na Aldeia Guaviraty, no balneário Shangrilá, em Pontal do Paraná-PR.

A primeira oficina ocorreu em outubro de 2022, a partir do contato da professora de ciências Nahyr Carneiro da Silva, para a colaboração em um projeto de estudo da qualidade microbiológica da água na Aldeia Guaviraty, a ser apresentado pelos alunos na XI Feira Regional de Ciências do Litoral do Paraná cidade de Matinhos-PR, promovida pelo LabMóvel do setor litoral da UFPR.

A segunda oficina ocorreu em junho de 2023, a partir do contato da atual professora de ciências Patricia Faustino Slompo, para uma segunda edição do projeto a ser apresentado pelos alunos na 75ª Reunião Anual da SBPC (Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência) que ocorreu em julho de 2023 na UFPR em Curitiba.

As oficinas foram divididas em três módulos:

- Um encontro em sala de aula abordando os temas, biodiversidade, ecossistemas, análises ambientais, ciência cidadã e monitoramento participativo.
- Coleta de amostras de água em três pontos na Aldeia Guaviraty.
- Participação dos alunos, em parte dos processos, nas análises laboratoriais conduzidas no Laboratório de Microbiologia Molecular da UFPR Litoral.

A ação colaborativa contou com a participação dos estudantes Danilo, Elenilson, Jussara, Paulina e Priscila, das professoras Nahyr e Patricia, da técnica de laboratório da UFPR Litoral Vera Chicora, além do autor.

O projeto elaborado a partir da primeira oficina ficou entre os premiados da XI Feira Regional de Ciências do Litoral do Paraná e o da segunda foi selecionado para a exposição no pavilhão da 75ª Reunião Anual da SBPC.

O depoimento das professoras, acerca dos resultados de todo processo, junto aos alunos, foi muito positivo. O envolvimento e o entusiasmo das turmas por conduzir os experimentos em sua Terra e por participarem dos processos no laboratório foi observado. Além dos referidos projetos, outros trabalhos produzidos pelos estudantes da escola Indígena Guavira Poty foram apresentados em diferentes feiras de ciências até em outros estados.

A comunidade apoia de forma intensa a presença dos alunos nos projetos e nas feiras de ciências. A participação ativa na produção de dados científicos, eventos acadêmicos e no entendimento das condições ambientais de sua comunidade, podem contribuir para o fortalecimento do protagonismo na luta pelo reconhecimento, demarcação e conservação das terras indígenas e também na formação intelectual dos próprios estudantes.

FIGURA 17: QUADRO COM REGISTROS DAS DUAS OFICINAS REALIZADAS



Figura 17: Registos das oficinas de análises ambientais e microbiologia, com a participação dos estudantes da Escola Indígena Guavira Poty, localizada na Aldeia Guaviraty, no balneário Shangrilá, em Pontal do Paraná-PR.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da qualidade microbiológica da água, das praias do Balneário de Caiobá, presente neste trabalho, apontou uma variação importante na presença de coliformes totais e *E.coli* no período analisado, associada às alterações executadas na orla de Matinhos e às outras pressões antrópicas, principalmente no ponto B-Praia Brava. Outros estudos, como os realizados pelo LEC/UFPR, a partir do projeto de monitoramento de praias (PMP-BS), apontam indícios de diminuição de qualidade e saúde ambientais, que podem estar associadas à contaminação de origem antrópica.

Desta forma, reforça-se a justificativa para novas pesquisas sobre o microbioma costeiro paranaense, bem como, o desenvolvimento de planos de biomonitoramento, principalmente frente às intensas pressões antrópicas sobre as áreas de preservação.

O avanço das novas tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), aplicadas às técnicas de biomonitoramento ambiental, pode ser um caminho viável na viabilização de pesquisas com essa temática.

Uma grande quantidade de dados metagenômicos podem ser extraídos e analisados em campo, como neste exemplo, em que ACHARYA, K. et al. (2020) em realizou um profundo estudo de qualidade microbiológica da água, a partir da análise do gene 16s rRNA, com a tecnologia de sequenciamento Oxford NanoPore em um laboratório metagenômico portátil de baixo custo e altíssima capacidade (ACHARYA, K. et al. 2020).

FIGURA 18: QUADRO COM REGISTROS DAS DUAS OFICINAS REALIZADAS

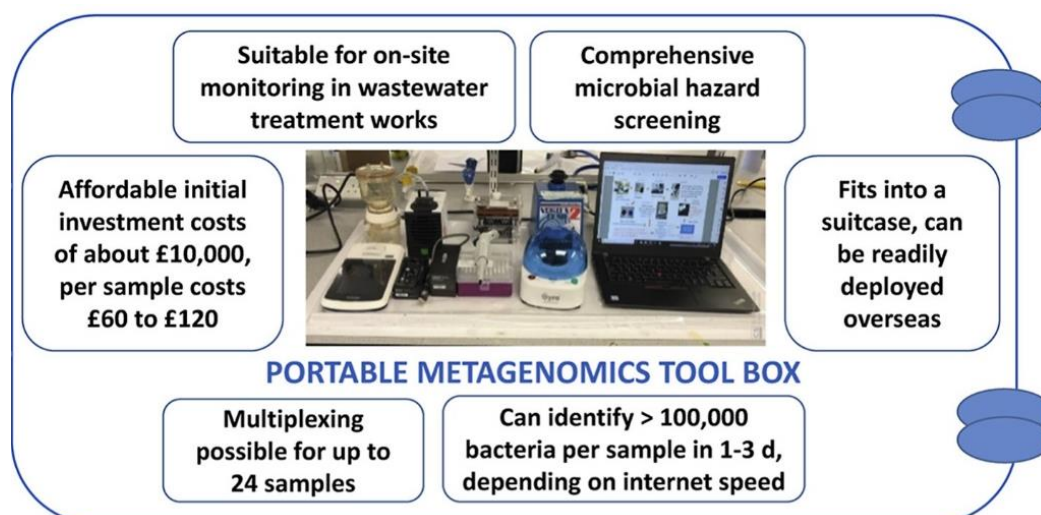


Figura 18: Laboratório Metagenômico portátil, adaptada pelo autor (2023) de *Metagenomic water quality monitoring with a portable laboratory* ACHARYA, K et al. (2020):

Por fim, as experiências vivenciadas pelo autor nas oficinas realizadas com os estudantes da aldeia Guaviraty, indicaram que promover o envolvimento da comunidade, principalmente das crianças e jovens, no exercício de fazer ciência, inclusive em parte dos processos dentro do laboratório, de forma planejada e controlada, é perfeitamente possível e apresenta resultados significativos para todos os envolvidos.

8 REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, C. M. S. et al., 2023 Dimensões do desenvolvimento territorial sustentável na análise da cidade turística de Matinhos, costa sul do Brasil – a construção histórica do território vista desde o processo de regulamentação do uso e ocupação do solo. Publicado na revista *Desenvolvimento e Meio Ambiente* –UFPR edição de jul./dez.doi:10.5380/dma.v62i0.82969. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/made/article/view/82969/50569>. Acesso em 29 de outubro 2023.

ACHARYA, K., Adrian Blackburn, Jemila Mohammed, Alemseged Tamiru Haile, Andualem Mekonnen Hiruy, David Werner, 2020 - Metagenomic water quality monitoring with a portable laboratory, *Water Research*,2020, Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135420306497>, Acesso em 29 de outubro 2023.

ADELINO JRP, Heringer G, Diagne C, Courchamp F, Faria LDB, Zenni RD (2021) Te economic costs of biological invasions in Brazil: a frst assessment. In: Zenni RD, McDermott S, García-Berthou E, Essl F (Eds) Te economic costs of biological invasions around the world. *NeoBiota* 67: 349–374. Disponível em: <https://doi.org/10.3897/neobiota.67.59185>. Acesso em: 29 de outubro 2023.

APHA; AWWA; WEF. Quality assurance/quality control. In: *Standard methods for the examination of water and wastewater: online*. Washington, DC, (2017). Part 9020. Approved by Standard Methods Committee, 2015. Disponível em: <<https://www.standardmethods.org/doi/10.2105/SMWW.2882.180> >. Acesso em: 10 de agosto de 2022.

BAPTISTA, Darcilio. (2008). Uso de macroinvertebrados em procedimentos de biomonitoramento em ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, ISSN 1981-9366, Vol. 12, Nº. 3, 2008 (Ejemplar dedicado a: Monitoramento biológico em ecossistemas aquáticos continentais). Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/40836291_Uso_de_macroinvertebrados_e_m_procedimentos_de_biomonitoramento_em_ecossistemas_aquaticos. Acesso em: 13 de agosto de 2023.

BIGARELLA, João J.- (2001) - Contribuição ao Estudo da Planície Litorânea do Estado do Paraná. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/babt/a/dCHQScdfTNPtx3Hk5Fhrhv/>; Acesso em: 05 de agosto de 2023.

BONETT, D.G., Wright, T.A. Sample size requirements for estimating pearson, kendall and spearman correlations. *Psychometrika* 65, 23–28 (2000). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02294183>. /; Acesso em: 05 de agosto de 2023

BUSS, D. F., (2001). Utilizando Macroinvertebrados no Desenvolvimento de um Procedimento Integrado de Avaliação da Qualidade da Água de Rios. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/download/5735/4321>. Acesso em: 10 de agosto de 2022.

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. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20534432/>. Acesso: 25 de outubro de 2023.

CASALE, P. & Tucker, A.D. 2017. *Caretta caretta* (amended version of 2015 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T3897A119333622. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T3897A119333622.en>. Acesso: 25 de Dezembro 2023.

CAVALLINI, N. G., Reis, R. A., & Tiepolo, L. M. (2020). O silencioso grito químico: Riscos e ameaças no rio guaraguaçu sob a perspectiva ecossistêmica, 6(9) 66540–66553. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n9-187>. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/16345>. Acesso em: 10 de agosto de 2022.

CETESB; ANA. (2011) Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília, DF: ANA. 325p. Disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>. Acesso em: 10 de ago. 2022.

CETESB, Norma Técnica L5.202 - coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* - Determinação pela técnica de tubos múltiplos 5ª Edição, São Paulo - Janeiro 2018. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2018/01/Para-enviar-ao-PCSM_-NTC-L5.202_5%C2%AAed-_dez.-2018.pdf. Acesso em: 10 de agosto de 2022.

CONOVER, W. J. *Practical Nonparametric Statistics* / W.J. Conover. Third edition. New York; Wiley, 1999. Disponível em: https://discovered.ed.ac.uk/discovery/fulldisplay?vid=44UOE_INST:44UOE_VU2&mo de=advanced&tab=Everything&docid=alma998838113502466&query=creator,exact,

Holtzman,%20Wayne%20H.%20(Wayne%20Harold),AND&context=L&lang=en.
Acesso em: 10 de agosto de 2023.

CONSTANTINO, P & Buening, Jan & Silvius, Kirsten & Danielsen, Finn & Poulsen, Michael & Arroyo, Paulina & Cruz, Ana & Ribeiro, Katia & Hvalkof, Soren & Durigan, Carlos & Tófoli, Cristina & Kinouchi, Marcelo & Leão, Adriana & Estupinan, Guillermo & Tawada, Rodrigo & Fonseca, Clara. (2016). Monitoramento Participativo da Biodiversidade e dos Recursos Naturais: Seminário Internacional e Formação da Rede Internacional de Monitoramento e Manejo Participativo. Biodiversidade Brasileira. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/298084902_Monitoramento_Participativo_da_Biodiversidade_e_dos_Recursos_Naturais_Seminario_Internacional_e_Formacao_da_Rede_Internacional_de_Monitoramento_e_Manejo_Participativo/citation/download. Acesso em: 10 de agosto de 2023

DICKINSON, J & Zuckerberg, Benjamin & Bonter, David. Citizen Science as an Ecological Research Tool: Challenges and Benefits. Annual Review of Ecology and Systematics(2010). Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/230996062_Citizen_Science_as_an_Ecological_Research_Tool_Challenges_and_Benefits. Acesso em: 11 de agosto de 2023

DOMICIANO, I.G., da Silva Gagliotti, G.F.P., Domit, C. et al. Bacterial and fungal pathogens in granulomatous lesions of Chelonia mydas in a significant foraging ground off southern Brazil. Vet Res Commun 46, 859–870 (2022). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09911-w>. Acesso em: 11 de agosto de 2023

DOMIT Camila, Belleghem Tara V., Da Silva, Angela Zaccaron, De Moura Stephane P.G. Capítulo 1 - Biodiversidade Marinha - Olhares sobre a biodiversidade marinha do Paraná / Organização: Robin Hilbert Loose - Pontal do Paraná, PR: Associação MarBrasil, 2019 – Disponível em: <https://www.lecufpr.net/file-share/4423939a-b6eb-412a-b721-dd27d93f8f67>, Acesso em: 03 de julho de 2022

ESTADES, N. P. O Litoral do Paraná: entre a riqueza natural e a pobreza social. Desenvolvimento e Meio Ambiente, n. 8, p. 25-42, 2003. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/made/article/view/22047>. Acesso em: 08 de julho de 2023

FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM) – Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>. Acesso em: 10 de agosto de 2022.

FERNANDES, L et al. Artigo: Avaliação das principais metodologias aplicadas às análises microbiológicas de água para consumo humano voltadas para a detecção de coliformes totais e termotolerantes Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente 6(2): 49-64, jul-dez, 2015. Disponível em:

<https://revista.faema.edu.br/index.php/Revista-FAEMA/article/view/339>. Acesso em: 05 de agosto de 2023

FIREHOCK, Karen, and Jay West. "A Brief History of Volunteer Biological Water Monitoring Using Macroinvertebrates." *Journal of the North American Benthological Society*, vol. 14, no. 1, 1995, pp. 197–202. JSTOR, Disponível em: <https://doi.org/10.2307/1467734>. Acesso em 31 de outubro 2023.

FOLMER O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7881515/>. Acesso em: 07 de novembro 2023

FUNASA-BRASIL- Fundação Nacional de Saúde. Manual prático de análise da água da FUNASA 2013. Disponível em: http://www.funasa.gov.br/site/wpcontent/files_mf/manual_pratico_de_analise_de_agua_2.pdf. Acesso em: 09 agosto 2022.

HINLO, R., Gleeson D, Lintermans M, Furlan E Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples, 2017 Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251>, Acesso em: 08 de Julho de 2023

IPCC, 2019: Summary for Policymakers. In: IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, V. Masson-Delmotte, P. Zhai, M. Tignor, E. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegria, M. Nicolai, A. Okem, J. Petzold, B. Rama, N.M. Weyer (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, pp. 3–35. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/9781009157964.001>, Acesso em: 08 de Julho de 2023.

IPCC, 2023: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 1-34, Disponível em: <https://www.ipcc.ch/report/sixth-assessment-report-cycle/>, Acesso em: 24 de junho de 2023.

INSTITUTO DAS ÁGUAS DO PARANÁ (ÁGUAS PARANÁ). Plano da Bacia Hidrográfica Litorânea. Curitiba, 2019. Disponível em: <https://www.iat.pr.gov.br/Pagina/Comite-da-Bacia-Litoranea>. Acesso em: 24 de abril de 2021.

JANG J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol.* 2017 Sep;123(3):570-581. doi: 10.1111/jam.13468. Epub 2017 Jul 3. PMID:

28383815. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28383815/>. Acesso: 15 de outubro de 2023.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In BROWN, T. A., *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=tGLwAAAAMAAJ&source=gbs_ViewAPI&redir_esc=y. Acesso em: 05 de outubro de 2023.

LEAL, VALÉRIA LOUZADA, Org. e Outros. *Protocolos e técnicas laboratoriais de rotina: aplicações em biologia molecular, microbiologia, cultivo celular e farmacognosia /Organização de Valéria Louzada Leal, Betina Brixner, Lia Gonçalves Possuelo, Chana de Medeiros da Silva e Jane Dagmar Pollo Renner. Prefácio de Arnaldo Zaha e Andreia Valim. Ilustração de Letícia Clauhs - São Paulo: Tiki Books; Santa Cruz do Sul: UNISC, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/337260675_Protocolos_e_tecnicas_laboratoriais_de_rotina_aplicacoes_em_biologia_molecular_microbiologia_cultivo_celular_e_farmacognosia. Acesso em: 26 de abril de 2022.*

LOPES, CARLA MARTINS, 2020. Projeto de pós-doutorado: Dna Ambiental aplicado a estudos de monitoramento e conservação de anfíbios anuros na mata atlântica Supervisor: Dr. Célio Fernando Baptista Haddad. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus Rio Claro. Disponível em: https://www.iat.pr.gov.br/sites/agua-terra/arquivos_restritos/files/documento/2020-11/projet_52_18_cmlopes.pdf. Acesso em: 10 de agosto de 2022.

MARQUEZI MC. Comparação metodológica para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água. 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-21102010160234/en.php>> Acesso em: 09 agosto de 2022.

MOTULSKY, H. J. 2016, *GraphPad Statistics Guide*. Disponível em: <http://www.graphpad.com/guides/prism/10/statistics/index.htm?statwhentoplotsdvssem.htm>. Acesso em: 26 agosto de 2023

NAOUM, P. C.; *Eletroforeses*. São José do Rio Preto, 2010. Disponível em: https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/livros/aceso_gratuito/Livro_completo%20-%20Eletroforese.pdf. Acesso em: agosto de 2021.

Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (Portaria de Potabilidade). Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis>

https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html. Acesso em: 10 de agosto de 2022

Portaria MMA 126/2004, as Áreas Prioritárias para a Biodiversidade Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2004/p_mma_126_2004_areasprioritariasparabiodiversidade.pdf. Acesso em: 12 de agosto de 2022.

Resolução CONAMA nº 274, de 2000. Disponível em: http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/Resolu%C3%A7%C3%A3o_Conama_274_Balneariedade.pdf. Acesso em: 10 de agosto de 2022

Resolução CONAMA nº 357, de 2005. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcdaltrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf. Acesso em: 10 de agosto de 2022

SERMINOFF, J.A. (Southwest Fisheries Science Center, U.S.). 2023. *Chelonia mydas* (amended version of 2004 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2023: e.T4615A247654386. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T4615A247654386.en>. Acesso em 25 de dezembro de 2023.

ONOFRE, Erica & Quadros, Juliana & Azevedo, Natália. (2022). A ausência de análise de impactos cumulativos no licenciamento ambiental do Complexo Industrial Portuário, Pontal do Paraná, litoral sul do Brasil. *Sustainability in Debate*. Doi: 13. 138-172.10.18472/SustDeb.v13n3.2022.44007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/366686677_A_ausencia_de_analise_de_impactos_cumulativos_no_licenciamento_ambiental_do_Complexo_Industrial_Portuario_Pontal_do_Parana_litoral_sul_do_Brasil. Acesso em: 26 de abril 2023.

WATANABE, M. D. B.; ORTEGA, E. Ecosystem services and biogeochemical cycles on a global scale: valuation of water, carbon and nitrogen processes. *Environmental Science & Policy*, v. 14, n. 6, p. 594-604, Oct. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S146290111100089X>. Acesso em: 26 de abril 2023.

YAMAGUCHI UM, et al. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em instituição de ensino de Maringá-PR. *Revista: O mundo da saúde*, São Paulo, v. 37, n.3,p.312-320, 2013. Disponível em: http://saocamilosp.br/pdf/mundo_saude/106/1827.pdf Acesso em: 09 agosto de 2022

TIEPOLO, L. M. A inquietude da mata atlântica: reflexões sobre a política do abandono em uma terra cobijada. *Guaju, Matinhos*, v. 1, n. 2, p. 96-109, 2015. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/guaju/article/view/45057>. Acesso em 14 de abril de 2023.