EVALUACIÓN BACTERIANA DE ENTEROCOCOS Y *VIBRIO* SPP. EN BALNEARIOS DE PUERTO RICO Y EL RIESGO DE EXPOSICIÓN A LA SALUD Y SEGURIDAD OCUPACIONAL

Jessenia Morales-Hernández, BS, MSEM[1], Karlo Malavé-Llamas, Ph.D.[1,2], Christian Vélez-Gerena, BS, MSEM[3] & Carlos Morales-Agrinzoni, BS, MSEM[1]

Recibido 15 de julio de 2020 | Aceptado 28 de octubre de 2020

Resumen. *Vibrio* spp. están relacionadas con los casos más comunes reportados de gastroenteritis, causadas por exposición a heces fecales contaminadas. La literatura documenta que los balnearios pueden ser una fuente para la exposición a *Vibrio* spp. debido a descargas de aguas sanitarias que llegan hasta la costa. El objetivo principal del estudio fue evaluar presencia de bacterias entéricas y *Vibrio* spp. en balnearios de Puerto Rico para determinar posible riesgo de exposición a la salud de los trabajadores. Para lograr esto, se tomaron muestras de agua y arena de seis balnearios del este y oeste de la isla de Puerto Rico con el fin de identificar bacterias patógenas especialmente especies de *Vibrio*. También se evaluó la resistencia a antibióticos de *Vibrio* spp. encontradas, y por último se evaluó el perfil ocupacional de los trabajadores expuestos. Los resultados obtenidos demostraron que las *Vibrio* spp. mayormente encontradas fueron *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio cholerae*, especialmente en una playa del municipio de Aguadilla y Fajardo. *Vibrio cholerae* mostró ser resistente a cuatro antibióticos en comparación con *Vibrio alginolyticus*. El 38% de *Vibrio* spp. aislados fueron resistentes al antibiótico eritromicina. En cuanto al perfil ocupacional, 57% de los encuestados trabajan 16 horas o más semanalmente en el monitoreo de calidad de agua, donde el 43% se expone directamente al agua por un periodo de 5 horas. Este estudio demuestra la importancia de incluir el monitoreo de *Vibrio* spp. en nuestra reglamentación de calidad de agua. La evaluación de la calidad del agua en los balnearios es indispensable para entender el riesgo de exposición a patógenos e implementar las medidas de protección a los empleados para reducir los riesgos a su salud..

Palabras claves: Riesgo ocupacional, Vibrio spp., balnearios, enterococos, resistencia antibiótica, patógenos

Abstract- *Vibrio* spp. is related to the occurrence of cases of gastroenteritis, which are caused by exposure to contaminated feces. Literature documents that beaches can be a source for exposure to *Vibrio* spp. due to the discharge of sanitary waters that reach the coast. The goal of the study was to evaluate the presence of enteric bacteria and *Vibrio* spp. in beaches in Puerto Rico to determine the potential risk of health exposure to workers. To do this, we identified the type of bacteria associated with water in six beaches located in the east and west of the island of Puerto Rico.

[1]División Ciencias y Tecnología, Universidad Ana G. Méndez, Recinto Cupey. Correo electrónico: moralesj8@uagm.edu; jessenia.morales1@gmail.com
[2]División Ciencias y Tecnología, Universidad Ana G. Méndez, Recinto Carolina
[3]United Stated Department of Agriculture, APHIS, National Veterinary Services Laboratories, Iowa

Also, we evaluated the resistance to antibiotics of the *Vibrio* species found, and finally we evaluated the occupational profile of the exposed workers. The results showed that *Vibrio* species most found were *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio cholerae*, especially on beach in the municipality of Aguadilla and Fajardo. *Vibrio cholerae* shown to be resistant to four antibiotics compared to *Vibrio alginolyticus*. Thirty-eight percent of *Vibrio* spp. isolated were resistant to Erythromycin. Regarding the occupational profile, 57% of the respondents work 16 hours or more a week monitoring water quality, and of these, 43% are directly exposed to water for a period of 5 hours. This study demonstrated the importance of including the monitoring of *Vibrio* species in the water quality regulations. Assessing the quality of water in beaches is essential to understand the risk of exposure to pathogens and to implement protective measures for employees to reduce health risks.
Key words: Occupational risks, Vibrio spp., beaches, enterococcus, antibiotic resistance, pathogen

Introducción

Aproximadamente el 39% de la población de los Estados Unidos y más del 50% de la población mundial vive cerca de una zona costera (Korajkic, McMinn & Hardwood, 2018). La natación es la actividad recreativa acuática más frecuente. Esta actividad recreativa implica el contacto de todo el cuerpo con el agua, la cual puede sin duda tener bacterias patógenas que pueden ser perjudiciales a la salud para los nadadores y aún más si accidentalmente ingieren agua; sin embargo, por razones de trabajo también personas pueden exponerse (Jang & Liang, 2018). Las estimaciones globales indican que cada año ocurren más de 120 millones de casos de enfermedades gastrointestinales y 50 millones de casos de enfermedades respiratorias graves como producto de la natación y el baño en aguas costeras contaminadas con aguas residuales (Abdelzaher et al., 2010; Davino, Melo, & Filho, 2015).

La contaminación por microorganismos patógenos en el medio ambiente acuático es uno de los problemas ambientales (Dong et al., 2019), reconocido como una importante preocupación de salud pública y medioambiental; por eso la calidad del agua de playa se evalúa comúnmente en comparación con las normas nacionales e internacionales que varían de un país a otro (Adeniji, Sibanda, & Okoh, 2019). La exposición a aguas contaminadas no se limita a los bañistas, sino que también se extiende al personal que trabaja en los mismos. Por ejemplo, muchos balnearios cuentan con personal de salvavidas que trabajan con la seguridad de los bañistas. También cuentan con empleados de mantenimiento para atender el área de limpieza y recogido de desperdicios. Por otra parte, los técnicos de la Junta de Calidad Ambiental (JCA) llevan a cabo muestreos de calidad de agua en las playas. En el ejercicio de estos muestreos, los técnicos de la JCA pueden exponerse a un riesgo ocupacional debido a la contaminación de microrganismos patógenos en el agua. Realizar un estudio de la calidad del agua utilizada como recreación es la clave

para proteger la salud pública y prevenir la exposición a patógenos asociados a las aguas (Laureano-Rosario et al., 2019).

Para evaluar la calidad de agua en las playas estuarinas y marinas, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) de los EEUU ha establecido regulaciones basadas en bacterias enterococos como indicadores de la contaminación trasmitida por las heces; estos microorganismos fueron correlacionados con los resultados de salud pública en varios estudios epidemiológicos que sirvieron de base para su adopción como indicadores de calidad de agua (Rothenheber & Jones, 2018). Los enterococos son bacterias indicadoras fecales oficiales en muchos países para la determinación de la calidad de agua y el monitoreo con el objetivo de proteger a los nadadores a la exposición a los patógenos entéricos (Tiwari, Kauppinen, & Pitkänen, 2019). Las concentraciones de enterococos cultivables están influenciadas tanto por el impacto de las fuentes conocidas de contaminación fecal como por factores ambientales, los cuales incluyen precipitaciones a través de unas mayores escorrentías, inactivación bacteriana por radiación solar y la resuspención de sedimentos a través del aumento del viento y las olas (Laureano et al., 2017).

En el 2012, el criterio de calidad de aguas recreativas para enterococos no podía exceder de 35 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por 100 mililitros (ml) es decir 35 UFC/100 ml. Este valor fue modificado a 70 UFC/100 ml, donde la Junta de Calidad Ambiental de Puerto Rico estableció estas pautas monitoreando la calidad de agua recreativa alrededor de la isla de Puerto Rico cada dos semanas de acuerdo con la Ley de Evaluación Ambiental y Salud Costera de las Playas de los Estados Unidos en el año 2000 (Laureano et al., 2017).

Sin embargo, los enterococos no son los únicos microorganismos capaces de causar enfermedades; *Vibrio* spp. son microorganismos responsables de diversas infecciones y muertes a humanos en todo el mundo; estudios de investigación muestran que *Vibrio* spp. crece principalmente en aguas cálidas de las zonas costeras (Malavé-Llamas et al., 2019). Diferentes especies de *Vibrio* tienen gran importancia epidemiológica ya que al menos trece especies de *Vibrio* son capaces de causar infecciones en humanos entre los cuales *V. cholerae, V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son clasificados como los más relevantes (Silva et al., 2018). Entre las enfermedades más comunes causadas por *Vibrio* spp. se encuentran la gastroenteritis, intoxicación (por mariscos) e infecciones necrosantes en piel por heridas que si no son tratadas pueden ser críticas. Estas bacterias pueden causar enfermedades en las personas expuestas a agua recreativas contaminadas y los que no nadan pueden estar expuestos si ingieren mariscos contaminados, crudos o mal cocidos o simplemente por tener contacto con la arena (Malavé-Llamas et al., 2019). Sterk et al. (2015)

documentaron a *Vibrio* spp. como un agente de enfermedades trasmitidas por el agua donde la cepa de *Vibrio cholerae* es la responsable de enfermedades en muchos países. Mok et al. (2019) resaltaron los problemas críticos de salud pública asociados con *Vibrio* spp. en el aumento de la resistencia a los antimicrobiano en los ambientes marinos. Según Alm et al. (2014), el ambiente natural es reconocido como un reservorio de bacterias resistentes a antibióticos y genes de resistencias los cuales son importantes en la evolución de diversas bacterias patogénicas. La resistencia a los antibióticos se considera una amenaza grave para la salud humana debido a los limitados tratamientos disponibles y que resultan en mayores costos (Finley et al., 2013).

En la actualidad, las leyes federales en Puerto Rico y los Estados Unidos no tienen implementado el monitoreo de las especies de *Vibrio* por lo que un incremento en estos microorganismos tiende a pasar desapercibido. Identificar la presencia de especies de *Vibrio* en los balnearios de la Isla es de suma importancia para determinar posibles riesgos de exposición en salud pública y ocupacional.

Materiales y método

Los programas de monitoreo de la calidad de agua de las playas incluyen la recolección y análisis de muestras con el propósito de evaluar los niveles de bacterias enterococos que son las bacterias indicadoras fecales (Kelly et al., 2018). En este estudio, además de identificar la cantidad de enterococos en los balnearios de la Isla, también se identificaron especies y cantidad de *Vibrio* para determinar si realmente los *Vibrio* spp. representan un problema de salud pública y ocupacional. A partir de estas muestras, determinamos la susceptibilidad o resistencia a ciertos antibióticos. La identificación de los microorganismos patógenos presentes en las playas de la Isla ayuda a entender los riesgos ocupacionales y de salud pública para prevenirlos. Conocer el tipo de microorganismo presente y su resistencia a antibióticos ayudará a tener mejores herramientas para determinar los posibles problemas de salud causados.

Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en seis balnearios de la Isla, tres balnearios del área oeste y tres balnearios del área este. Estos balnearios de Puerto Rico son lugares públicos visitados frecuentemente por bañistas. Los balnearios del área oeste fueron Crash Boat en Aguadilla (ACB), Playita Rosada en Lajas (PRL) y Playa Sucia en Cabo Rojo (BRC). Los balnearios monitoreados del área este fueron Tropical Beach en Naguabo (TBN), Balneario de Luquillo (LUQ), y Seven Seas en Fajardo (SVS).

Protocolo de muestreo

El protocolo de muestreo y análisis de muestras fue aprobado por el Comité de Bioseguridad Institucional (IBC, por sus siglas en inglés) de la Oficina de Cumplimiento de la Universidad Ana G. Méndez, bajo el número B02-024-18, el 1 de julio 2019. El día que se recolectaron las muestras se analizaron las condiciones del tiempo, las características físicas del cuerpo de agua, y las posibles fuentes de contaminación visible. Para la recolección de muestras, se utilizó una nevera de foam, paquete de hielo, bolsas estériles (Nasco WHIRL-PAK), termómetro, medidor de potencial de hidrógeno (pH), espátula para la arena, botella con agua destilada y hoja de apunte para datos.

Recolectamos las muestras de agua y arena en bolsas estériles de 100 ml en 6 puntos aleatorios de cada balneario; tres puntos en agua y tres puntos en arena. Las muestras de agua fueron recolectadas al sumergirnos en el agua hasta la cintura a una distancia aproximadamente de 6 pies de la orilla y se recolectaron 100 ml de agua de mar en los tres puntos diferentes que fueron clasificados horizontalmente como Puntos A, B y C en cada uno de los seis (balnearios). Las muestras de arena se recolectaron con espátula de plástico y se colocaron en bolsas estériles de 100 ml. A cada muestra de arena, le añadimos agua destilada hasta llegar a la marca de 100 ml de la bolsa estéril. Se agitó suavemente durante 2 minutos y se dejó reposar durante 10 minutos. El pH del agua fue medido en cada punto de muestreo. Todas las muestras fueron transportadas en nevera y trasladadas al laboratorio de microbiología de la Universidad Ana G Méndez, en Carolina en donde fueron procesadas en un periodo menor de 4 horas.

Análisis bacteriológico

Las muestras de agua y arena se procesaron según el método EPA 1600. Luego de la filtración a través de estas membranas de celulosa de 0.45 μm., las muestras fueron inoculadas en placas Petri de 10 cm con los siguientes medios de cultivos: Agar McConkey (McC), Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) y Agar de membrana-Endo (mEndo). Una vez inoculadas las placas de McC yTCBS, las incubamos de 29 a 30ºC, y las placas mEndo se incubaron a 35ºC; todas durante un periodo de 48 horas.

Aislamiento de Vibrio spp.

Aislamos al menos 12 colonias del medio TCBS. Utilizamos el sistema de identificación y caracterización de bacterias del instrumento Biolog o el medio de cultivo cromogénico Hardy CHROM. Los aislamientos de las colonias de *Vibrio* spp. se inocularon en el medio de infusión cerebro corazón (BHI) y se incubaron a 35ºC durante 24 horas. Luego de las 24 horas las colonias de *Vibrio* ssp. fueron

transferidas a microtubos con caldo de BHI y glicerol; se criogenizaron a -80°C. Luego de la criogenización las bacterias fueron activadas al exponerlas a temperatura ambiente y luego se incubaron nuevamente a 35°C por 24 horas en el medio BHI para el crecimiento y fortalecimiento de las bacterias. Se aislaron las colonias de *Vibrio* spp. que crecieron en el medio de cultivo BHI y se inocularon en el medio cromogénico Hardy CHROM, el cual permitió identificar las especies de *Vibrio* por color.

Utilizamos un inóculo de 10 µl para inocular en el panel de microarreglos Gen 3, durante 18 horas antes de leer los resultados del Biolog. Para el análisis de resistencia a antibiótico, se seleccionó una colonia de un cultivo aislado de *Vibrio* spp. y se analizó con el método Kirby-Bauer. Subcultivamos la colonia seleccionada en el Agar Mueller Hinton (MHA) con un estriado que cubrió toda la placa. Mediante técnicas de asepsia, colocamos los discos de antibiótico a la placa que ya tiene el cultivo e incubamos por 24 horas a 35°C. Luego de las 24 horas, observamos los halos de inhibición y llevamos a cabo el análisis de la medición del diámetro del halo, verificando las medidas con las tablas de resistencia a antibióticos correspondientes (Hudzick, 2009).

Protocolo para la administración cuestionarios del perfil ocupacional

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Investigación de Sujetos Humanos de la Oficina de Cumplimiento de la Universidad Ana G. Méndez, bajo el número IRB 01-788-20 el 17 de abril de 2020. El perfil ocupacional y la exposición al riesgo fueron evaluados utilizando un cuestionario dirigido a los técnicos de monitoreo de agua.

El cuestionario constó de ocho preguntas para conocer el tiempo de contacto con el agua por parte del personal que trabaja en los balnearios, así como la cantidad de horas de trabajo y las medidas de protección. El cuestionario fue anónimo sin identificadores personales ni demográficos, el cual fue administrado a personas de ambos sexos mayores de 21 años que trabajarán como técnicos de monitoreo de calidad agua o salvavidas. El cuestionario fue desarrollado en formato digital para ser enviado a través de un enlace electrónico con la descripción del estudio, el propósito de la investigación, y los posibles beneficios de la participación en el estudio.

Resultados

Los resultados de la evaluación bacteriana de especies Vibrio y enterococos incluyen los seis balnearios de Puerto Rico, de los cuales tres estaban localizados en el área este y tres en el área oeste de la Isla. En la Tabla 1, están los promedios de colonias de bacterias UFC/ml en resumen de los tres puntos (A, B, y C), dividido por

medio de cultivo (mEndo, McC y TCBS), y a su vez dividido por los 6 balnearios seleccionados: Crash Boat en Aguadilla (ACB), Playita Rosada en Lajas (PRL), y Playa Sucia en Cabo Rojo (BRC). Los balnearios monitoreados del área este fueron Tropical Beach en Naguabo (TBN), Balneario de Luquillo (LUQ), Seven Seas en Fajardo (SVS) y por tipo de muestra (arena y agua).

Tabla 1

Promedios de muestras de agua y arena por medio de cultivo y por cada balneario

	Promedios					
Balneario	**mEndo UFC/ml**		**McC UFC/ml**		**TCBS UFC/ml**	
	Agua	Arena	Agua	Arena	Agua	Arena
TBN	3,900	10,367	1,333	1,400	3,133	1,100
LUQ	733	633	3,533	1,833	100	67
SVS	133	7,967	1,533	700	1,167	1,300
ACB	1,600	4,667	367	600	533	800
PRL	20,200	11,733	10,233	6,267	433	10,300
BRC	767	7,333	233	67	367	167
Promedio UFC/ml	27,333	42,700	17,233	10,867	5,733	13,734

En el balneario Tropical Beach en Naguabo, tanto en las muestras de agua, como en las muestras de arena, la mayor cantidad de bacterias que crecieron fue en el medio mEndo, lo cual indica que son bacterias coliformes fecales (Figura 1).

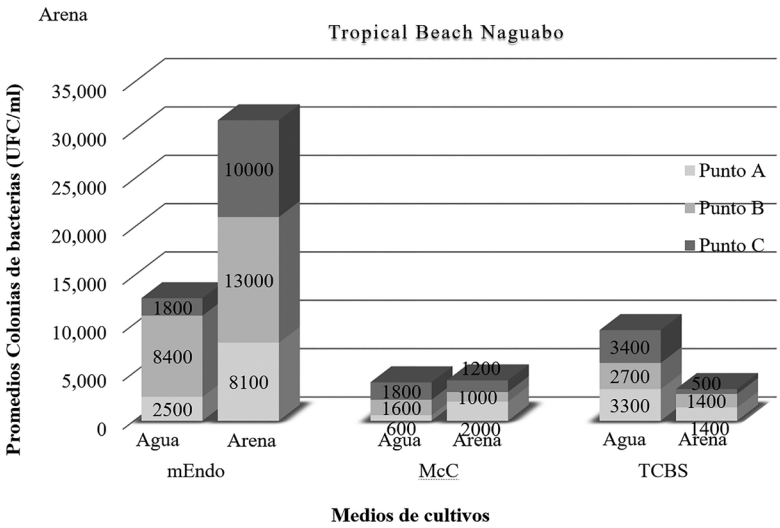

Figura 1. Distribución por medios y punto de muestreo en el balneario Tropical Beach en Naguabo

El Punto A (agua) del balneario de Luquillo obtuvo la mayor cantidad de bacterias entéricas (Figura 2).

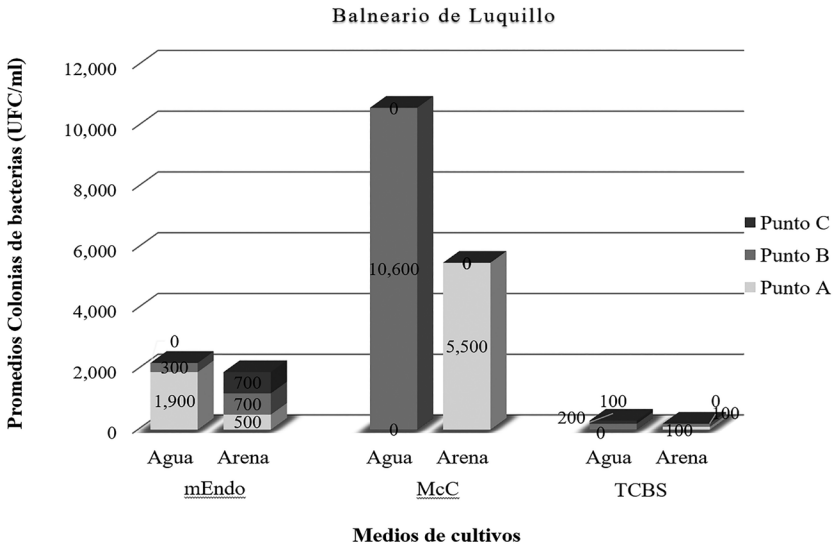

Figura 2. Distribución por medios de cultivo y punto de muestreo en el balneario de Luquillo en Naguabo

También en el balneario Seven Seas en Fajardo, identificamos bacterias entéricas. El mayor crecimiento bacteriano fue en las placas de McConkey (muestras de agua) y el medio mEnd (muestras de arena) (Figura 3).

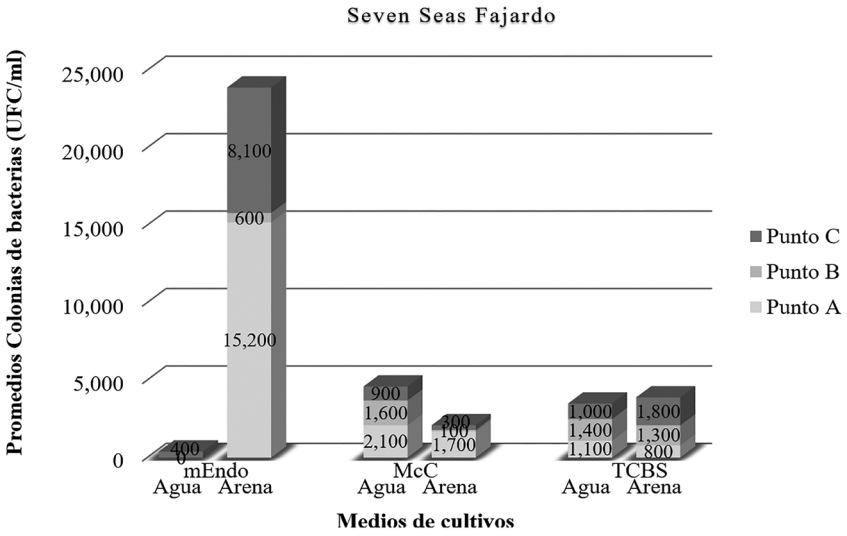

Figura 3. Distribución por medios y punto de muestreo en el balneario Seven Seas, Fajardo

En el balneario Crash Boat en Aguadilla, encontramos una gran cantidad de bacterias en las muestras de agua y arena en el medio mEndo con presencia de coliformes fecales (Figura 4).

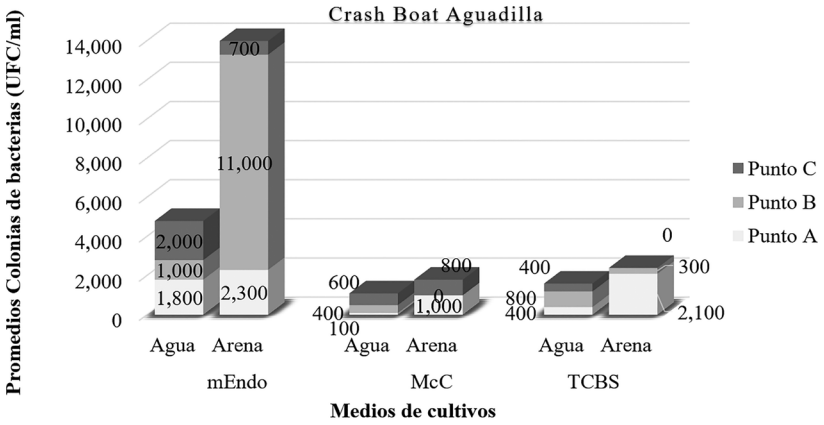

Figura 4. Distribución por medios de cultivo y punto de muestreo en el balneario Crash Boat, Aguadilla

En el Punto C del balneario Playita Rosada en Lajas, la mayor cantidad de bacterias ocurrió en las muestras de agua con >30,000 UFC/ml (TMTC) en el medio mEndo y en el medio McConkey, y 6,400 UFC/ml en el medio de cultivo TCBS en las muestras de arena (Figura 5).

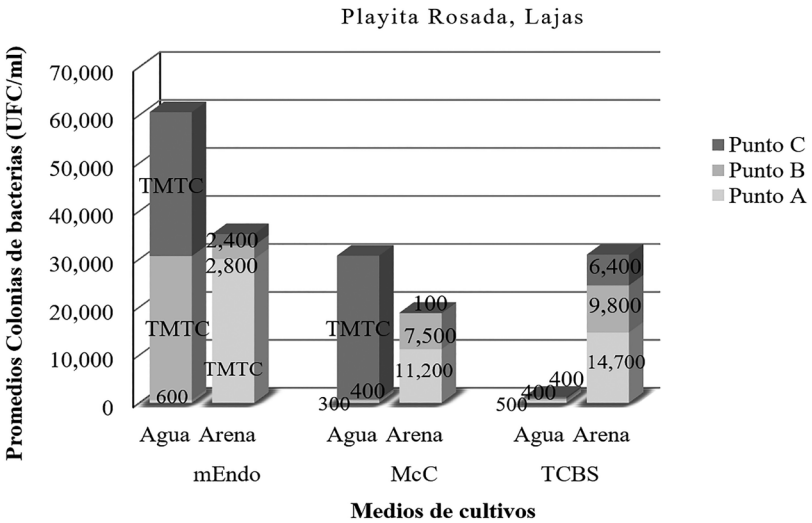

Figura 5. Distribución por medios y punto de muestreo en el balneario Playita Rosada, Lajas

Bacterias aisladas de los cultivos

Entre las especies de *Vibrio* aisladas en los balnearios seleccionados, identificamos *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio cholerae*. Ambas especies de *Vibrio* se encontraron tanto en agua como en arena. Al realizar la prueba de resistencia antibióticos con el método Kirby-Bauer, las especies de *Vibrio cholerae* presentaron mayor resistencia a antibióticos que las especies de *Vibrio alginolyticus*. De las seis colonias de *Vibrio cholerae* que crecieron del muestreo en los balnearios, tres (3) de ellas fueron resistentes al antibiótico eritromicina. Si embargo las colonias de *Vibrio cholerae* aisladas en el balneario Crash Boat en Aguadilla mostraron resistencia a cuatro (4) antibióticos; eritromicina, ceftazidima, sulfa/trimetoprima y cefotaxina. El 38% de los *Vibrios* spp. aislados fueron resistente a eritromicina y el 63% susceptible a eritromicina, el 100% de los *Vibrio* spp. fue susceptible a ciprofloxacina, tetraciclina, gentamicina, doxidina y a levofloxacina. Por otro lado, el 25% de los *Vibrio* spp. aislados fueron resistentes y el 75% fueron susceptibles a cefotaxina. En los antibióticos ceftazidime y sulfa/trimeth, el 13% de los *Vibrio* spp. asilados fueron resistentes y el 88% fueron sensibles (Figura 6).

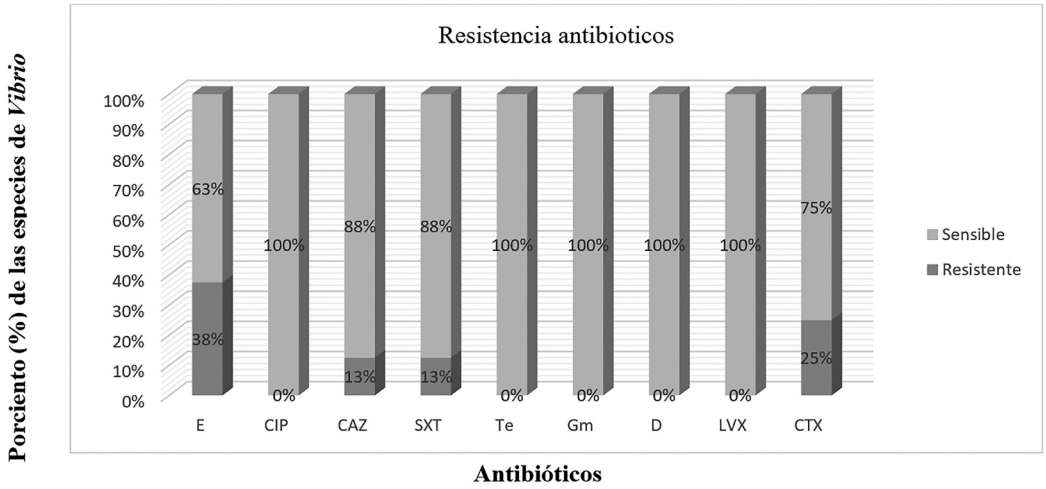

Figura 6. Resistencia antibióticos de las especies *Vibrio* spp. aisladas en el balneario Crash Boat en Aguadilla

Perfil ocupacional de trabajadores en balnearios

El perfil ocupacional de los trabajadores lo limitamos a los técnicos de calidad de agua de la Junta de Calidad Ambiental de Puerto Rico y los salvavidas que trabajan en uno de los balnearios seleccionados para los muestreos. En el caso de los salvavidas, no fue posible realizar las encuestas debido a la orden ejecutiva donde se estableció un periodo de aislamiento social en Puerto Rico, debido a la Pandemia por el COVID 19. En este caso, nos vamos a referir a información descrita en sus puestos y al conocimiento previo sobre el particular.

Los técnicos de monitoreo de calidad de agua trabajan en los diversos balnearios de la Isla recolectando muestras de agua para la realización de análisis bacteriológico de calidad de agua de los balnearios. Estos análisis bacteriológicos determinan si los balnearios están aptos para bañistas. Por otro lado, también trabajan monitoreando balnearios con posibles riesgos a contaminación antropogénicas como contaminaciones por descargas, desbordamientos de sistemas sanitarios entre otros. Según los datos obtenidos en los cuestionarios completados por seis técnicos de monitoreo de calidad de agua, el 57% de estos empleados trabajan 16 horas o más semanalmente en el muestro de agua, el 14% trabajan de 11 a 15 horas semanalmente y el el 29% solo trabaja hasta cinco horas semanalmente.

El 58% de los técnicos de monitoreo de calidad de agua se exponen directamente al agua por 6 horas o más semanalmente y el 42% se expone al agua hasta 5 horas semanalmente. Sin embargo, a pesar de la exposición al agua de los técnicos de monitoreo de calidad de agua, el 100% de ellos utilizan guantes como equipo de seguridad personal. El 42% de estos empleados al realizar las muestras de agua utilizan un instrumento externo; sin embargo, el 29% tiene contacto directo con el agua y otro 29% a pesar de utilizar un instrumento externo tienen contacto directo con el agua. Los empleados de calidad de agua que tienen contacto directo con el agua durante los monitoreos solo sumergen sus extremidades (manos y pies).

El 100% de los técnicos de monitoreo de agua al culminar sus labores de muestreo, utilizan desinfectantes o el lavado de manos con jabón como técnicas asépticas; sin embargo, no toman ninguna medida para la limpieza o desinfección de los pies. Entre los eventos que expone al personal de monitoreo de calidad de agua, se encuentran la realización de muestreos cerca de las desembocaduras de los ríos, las condiciones de la marea y las emergencias ambientales como derrames de desperdicios tóxicos, aguas usadas, vertederos y los mataderos.

El perfil ocupacional de los salvavidas está basado en la descripción de las funciones del puesto. Los salvavidas en los balnearios son los encargados de vigilar, prevenir y atender bañistas brindando respuesta inmediata de rescate en los predios de los balnearios. Los salvavidas tienen contacto directo, tanto con el agua como con la arena, en las extremidades como manos y pies y en caso de tener que realizar un salvamento el contacto con el agua es directo en todo el cuerpo.

Es importante señalar que en el balneario seleccionado para observación trabajaban tres salvavidas, los cuales recorrían todos los predios del balneario sin la utilización de equipos de protección personal como zapatos de agua o guantes. El horario de los salvavidas fueron jornadas de 8 horas cinco días a la semana. Solo-Gabriele (2016) documentó la exposición directa a microbios presentes en el agua

y arena como fuente para una trasmisión de enfermedades infecciosas; podemos inferir el riesgo a infecciones en los salvavidas debido a la exposición directa en extremidades como manos y pies.

Discusión de resultados de las fuentes de contaminación en los balnearios estudiados

Existen varios factores que pueden incrementar la cantidad de coliformes totales presentes, tanto en el agua como en la arena en el Punto B del balneario Tropical Beach en Naguabo, debido a que esta es la zona más concurrida por los bañistas. En la arena alrededor del balneario observamos excremento de animales. Por otro lado, el balneario carece de duchas y baños públicos ni privados. La defecación al aire libre incrementa de manera significativa la cantidad de microorganismos encontrados en el balneario. Estos resultados sugieren acciones como las planteadas por Viji et al. (2019), quien recomendó acciones específicas en las regulaciones ambientales para evitar la defecación en un balneario. A unos 80 pies aproximadamente del balneario se encuentra una urbanización la cual cuenta con alcantarillas. Al momento de realizar el monitoreo, la misma estaba en óptimas condiciones; sin embargo, un desbordamiento arrastraría el agua sanitaria hasta el balneario lo que representa una fuente importante de contaminación microbiana, como en los resultados planteados por Tillett et al. (2018) en los sistemas de alcantarillado con mal funcionamiento. La cantidad de zafacones en el balneario era limitada por y observamos una gran cantidad de basura en los alrededores y particularmente en la arena. Frente al balneario se encuentra un negocio de comida donde uno de los alimentos más vendidos son las ostras. Finalmente, en el Punto A del balneario, observamos escorrentías y agua turbia.

El balneario de Luquillo tuvo uno de los puntos con la mayor cantidad de bacterias entéricas en Punto A en el agua. El Punto A en este balneario tiende a ser el más concurrido; por otro lado, en este mismo Punto y alrededor del balneario observamos perros e iguanas. A pesar de que el balneario cuenta con baños públicos, los mismos se encuentran en muy malas condiciones. Las duchas se encuentran a una distancia prudente de la zona de recreación, la misma cuenta con un sistema de pozo, el cual al momento estaba en buenas condiciones. Por otro lado, al extremo del balneario de Luquillo desemboca el cabo punta embarcadero, el cual puede aumentar la cantidad de materia orgánica presente en el balneario. No se observó descargas ni industrias cerca de este balneario.

Por su parte, en el balneario Seven Seas en Fajardo, donde se identificaron grandes concentraciones de bacterias entéricas y coliformes fecales en el Punto A, observamos animales como perros, gatos e iguanas, así como excremento en varias áreas de la arena, lo cual puede ser arrastrado por el oleaje. Los baños presentes en

este balneario son privados, por lo que pudiera ser un detractor a su uso adecuado. En este balneario, regularmente los bañistas acampan en casetas de un día para otro o hasta fines de semana. Los baños al ser privados tienen un horario de servicio hasta las 4:30pm por lo que personas en casetas durante la noche no tienen sanitarios disponibles. Aproximadamente a 60.96 metros del balneario, se encuentra una zona de casas estilo remolques. Además, cerca de la zona hay una quebrada que pasa por un canal de mangle y desemboca en el balneario justamente en el Punto A de monitoreo. Observamos en el agua de la quebrada basura y una tubería rota que probablemente es de algún sistema sanitario. Al investigar la ruta de la quebrada, la misma pasa por varias urbanizaciones, garajes y parques cercanos al balneario por lo que toda la escorrentía de la quebrada termina desembocando en el balneario, lo cual incrementa la cantidad de microorganismos presentes. Laureano et al. (2017) documentó que las concentraciones de enterococos están influenciadas por factores ambientales como la precipitación, las escorrentías y la resuspención de sedimentos.

En el balneario Crash Boat en Aguadilla en las zonas de la arena, encontramos la mayor cantidad de coliformes totales, bacterias entéricas y *Vibrio* spp.; esto concuerda con los resultados presentados por Torres et al. (2018) donde revelaron que la calidad de la arena está influenciada y directamente relacionada con la calidad de agua en las playas. El Punto de monitoreo B, el cual obtuvo la mayor cantidad de coliformes totales, es el más concurrido del balneario. Aproximadamente a 100 pies de esta área, están concentrados diversos carritos y guaguas de venta de alimentos. Estas guaguas no tienen lugar de desagüe por lo que todo lo que cae en esa zona termina en la arena y subsiguientemente en el agua del balneario. Por otro lado, en el Punto A de monitoreo, encontramos una gran cantidad de microorganismos; próximo a esta zona se encuentra el antiguo muelle. La zona del muelle que tiene contacto con el agua de mar es una zona rocosa, donde se favorece el crecimiento de microorganismos.

Entre los seis balnearios monitoreados, en Playita Rosada en Lajas, encontramos la mayor cantidad de coliformes totales, bacterias entéricas y *Vibrio* spp., tanto en agua como en arena. Las muestras de agua en Playita Rosada fueron seleccionadas de la piscina natural, la cual está completamente sellada con verjas hasta el fondo aproximadamente seis (6) pies, donde el oleaje es relativamente poco y el agua estaba estancada. Por otro lado, cercano a Playita Rosada se encuentra un área con casas flotantes, las cuales si su sistema sanitario no está en óptimas condiciones puede contaminar el agua con material fecal. En Lajas donde se encuentra Playita Rosada, la venta y el consumo de ostras es más alta que en otras áreas de la Isla. La presencia de las conchas en el agua o la arena de mar puede incrementar la cantidad de las especies de *Vibrio* encontrados debido a que las conchas representan

un ambiente favorable para el crecimiento de esta bacteria. El punto de monitoreo A en arena fue donde se obtuvo la de mayor cantidad de coliformes totales, el cual tiene contacto directo con el agua que proviene de la piscina natural, por lo que las bacterias encontradas en el agua pueden llegar directamente a la arena.

En el balneario Playa Sucia en Cabo Rojo, la concentración mayor de visitantes al balneario es en el Punto C, el cual es la entrada principal de la playa. El balneario no cuenta con baños ni duchas accesibles para los visitantes. Cerca del Punto C observamos agua estancada proveniente de un lago cercano que contenía una gran cantidad de basura y tenía un olor desagradable.

Según los datos obtenidos de las muestras de agua de los seis balnearios monitoreados el medio de cultivo mEndo, obtuvo el mayor crecimiento de microorganismos con un 54% de coliformes totales seguido por el medio McConkey, el cual identifica las bacterias entéricas con un 34%, y finalmente el medio TCBS, el cual identifica los *Vibrio* spp. con un 12%. Playita Rosada en Lajas fue el balneario con mayor contaminación en coliformes totales en agua y bacterias entéricas en agua. Para las especies de Vibrio, el balneario Tropical Beach en Naguabo fue el que obtuvo el mayor crecimiento de estos microorganismos.

Conforme a los resultados de las muestras de arena de los seis balnearios monitoreados, el medio mEndo obtuvo la mayor cantidad de microorganismos de coliformes totales (64%). A diferencia de las muestras de agua, en las muestras de arena el medio TCBS obtuvo un 20% del crecimiento y en McConkey se obtuvo el 16% del crecimiento. El balneario Playita Rosada en Lajas fue el balneario con mayor cantidad de microorganismos aislados de las muestras obtenidas de arena.

Por su parte, el balneario con mayor cantidad de *Vibrio* spp. en muestras de agua fue Tropical Beach en Naguabo con 3,133 UFC/ml y el balneario con menor cantidad de especies de *Vibrio* fue el balneario de Luquillo con 100 UFC/ml. Por otro lado, en las muestras de arena el balneario con mayor cantidad de *Vibrio* spp. fue Playita Rosada en Lajas con 10,300 UFC/ml; el balneario con menor cantidad de las especies de Vibrio fue el balneario de Luquillo con 67 UFC/ml. Entre las especies de *Vibrio* encontrados en los diversos balnearios se encuentran *Vibrio cholerae y Vibrio alginolyticus.* Ambas especies de *Vibrio*, encontramos en muestras de agua y arena de balnearios monitoreados.

Según los promedios obtenidos de las muestras de agua y arena, la mayor cantidad de microorganismos se obtuvieron en el medio mEndo, tanto en muestras de agua como en arena; siendo las muestras de arena las que obtuvieron una

mayor cantidad con representación del 36% y 23% en agua. Las bacterias entéricas observadas en el medio de cultivo McConkey en agua ocuparon la tercera posición con una representación del 15%. Las especies de *Vibrio* encontrados en la arena tuvieron representación del 12% y finalmente las muestras de arena en McConkey obtuvieron un 9% y TCBS en agua obtuvo un 5%.

Discusión de los resultados a la resistencia a antibióticos

Los resultados de la resistencia de *Vibrios* ssp. a los antibióticos fueron: eritromicina (15µm), ceftazidima (30µm), sulfa/trimeth (25µm), cefotaxima (30µm), ciprofloxacina (5µm), tetraciclina (30µm), gentamicina (10µm), doxidina (30µm) y levofloxacina (5µm). Los resultados demostraron que la mayoría de las *Vibrio* spp. aislados fueron susceptibles a los antibióticos antes mencionados. Estos hallazgos son favorables ya que se puede inferir que la contaminación no proviene de industrias. Determinar esto es de gran utilidad ya que los desperdicios o contaminación procedentes de industrias tienen alto contenido de antibióticos favoreciendo la resistencia a los diversos microorganismos presentes en el medio ambiente. Una ventaja de que estas especies de *Vibrio* sean susceptibles a los antibióticos presentes en el medio ambiente permite tratar más eficazmente las diversas enfermedades e infecciones adquiridas en los balnearios por estos patógenos. Sin embargo, la resistencia de antibióticos de los *Vibrio* spp. puede variar de acuerdo al lugar de monitoreo y condiciones antropogénicas presentes, por lo que el monitoreo continuo tanto del agua como la arena es de suma importancia para la salud y seguridad ocupacional.

Discusión del perfil ocupacional y exposición al riesgo

La seguridad ocupacional en los diversos balnearios es de suma importancia para la protección de los empleados a la posible exposición a microorganismos patógenos presentes en el agua y en la arena. Este estudio demostró que tanto en la arena como en el agua hay concentraciones significativas de bacterias entéricas, coliformes fecales y *Vibrio* spp.

En los balnearios en Puerto Rico existen dos grupos de trabajadores que pueden exponerse durante sus horas laborables. Estos grupos son los técnicos de monitoreo de aguas y los salvavidas. Los técnicos de monitoreo de calidad de agua tienen exposición a aguas potencialmente contaminadas, las cuales pueden trasmitir enfermedades y afectar su salud. El 100% de los técnicos de monitoreo de calidad de agua en Puerto Rico encuestados en este estudio contestó que utilizan guantes como equipos de seguridad. Sin embrago, los mismos tienen contacto en ambas extremidades manos y pies por lo que la exposición a microorganismos patógenos puede ocurrir a través de cortaduras en los pies ya que no tienen protección de

seguridad. Por otro lado, solo el 42% de los técnicos encuestados utilizan instrumentos externos, que constan de un mango y una superficie para recolectar el agua, por lo que el 58% de estos empleados tienen contacto directo con el agua y la arena.

Las limitaciones de este estudio están relacionadas con la rigurosidad de la oficina de cumplimiento del IRB para llevar a cabo las encuestas durante la pandemia del COVID-19 en el 2020. La administración de cuestionarios a los salvavidas del balneario del Municipio de Lajas no pudo ser ejecutada debido al cierre de operaciones y aislamiento social durante la pandemia ya que sus contactos de teléfono o email no existían en una base de datos.

Conclusiones y recomendaciones futuras

En este estudio, confirmamos la presencia de microorganismos patógenos al ser humano, tanto en el agua como en la arena de los balnearios estudiados. Sin embargo, en la actualidad la calidad de agua de los balnearios es determinada solo por la presencia de enterococos en el agua; y las arenas no forman parte del monitoreo reglamentario. Nuestro estudio valida estudios anteriores realizados por Fewtrell y Kay (2015), quienes encontraron concentraciones significativamente más altas de bacterias indicadoras de contaminación fecal en la arena que en las muestras de agua. Por lo que señalaron que las arenas contaminadas son un riesgo potencial de infección y su impacto potencialmente negativo en la calidad de agua. Existen diversos factores que influyen en la colonización de *Escherichia coli* en la arena donde las olas y las mareas son el mecanismo de transporte para estos microorganismos (Praveena, Shafiqa & Zaharin, 2018). Por otro lado, los enterococos no son los únicos microorganismos capaces de causar enfermedades. *Vibrio* spp. son bacterias presentes tanto en aguas como en la arena, las cuales pueden ser patógenas a los humanos también.

Existe la necesidad de comunicar los riesgos en cuanto a la salud pública para comprender los factores que afectan la diversidad y concentración de patógenos en un cuerpo de agua determinado, así como desarrollar modelos predictivos para informar las decisiones en tiempo real (Rossie et al., 2020). Los balnearios de la Isla son comúnmente utilizados de manera recreativa y ocupacional, por lo que el buen estado de estos es de suma importancia para la salud pública de los visitantes y empleados de los respectivos balnearios.

Conocer y monitorear los diversos balnearios de la Isla puede ayudar a disminuir el riesgo de exposición a microorganismos patógenos. La evaluación de las especies de *Vibrio* en los balnearios de la Isla puede determinar el potencial riesgo de exposición en salud pública y ocupacional. El perfil ocupacional de los técnicos

de monitoreo de agua demuestra la exposición al riesgo de estos empleados debido al tiempo que pasan en el agua haciendo sus funciones y por la baja protección personal que utilizan al momento de realizar los muestreos.

Entre las medidas de salud y seguridad personal, la JCA debe implementar la utilización de botas y gafas de seguridad para su personal al realizar los muestreos, así como una mayor utilización de instrumentos externos para lograr que los técnicos de monitoreo de calidad de agua no tengan ningún tipo de contacto directo con el agua ni con la arena. Por otro lado, el proceso de desinfección en las extremidades (manos y pies) son de suma importancia para la salud de los empleados.

Finalmente, los eventos o lugares de muestreo que expongan al personal a un mayor contacto con contaminantes biológicos deben tener un protocolo donde los empleados utilicen equipo de seguridad, como por ejemplo batas o delantal. Se recomienda implantar nuevas técnicas para la recolección de las muestras de agua en los balnearios, las cuales disminuyan la exposición a el agua con posible presencia de patógenos, así como mejorar el equipo de seguridad incluyendo botas, gafas de seguridad y bata desechables de ser necesarias. Al momento de realizar el muestreo, los equipos de seguridad son parte fundamental para los técnicos de monitoreo de agua ya que protegen a los empleados del contacto, tanto del agua como de la arena. Por otro lado, el proceso de desinfección luego de realizar muestreo no puede ser solo el lavado de manos ya que los pies también tienen contacto con el agua y la arena y puede ser una fuente de infección.

La exposición de los salvavidas tanto a través del agua como con la arena es mucho mayor en comparación con los técnicos de monitoreo de agua. Es de suma importancia tomar en consideración aquellos salvavidas que contengas heridas abiertas, las cuales pueden incrementar la vía de entrada de patógenos y causarles una enfermedad infecciosa. Al conocer el perfil ocupacional y la exposición al riesgo de los empleados de los diversos balnearios, se pueden implementar medidas que beneficien al empleado reduciendo o eliminando riesgo a la salud.

Existen diversas estrategias para manejar el riesgo de contaminación en los balnearios de la Isla; entre ellos un plan de comunicación de riesgos, plan de monitoreo y plan de investigación. El propósito del plan de comunicación de riesgos es diseminar el conocimiento sobre la importancia de la calidad del agua y la arena de los balnearios, así como la orientación de los posibles riesgos a la salud pública y ocupacional. Entre las diversas alternativas para este plan se encuentran la inserción de los elementos de riesgo en los currículos de las escuelas, iniciativas comunitarias, conferencias a la comunidad científica y charlas a la comunidad. Por otro lado,

el plan de monitoreo estaría centrado en la implementación del monitoreo de la arena para reducir los riesgos de exposición a los bañistas. El propósito del plan de investigación es la obtención de fondos que apoyen investigaciones relacionadas a los balnearios de Puerto Rico. Entre los diversos fondos se encuentran NIH R25, EJ Grant, Pollution Prevention Grant Program: y Enviromental Education Grant.

Agradecimientos

Este proyecto fue subvencionado por el proyecto Atlantic Emerging Technologies & Industrial Hygiene Training Center (SUBAWARD 41977-B) de la Universidad Ana G. Méndez, el cual fue auspiciado por el Instituto Nacional de Ciencias de Salud Ambiental (NIEHS, por sus siglas en inglés) de los Institutos Nacionales de la Salud (NIH, por sus siglas en inglés) en consorcio con la Universidad de la Ciudad de Nueva York (CUNY, por sus siglas en inglés), así como al proyecto HSI-STEM. A los estudiantes sub graduados, Stephen A. Narvárez, Carlos Hernández, Kiomara Carrero, Paola González, Rubén Suro, Solymar Pellot, Victor E. Santiago y Emmanuel Carrión; por su colaboración en el estudio, y la Universidad Ana G. Méndez, Recinto Carolina por proveer el acceso a las instalaciones del laboratorio de investigación. Al Sr. Luis Mercado y a los Técnicos de monitoreo de calidad de agua de la Junta de Calidad Ambiental de Puerto Rico por el acceso a la administración de cuestionarios.

Literatura citada

Abdelzaher, A. M., Wright, M. E., Ortega, C., Solo-Gabriele, H. M., Miller, G., Elmir, S., … Fleming, L. E. (2010). Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. *Applied and Environmental Microbiology, 76*(3), 724–732. https://doi.org/10.1128/AEM.02127-09

Adeniji, O. O., Sibanda, T., & Okoh, A. I. (2019). Recreational water quality status of the Kidd's Beach as determined by its physicochemical and bacteriological quality parameters. *Heliyon, 5*(6), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01893

Alm, E. W., Zimbler, D., Callahan, E., & Plomaritis, E. (2014). Patterns and persistence of antibiotic resistance in faecal indicator bacteria from freshwater recreational beaches. *Journal of Applied Microbiology, 117*(1), 273–285. https://doi.org/10.1111/jam.12512

Davino, A. M. C., de Melo, M. B., & Filho, R. A. C. (2015). Assessing the sources of high fecal coliform levels at an urban tropical beach. *Brazilian Journal of Microbiology, 46*(4), 1019-1026. https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140466

Dong, P., Cui, Q., Fang, T., Huang, Y., & Wang, H. (2019). Occurrence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in water and sediment in urban recreational water. *Journal of Environmental Sciences (China), 77*, 65-74. https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.011

Fewtrell, L., & Kay, D. (2015). Recreational water and infection: A review of recent findings. Current *Environmental Health Reports, 2*(1), 85–94. https://doi.org/10.1007/s40572-014-0036-6

Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. G. J., Mcewen, S. A., Li, X. Z., Gaze, W. H., … Topp, E. (2013). The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases, 57*(5), 704–710. https://doi.org/10.1093/cid/cit355

Hudzick, J. (2009). Kirby-Bauer diffusion susceptibility test protocol. *American Society for Microbiology.* https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf

Jang, C. S., & Liang, C. P. (2018). Characterizing health risks associated with recreational swimming at Taiwanese beaches by using quantitative microbial risk assessment. *Water Science and Technology, 77*(2), 534–547. https://doi.org/10.2166/wst.2017.571

Kelly, E. A., Feng, Z., Gidley, M. L., Sinigalliano, C. D., Kumar, N., Donahue, A. G., … Solo-Gabriele, H. M. (2018). Effect of beach management policies on recreational water quality. *Journal of Environmental Management, 212,* 266–277. https://doi.org/10.1016/j.jenvman .2018.02.012

Korajkic, A., McMinn, B. R., & Harwood, V. J. (2018). Relationships between microbial indicators and pathogens in recreational water settings. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 15*(12), 1–39. https://doi.org/10.3390 /ijerph15122842

Laureano-Rosario, A. E., Symonds, E. M., Rueda-Roa, D., Otis, D., & Muller-Karger, F. E. (2017). Environmental factors correlated with culturable enterococci concentrations in tropical recreational waters: A case study in Escambrón Beach, San Juan, Puerto Rico. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 14*(12). https://doi.org/10.3390/ijerph14121602

Laureano-Rosario, A. E., Duncan, A. P., Symonds, E. M., Savic, D. A., & Muller-Karger, F. E. (2019). Predicting culturable enterococci exceedances at Escambrón Beach, San Juan, Puerto Rico using satellite remote sensing and artificial neural networks. *Journal of Water and Health, 17*(1), 137-148. https://doi.org/10.2166/wh.2018.128

Malavé-Llamas, K. Irizarry-Pagán, E., Suro-Valverdi, R., Delgado-Serrano, G. (2019). A beach monitoring program should include all known prevalent pathogens specially *Vibrio* spp.". *EC Microbiology 15*, 6, 461-462. https://www.ecronicon.com/ecmi/pdf/ECMI-15-00650.pdf

Mok, J. S., Ryu, A., Kwon, J. Y., Park, K., & Shim, K. B. (2019). Abundance, antimicrobial resistance, and virulence of pathogenic Vibrio strains from molluscan shellfish farms along the Korean coast. *Marine Pollution Bulletin, 149*(August). https://doi.org/10.1016/j.marpo lbul.2019.110559

Praveena, S. M., Shamira, S. S., Ismail, S. N. S., & Aris, A. Z. (2016). Fecal indicator bacteria in tropical beach sand: Baseline findings from Port Dickson coastline, Strait of Malacca (Malaysia). *Marine Pollution Bulletin, 110*(1), 609–612. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.024

Rossi, A., Wolde, B. T., Lee, L. H., & Wu, M. (2020). Prediction of recreational water safety using Escherichia coli as an indicator: case study of the Passaic and Pompton rivers, New *Jersey. Science of the Total Environment, 714.* https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136814

Rothenheber, D., & Jones, S. (2018). Enterococcal concentrations in a coastal ecosystem are a function of fecal source input, environmental conditions, and environmental sources. *Applied and Environmental Microbiology, 84*(17). https://doi.org/10.1128/AEM.01038-18

Silva, I. P., Carneiro, C. de S., Saraiva, M. A. F., Oliveira, T. A. S. de, Sousa, O. V. de, & Evangelista-Barreto, N. S. (2018). Antimicrobial resistance and potential virulence of Vibrio parahaemolyticus isolated from water and bivalve mollusks from Bahia, Brazil. *Marine Pollution Bulletin, 131*, 757-762. https://doi.org/10.1016/j.ma rpolbul.2 018.05.007

Solo-Gabriele, H. M., Harwood, V. J., Kay, D., Fujioka, R. S., Sadowsky, M. J., Whitman, R. L., Brandão, J. C. (2016). Beach sand and the potential for infectious disease transmission: Observations and recommendations. *Journal of*

the Marine Biological Association of the United Kingdom, 96(1), 101-120. https://doi.org/10.1017/S0025315415000843

Sterk, A., Schets, F. M., de Roda Husman, A. M., de Nijs, T., & Schijven, J. F. (2015). Effect of Climate Change on the Concentration and Associated Risks of Vibrio spp. in Dutch Recreational Waters. *Risk Analysis, 35*(9), 1717–1729. https://doi.org/10.1111/risa.12365

Tillett, B. J., Sharley, D., Almeida, M. I. G. S., Valenzuela, I., Hoffmann, A. A., & Pettigrove, V. (2018). A short work-flow to effectively source faecal pollution in recreational waters – A case study. Science of the Total *Environment, 644,* 1503–1510. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.005

Tiwari, A., Kauppinen, A., & Pitkänen, T. (2019). Decay of Enterococcus faecalis, Vibrio cholerae and MS2 Coliphage in a Laboratory Mesocosm Under Brackish Beach Conditions. *Frontiers in Public Health, 7*(September), 1–12. https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00269

Torres-Bejarano, F., González-Márquez, L. C., Díaz-Solano, B., Torregroza-Espinosa, A. C., & Cantero-Rodelo, R. (2018). Effects of beach tourists on bathing water and sand quality at Puerto Velero, Colombia. *Environment, Development and Sustainability, 20*(1), 255–269. https://doi.org/10.1007/s10668-016-9880

Viji, R., Shrinithivihahshini, N. D., Santhanam, P., Balakrishnan, S., Yi, Y., & Rajivgandhi, G. (2019). Biomonitoring of the environmental indicator and pathogenic microorganisms' assortment in foremost pilgrimage beaches of the Bay of Bengal, Southeast coast, India. *Marine Pollution Bulletin, 149*(August). https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110548