

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**Avaliação Bacteriológica da Água do Mar e dos Mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) cultivados na Ilha Guaíba, Baía de Sepetiba,
RJ**

Milena Marcela Domingues Pereira

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

**Avaliação Bacteriológica da Água do Mar e dos Mexilhões *Perna perna*
(Linnaeus, 1758) cultivados na Ilha Guaíba, Baía de Sepetiba, RJ**

MILENA MARCELA DOMINGUES PEREIRA

Sob a orientação do professor
Pedro Paulo de Oliveira Silva

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Setembro de 2008

As energias superiores nas quais acredito: Deus e Natureza

A minha mãe do coração e avó por laço familiar **Alice**, por ter sido minha guia e exemplo de fortaleza durante todos os momentos da minha vida.

A **Marcos Schettini**, meu companheiro nesses dez anos, por ter acreditado no meu potencial e em prol dele aceito renunciar a tantos momentos que poderiam ter sido compartilhados.

A minha mãe **Bernadete** (*in memoriam*), pela proteção espiritual que realizou durante todos estes anos de minha caminhada.

Aos meus irmãos **Vanessa e Thiago**, por demonstrarem em seu olhar toda a admiração que têm pelo caminho que venho trilhando, a ponto de cogitarem segui-lo.

Ao meu avô **Antonio** (*in memoriam*), meu pai **Antonio**, sua esposa **Jussara** e tia **Tania**, pela evidente satisfação em me ver crescendo profissionalmente.

Aos **Schettini e Soares** por terem sido “minha” família durante todos estes anos de formação.

Aos meus pais intelectuais, **Aderbson** por ter me mostrado o talento para Biologia e **Vanessa** por me apresentar o fascinante mundo da Biologia Marinha.

Aos meus orientadores da época de graduação, doutores **Hélcio Resende Borba e Jairo Pinheiro da Silva**, por terem se dedicado com tanto carinho a me ensinar que um objetivo deve ser seguido, por mais difícil que seja alcançá-lo.

Aos meus **amigos**, em especial **Roberta Rocha, Elis Alves, Karina Cancelli, Leonardo Mataruna, Alexandre de Miranda, Marlon Cavalcanti e Giselle Silva**, por me incentivarem sempre e terem compreendido a minha ausência nestes dois anos de estudo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À querida **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro** pela formação profissional.
- Ao meu orientador, **Dr. Pedro Paulo de Oliveira Silva**, por aceitar me orientar, por ter sido solícito sempre que precisei e por colocar toda a equipe do ToxMar “embaixo de suas asas”.
- A todos os **professores** do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária pelo compartilhamento de conhecimento em prol de minha formação.
- A **MSc. Vanessa de Magalhães Ferreira** por ter sido tão competente enquanto professora de Biologia Marinha e me levar para o ToxMar, pelo abrigo de sua casa e pela sua amizade incondicional.
- A **MSc. Rômulo Cardoso Valadão** por todo o conhecimento técnico compartilhado, por estar sempre ao meu lado no laboratório e pelas longas conversas de incentivo nos momentos de desânimo.
- A **MSc. Gesilene Mendonça de Oliveira** pela imensa amizade e disponibilidade em tudo que precisei.
- À equipe do ToxMar e colaboradores: **Gesilene Oliveira, Aderbson Lourenço, Elizete Amorim, Geisi Mariné, Patrícia Silva, Bruno Ramirez, Helena Santos, Ana Lúcia Ribeiro, Elisa Barreto, Marcos Oliveira**, por toda a ajuda e alegria compartilhadas em trabalhos de campo.
- À estagiária **Tatiani Abreu de Alencar** pela amizade e ajuda em laboratório.
- A **Luiz Carlos Borges Mendes e Roberto da Silva** pelo transporte até Mangaratiba nos dias de coleta.
- À técnica **MSc. Elizete Amorim** por ter me iniciado num laboratório de microbiologia.
- À técnica **Edina Rodrigues** por toda a colaboração à realização do trabalho no laboratório.
- À **Profª. Dra. Rosa Helena Luchese** pela disponibilidade da infra-estrutura do laboratório sob sua coordenação.
- Ao **Prof. Dr. Celso Guimarães Barbosa** pela realização das análises estatísticas.
- À **Prefeitura Municipal de Mangaratiba**, em especial ao secretário **Giovanni Kede**, pelo apoio ao trabalho e financiamento da embarcação para as coletas.
- À **Associação de Maricultores de Mangaratiba**, em especial a **Marcos de Souza, Maria dos Santos, Guacira Moraes, Sr. Expedito da Silva e Ronaldo Gonçalves** pela confiança no trabalho, disponibilidade da estrutura de cultivo, fornecimento dos moluscos, troca de conhecimento e ajuda na semeadura.
- Ao barqueiro **Lúcio Gualandi da Silva** pelo braço forte no leme, pela imensa troca de conhecimento sobre maricultura, e por ser solícito ajudando incondicionalmente em tudo o que foi necessário.

- Aos pesquisadores do **Laboratório de Enterobactérias da FIOCRUZ** pelo treinamento na identificação de *Vibrio*.
- Aos pesquisadores **Dra. Clarisse Odebrecht** da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, **Dra. Regine Helena Vieira** da Universidade Federal do Ceará, **Dr. Marcelo Henriques** do Instituto de Pesca de São Paulo e **Dr. Charrid Resgalla Jr.** da Universidade do Vale do Itajaí, por gentilmente terem me enviado artigos de suas autorias.
- Aos funcionários da empresa Vale do Rio Doce, **Evandro Souza, Eduardo Souto e Mariana Fernandes** pelo fornecimento dos dados da estação meteorológica da Ilha Guaíba.
- À **Profª. Valéria Soares** pela revisão dos textos em língua inglesa.

RESUMO GERAL

PEREIRA, Milena Marcela Domingues. **Avaliação bacteriológica da água do mar e dos mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) cultivados na Ilha Guaíba, Baía de Sepetiba, RJ.** 2008. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Microbiologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

A aquicultura vem se desenvolvendo tanto no Brasil quanto mundialmente como atividade alternativa à pesca extrativa. O município de Mangaratiba apresenta condições ideais ao incremento da malacocultura fluminense. Neste contexto, a presente dissertação foi elaborada a fim de avaliar as condições microbiológicas da água e de mexilhões *Perna perna* em fazenda marinha instalada na Ilha Guaíba, município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. Análises bacteriológicas foram desenvolvidas entre abril de 2007 e março de 2008 para verificar e quantificar a presença de coliformes totais e termotolerantes, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e ainda correlacionar eventuais flutuações da microbiota presente nos mexilhões e na água do cultivo a fatores abióticos como temperatura, salinidade, profundidade Secchi, radiação global e precipitação pluviométrica. Nas amostras de água, os valores para os coliformes totais variaram de $<1,80$ a $9,43 \times 10$ NMP.100mL⁻¹ e para os termotolerantes estiveram entre $< 1,8$ e $2,71 \times 10$ NMP.100mL⁻¹. As concentrações de coliformes totais e fecais nos tecidos dos mexilhões variaram de $<0,18$ a $1,61 \times 10^2$ NMP.g⁻¹ e de $<0,18$ a $3,57 \times 10$ NMP.g⁻¹, respectivamente. Não foram isolados *Salmonella* ou *Staphylococcus* coagulase positiva das amostras de água do cultivo e de mexilhões. Os resultados indicam que a qualidade bacteriológica da água utilizada para o cultivo e dos mexilhões cultivados na Ilha Guaíba estão em conformidade com a legislação brasileira. As médias anuais para os fatores ambientais temperatura e salinidade superficial da água, precipitação de chuvas, radiação solar global e profundidade Secchi foram 23,1°C, 35,2, 5,1mm, 22,91W/m² e 2,4m, respectivamente. O fator que apresenta maior correlação com a contaminação por coliformes é a precipitação, seguida pela salinidade.

Palavras-chave: Aquicultura. Moluscos bivalves. Análises bacteriológicas.

GENERAL ABSTRACT

PEREIRA, Milena Marcela Domingues. **Bacteriological monitoring of seawater and *Perna perna* mussels (Linnaeus, 1758) cultivated in Ilha Guaíba, Baía de Sepetiba, RJ.** 2008. 78p. Dissertation (Master Science in Veterinary Microbiology). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Aquaculture has been developing in Brazil as much as worldwide, representing an alternative to extractive harvesting. Mangaratiba is a municipal district of Rio de Janeiro that offers the ideal conditions to the implementation of shellfish farming in the state. In this context, the present dissertation has been designed to evaluate microbial situation of the shellfish growing waters as well as of the brown *Perna perna* mussels from marine farm located in Ilha Guaíba, municipal district of Mangaratiba. Bacteriological monitoring was carried out from April 2007 to March 2008 to verify and quantify the presence of total and fecal coliforms, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* positive coagulase and correlate fortuitous fluctuations in the microbial levels with environmental factors such as temperature, salinity, Secchi profundity, sunlight global radiation and rainfall. In seawater samples total coliform values ranged from $<1,80$ a $9,43 \times 10$ NMP.100mL⁻¹ and thermotolerant ones varied from $< 1,8$ e $2,71 \times 10$ NMP.100mL⁻¹. Total and thermotolerant coliform concentrations in mussel tissue varied from $<0,18$ a $1,61 \times 10^2$ NMP.g⁻¹ and $<0,18$ a $3,57 \times 10$ NMP.g⁻¹, respectively. Neither *Salmonella* nor *Staphylococcus* positive coagulase was detected from samples of seawater and mussels. Results have indicated that the bacteriological quality of shellfisheries' waters in Ilha Guaíba and of mussels cultivated in there has been in accordance with the Brazilian standards. The annual averages for the environmental factors as superficial water temperature and salinity, rainfall and sunlight levels, Secchi profundity were 23,1°C, 35,2, 5,1mm, 22,91W/m² and 2,4m, respectively. It has been found that the factor which presents the highest correlation with coliform contamination is rainfall followed by salinity.

Palavras-chave: Aquaculture. Shellfish. Bacteriological monitoring.

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

NMP	Número Mais Provável
Ct	Coliformes totais
CT	Coliformes termotolerantes
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VMNC	Viável Mas Não-Cultivável
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
FEEMA	Fundação Estadual de Engenharia de Meio Ambiente do Rio de Janeiro
FIPERJ	Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPP	Instituto Pereira Passos
SEAP	Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca
FAO	Food and Agriculture Organization
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPS	Organização Panamericana de Saúde
EUA	Estados Unidos da América
NSSP	National Shellfish Sanitation Program dos Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
CCE	Conselho da Comunidade Européia
AMAR	Associação de Maricultores de Mangaratiba
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I	
QUALIDADE BACTERIOLÓGICA DA ÁGUA DO MAR UTILIZADA PARA CULTIVO DE MOLUSCOS MARINHOS EM MANGARATIBA, RJ	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 A Presença de Bactérias no Oceano	6
2.2 Ação Antrópica e Qualidade do Ambiente	7
2.3 A Família Enterobacteriaceae como Indicadora de Contaminação Fecal	8
2.3.1 Coliformes totais	9
2.3.2 Coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	9
2.3.3 <i>Salmonella</i> spp.	10
2.4 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	11
2.5 Legislação sobre Áreas Próprias ao Cultivo	13
2.6 Fatores Abióticos e Sua Influência Sobre a Presença de Microrganismos em Águas Marinhas	14
2.6.1 Salinidade e precipitação de chuvas	15
2.6.2 Temperatura	16
2.6.3 Insolação e penetração da luz solar na água	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Área de Estudos	18
3.2 Amostragem	20
3.3 Coleta e Transporte das Amostras	20
3.4 Preparo das Amostras	21
3.5 Análises Bacteriológicas	22
3.5.1 Coliformes totais e coliformes termotolerantes	22
3.5.2 <i>Salmonella</i> spp.	22
3.5.3 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	22
3.6 Obtenção de Dados Abióticos	23
3.6.1 Temperatura e salinidade da água	23
3.6.2 Precipitação de chuvas	23
3.6.4 Profundidade Secchi	23
3.6.5 Radiação global	23

3.7 Análise Estatística	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Fatores Abióticos	25
4.2 Análises Bacteriológicas	26
4.2.1 Coliformes totais e termotolerantes	26
4.2.2 <i>Salmonella</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	30
5 CONCLUSÕES	31
CAPÍTULO II	
ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS EM MEXILHÕES CULTIVADOS NA ILHA GUAÍBA	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 REVISÃO DE LITERATURA	36
2.1 Biologia dos Moluscos Bivalves e da Espécie <i>Perna perna</i>	36
2.2 Sanidade de Moluscos Bivalves	37
2.3 Maricultura	39
2.4 Influência de Fatores Abióticos Sobre o Cultivo de Moluscos Bivalves	42
2.4.1 Salinidade	42
2.4.2 Temperatura	42
2.4.3 Profundidade Secchi	43
2.5 Microrganismos Veiculados por Animais Aquáticos Utilizados para Alimentação Humana: Questão de Vigilância Sanitária	43
2.6 Descontaminação dos Moluscos	44
2.7 Legislação	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Área de Estudos	47
3.2 Instalação do Cultivo Experimental	47
3.3 Amostragem	47
3.4 Coleta e Transporte das Amostras	48
3.5 Preparo das Amostras	48
3.6 Análises Bacteriológicas	48
3.6.1 Coliformes totais e coliformes termotolerantes	48
3.6.2 <i>Salmonella</i> spp.	49
3.6.3 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	49
3.7 Análise Estatística	49

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Temperatura, Salinidade e os Mexilhões	50
4.2 Coliformes Totais e Termotolerantes	50
4.3 <i>Salmonella</i> spp.	54
4.4 <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva	54
4.5 Água do Cultivo x Mexilhões	54
5 CONCLUSÕES	57
CONCLUSÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO A	70
ANEXO B	73

INTRODUÇÃO GERAL

Microrganismos estão presentes em todos os compartimentos da biosfera. O ambiente marinho é rico em vida microscópica, especialmente microalgas, bactérias, vírus, protozoários, dentre outros. As bactérias marinhas podem encontrar-se em vida livre, associadas à matéria orgânica particulada, à biota e ao sedimento. Um grande número de bactérias presentes em um corpo d'água indica abundância de nutrientes e matéria orgânica e podem ser provenientes de diversas vias, como esgoto doméstico, atividades industriais e agropecuárias. Quando estas bactérias são de origem fecal significa o aporte de efluentes que podem estar contaminados com microrganismos patogênicos de origem intestinal.

Seres vivos são sistemas abertos, onde o seu ciclo vital encontra-se em equilíbrio dinâmico com o meio em que vivem, interagindo com ele e modificando-o. Assim sendo, qualquer mudança ocorrida no ambiente acarretará transformações de ordem fisiológica ou morfológica em organismos presentes nestes ambientes em transformação.

O mexilhão *Perna perna* é uma das três espécies de moluscos bivalves mais cultivadas no estado do Rio de Janeiro. Durante sua criação, os moluscos bivalves podem contaminar-se com microrganismos patogênicos, devido ao seu hábito alimentar filtrador. Sendo assim, os mexilhões podem ser utilizados como bioindicadores de qualidade da água marinha, uma vez que a presença de microrganismos nos tecidos desses animais pode indicar as condições microbiológicas do ambiente no qual eles vivem. As pesquisas com moluscos bivalves indicam que estes animais funcionam como reservatórios de diversos patógenos para animais e seres humanos como bactérias, vírus entéricos, além de toxinas naturais, metais pesados, dentre outros.

Em locais onde se desenvolvem atividades aquícolas, ou seja, produção de organismos marinhos com fins de alimentação humana, torna-se imperativo o monitoramento de sua microbiota para assegurar o bem-estar e a sanidade do animal, bem como permitir sua comercialização. A contaminação bacteriológica das áreas de criação de moluscos bivalves compreende, juntamente com a presença de toxinas marinhas, os principais fatores de risco para a atividade mitilicultora gerando grandes perdas econômicas para o setor produtivo.

A presente dissertação visa contribuir para a demanda de informações recentes sobre a qualidade bacteriológica do cultivo de moluscos bivalves instalado na Ilha Guaíba e dos mexilhões comercializados pela Associação de Maricultores de Mangaratiba. Sendo assim, foi verificado se a água marinha utilizada para o crescimento dos animais se encontra apta ao cultivo e se os mexilhões cultivados encontram-se próprios para o consumo.

CAPÍTULO I
QUALIDADE BACTERIOLÓGICA DA ÁGUA DO MAR UTILIZADA
PARA CULTIVO DE MOLUSCOS MARINHOS EM MANGARATIBA, RJ.

RESUMO

O uso intensivo das águas que rodeiam a Ilha Guaíba em aqüicultura fez aumentar a demanda por análises que indiquem a qualidade bacteriológica do ambiente. Em um período de um ano, entre os meses de abril de 2007 a março de 2008, foram determinadas as concentrações de coliformes totais e termotolerantes pelo método do Número Mais Provável (NMP), além da realização da pesquisa por *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva. Os valores para os coliformes totais variaram de $<1,80$ a $9,43 \times 10$ NMP.100mL⁻¹ e para os termotolerantes estiveram entre $<1,8$ e $2,71 \times 10$ NMP.100mL⁻¹. Não foram isolados *Salmonella* ou *Staphylococcus* coagulase positiva das amostras de água do cultivo. Fatores ambientais como temperatura e salinidade superficial da água, precipitação de chuvas, radiação solar global e profundidade Secchi também foram aferidos. As médias anuais para tais fatores foram 23,1°C, 35,2, 5,1mm, 22,91W/m² e 2,4m, respectivamente. Os resultados indicam excelente qualidade bacteriológica, demonstrando que as águas ao redor da Ilha Guaíba encontram-se em acordo com os parâmetros nacionais de classificação de áreas para o cultivo de moluscos bivalves. O fator que apresenta maior correlação com a contaminação da água é a precipitação, seguida pela salinidade.

Palavras-chave: aqüicultura, análises bacteriológicas, água do mar.

ABSTRACT

The intensive use of Ilha Guaíba's surrounding water for aquaculture has increased the demand for monitoring analyses to indicate the bacteriological environmental quality. In a year-long study developed from April 2007 to March 2008, total and fecal coliform concentrations present in superficial waters used for shellfish farming were determined by the Most Probable Number (MPN) technique. As well as that the screening for the presence of *Salmonella* and *Staphylococcus* positive coagulase which was also carried out. Total coliform values ranged from $<1,80$ a $9,43 \times 10$ NMP.100mL⁻¹ and thermotolerant ones varied from $< 1,8$ e $2,71 \times 10$ NMP.100mL⁻¹. Neither *Salmonella* nor *Staphylococcus* positive coagulase from shellfish growing water samples was isolated. The environmental factors, as superficial water temperature and salinity, rainfall and sunlight levels, Secchi profundity, were also measured. Annual averages for these factors were 23,1°C, 35,2, 5,1mm, 22,91W/m² and 2,4m, respectively. Results have indicated an excellent bacteriological quality, proving that Ilha Guaíba's water is in accordance with the Brazilian standards for shellfish growing areas. The main abiotic factor correlated with water contamination is rainfall followed by salinity.

Key words: aquaculture, bacteriological monitoring, seawater.

1 INTRODUÇÃO

A água pode ser utilizada pelos seres vivos de inúmeras maneiras, sendo fundamental à manutenção da vida, desde sua forma mais simples até os organismos mais complexos que existem sobre o planeta Terra. Ela é veículo de nutrientes, sais minerais, participa de processos metabólicos, dentre outras incontáveis funções por ela exercidas. Porém, a continuidade de todo este dinâmico processo depende da qualidade da água presente em corpos hídricos.

O oceano é o destino final de rios, da rede de drenagem pluvial urbana e do sistema de esgoto. Estas fontes podem carrear para o mar diversos tipos de substâncias, de natureza orgânica ou inorgânica, e muitas formas de vida que continuam viáveis apesar do aumento da salinidade. Dentre elas, encontram-se microrganismos como vírus, bactérias, protozoários e algas unicelulares, dos quais muitas espécies podem ser potencialmente causadoras de patologias para animais marinhos e para o Homem.

A ocupação terrestre da zona costeira, a expansão desordenada das cidades e as atividades rurais são apenas alguns dos fatores que contribuem para o lançamento de poluição sobre corpos hídricos como rios, riachos, lagos, lagoas ou diretamente no mar. Águas provenientes de locais onde haja atividades de agricultura ou pecuária podem encontrar-se contaminadas por bactérias ou vírus patogênicos devido, dentre outras fontes, à contaminação destas com excretas animais. Sendo assim, rios e riachos podem carrear para o mar agentes etiológicos de enfermidades graves como salmoneloses. Isto implica a necessidade de um monitoramento eficiente e constante de qualidade das águas marinhas, seja qual for a sua utilização.

A água constitui uma via de transmissão de doenças gastrointestinais, seja de maneira direta através da ingestão da água ou indiretamente pela contaminação de alimentos em agricultura terrestre ou aquícola. Em ecossistemas marinhos, além de espécies de microrganismos provenientes de contaminação, como as enterobactérias *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, podemos encontrar ainda bactérias patogênicas de origem autóctone, como as do gênero *Vibrio*. A análise bacteriológica da água do mar para detectar os grupos bacterianos que indicam qualitativa e quantitativamente as condições sanitárias dessas águas é de fundamental importância, principalmente em local onde o mar é utilizado para atividades de aquíicultura. A necessidade de tais análises encontra-se, inclusive, prevista na legislação brasileira a fim de avaliar áreas próprias à criação de espécies de moluscos bivalves em ambiente marinho que serão utilizadas para consumo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Presença de Bactérias no Oceano

Os microrganismos estão naturalmente presentes no oceano fazendo parte de sua dinâmica ecológica. Muitas vezes a transparência das águas marinhas esconde uma microbiota rica em bactérias, fungos, vírus e microalgas, organismos fundamentais para a manutenção da vida marinha. Grande parte da produção primária dos oceanos é de responsabilidade de bactérias autotróficas e de microalgas, por exemplo proclorofíceas e dinoflagelados, respectivamente (NYBAKKEN, 2001).

A microbiota aquática encontra-se presente na água do mar em forma de vida livre, associada à matéria orgânica particulada ou recobrando os organismos e em seus tecidos, mas principalmente nos sedimentos (PROCTOR; SOUZA, 2001; ROZEN; BELKIN, 2001; MILLER et al., 2006).

As bactérias têm como principais características o fato de possuírem crescimento rápido, versatilidade metabólica, plasticidade genética e eficiente adaptação às modificações do ambiente marinho. Elas classificam-se atualmente em dois grupos: as arqueobactérias e as eubactérias, onde se encontram organismos com diversas estratégias fisiológicas tais como os fotoautotróficos, quimiolitotróficos, quimioorganotróficos, termófilos, mesófilos, psicrófilos, aeróbios, anaeróbios, aqueles que suportam grande pressão hidrostática, extremos de pH, de salinidade e de concentração de nutrientes (CRAPEZ, 2002). Bactérias heterotróficas possuem duas importantes funções no ambiente marinho: constituem a alça microbiana, importante elo da cadeia trófica; e atuam na reciclagem dos nutrientes (SHERR; SHERR, 2000; CRAPEZ, 2002). Alguns representantes deste grupo podem ser patogênicos tanto para organismos marinhos (REED; FRANCIS-FLOYD, 1996) quanto para seres humanos, como é o caso de *Vibrio* spp. (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Microrganismos, principalmente bactérias, são responsáveis pela degradação e mineralização da matéria orgânica produzida no ambiente, contribuindo assim para a ciclagem dos nutrientes, tornando-os novamente disponíveis à biota (CRAPEZ, 2002). Segundo Proctor e Souza (2001) as bactérias encontradas nos sedimentos apresentam preponderância no desempenho deste papel, tanto em abundância quanto em atividade, sobre as encontradas na coluna d'água. Outras pesquisas demonstram que bactérias podem ainda atuar sobre a inativação de biotoxinas em ambiente marinho (STEWART et al., 1998).

No ambiente marinho, as bactérias que podem ser retidas nos tecidos dos moluscos bivalves são provenientes de diferentes origens. Espécies autóctones são naturalmente residentes do ambiente aquático, como as pertencentes ao gênero *Vibrio*. Já as espécies alóctones estão presentes neste ambiente como resultado de contaminação externa, como aporte de efluentes domésticos, por exemplo, para enterobactérias como *Salmonella* spp e *Escherichia coli*. (HERVIO-HEAT et al., 2002; TORTORA et al., 2002; HUSS et al., 2003; CARDONHA et al., 2004).

A comissão do Codex Alimentarius elege a contaminação microbiológica das áreas de cultivo de moluscos bivalves como principal fator de perigo para a miticultura. Nos últimos 25 anos, em surtos associados ao consumo de moluscos nos EUA, 20% das doenças e 99% dos óbitos decorreram da contaminação por bactérias do gênero *Vibrio* em contraste com apenas 4% causados por contaminação de microrganismos de origem fecal (LIPP; ROSE, 1997 *apud* CROCI

et al., 2002, p. 460). Essa estatística assinala a importância de estudar-se mais a respeito a ecologia de microrganismos autóctones marinhos que não apresentam, pelo menos de maneira direta, correlação com colimetria (CROCI et al., 2002). Vieira et al. (2007a, b) sinalizam para a possível interação entre a presença de matéria orgânica de origem fecal e o aumento na multiplicação de vibrios.

2.2 Ação Antrópica e Qualidade do Ambiente

As cidades litorâneas brasileiras, sejam elas de grande ou pequeno porte, têm no crescimento populacional e desenvolvimento industrial dois dos principais motivos do aumento da degradação ambiental de corpos hídricos, comprometendo a qualidade de suas águas. Efluentes advindos de indústrias ou de locais onde haja agricultura também contribuem com metais tóxicos e agrotóxicos, respectivamente, para a poluição de corpos d'água. (LIMA JR. et al., 2002; PEREIRA et al., 2002; ABESSA, 2006; MAIA et al., 2006).

De acordo com Tortora et al. (2002), a abundância de microrganismos em um corpo d'água indica a presença de altos níveis de nutrientes e de matéria orgânica particulada. Porém, um grande número de bactérias de origem fecal em áreas marinhas pode significar o aporte de águas provenientes do sistema de esgoto ou de resíduos orgânicos biodegradáveis advindos de indústrias (ABESSA, 2006). A contaminação recente é ainda confirmada pelo fato de os coliformes não tolerarem altas salinidades por um prolongado período de tempo (GALVÃO, 2004). Em regiões costeiras, onde temos a maior concentração de adensamentos populacionais, freqüentemente sem infra-estrutura adequada de saneamento básico, encontramos na poluição por despejo de esgoto doméstico a maior fonte de problemas para a saúde pública. Esse tipo de poluição caracteriza-se pela contaminação das águas por efluentes domésticos *in natura* ou parcialmente tratados, onde podem ser encontrados microrganismos patogênicos, como por exemplo, *Escherichia coli* (LENOCH, 2003). O despejo de esgoto no mar, especialmente o não-tratado, traz consigo conseqüências sociais e econômicas resultantes do fechamento de áreas de pesca e de recreação com conseqüente perda de faturamentos com a atividade turística. A biota marinha também é comprometida em decorrência de seu efeito tóxico (AKAISHI, 2007; VIEIRA et al., 2007a).

Um dos grandes questionamentos das administrações municipais é onde se dará o destino de efluentes dos esgotos urbanos com o mínimo de prejuízo para o meio ambiente. Outro grande problema que exige atenção por parte das autoridades são as descargas clandestinas de residências, matadouros, criatórios de aves, suínos e bovinos, cujo efeito agregado contribui e muito para o aumento da poluição microbiológica dos estuários (VIEIRA et al., 2007a).

O crescente interesse pela degradação ambiental antrópica, especialmente sobre as áreas litorâneas, impulsionou a partir da década de 1960 o desenvolvimento da ecotoxicologia. Esta ciência pretende compreender os efeitos tóxicos das substâncias lançadas no ambiente sobre os organismos neles viventes. Entretanto, devido à complexidade de substâncias presentes em efluentes lançados sobre o mar, torna-se difícil definir a parcela de contribuição de cada um desses compostos em causar efeitos tóxicos sobre a biota. Bivalves filtradores, como ostras e mexilhões vêm sendo amplamente usados como bioindicadores de contaminação de corpos d'água, pois sofrem os efeitos da poluição sobre oceanos e estuários (MOLES; HALE, 2003; ABESSA, 2006; MAIA et al., 2006; AKAISHI, 2007; VIEIRA et al., 2007b).

As galerias pluviais também funcionam como fonte pontual de poluição das águas marinhas, uma vez que drenam áreas carentes de saneamento básico levando até o mar desde rejeitos sólidos até esgoto *in natura* (CARDONHA et al., 2005). O aumento da presença de

microrganismos nas águas como consequência de chuvas pesadas, pode ser originada também de sua contaminação com estrume proveniente do solo onde há criação de animais (LEE; MORGAN, 2003). O monitoramento das condições sanitárias da água do mar é muito mais freqüente em águas utilizadas regularmente para o lazer e balneabilidade (VIEIRA et al., 2002; CARDONHA et al., 2004; FEEMA, 2008b). Entretanto, para garantir o bem-estar de animais de cultivo e a segurança de seus consumidores, tornam-se imperativas as pesquisas sobre as águas no entorno de cultivos marinhos (GALVÃO, 2004).

A análise da contaminação bacteriológica das águas de locais de cultivo ou de extração e dos próprios moluscos marinhos tem sido tradicionalmente utilizada como principal indicador de características bióticas dessas áreas e da sanidade desses animais (SOLIC et al., 1999). Entretanto, o uso restrito dos dados bacteriológicos e sua relação com a presença de outros organismos potencialmente causadores de enfermidades tanto aos moluscos quanto aos seus consumidores vem sendo questionada pela comunidade científica. O monitoramento dos índices de coliformes na água onde o animal é criado é um dos pontos básicos de que deve ser assegurado para garantir a qualidade do pescado (GALVÃO, 2004; BRASIL, 2005a), porém não é o único fator a ser analisado. Lenocho (2003) discute que a presença de vírus entéricos patogênicos não tem relação direta com a contaminação bacteriológica e conclui haver necessidade da análise de partículas virais no próprio molusco para sua certificação sanitária. O consumo de moluscos bivalves, principalmente *in natura*, tem sido freqüentemente associado a surtos de doenças de origem alimentar, incluindo gastroenterites de etiologia viral e bacteriana (HUSS, 1997; JORGE et al., 2002; OLIVEIRA; VIEGAS, 2004).

2.3 A Família Enterobacteriaceae como Indicadora de Contaminação Fecal

A família Enterobacteriaceae é constituída por um grande grupo de bastonetes Gram-negativos cujo habitat natural é o trato intestinal de humanos e animais endotérmicos, mas podem também sobreviver no solo, na água, em vegetais, dentre outros. Seus membros são anaeróbios facultativos, fermentam uma ampla variedade de carboidratos e possuem uma complexa estrutura antigênica. De maneira geral, as enterobactérias fermentam a glicose, são citocromo-oxidase negativas e capazes de reduzir o nitrato a nitrito, características muito utilizadas em sua metodologia de identificação (JAY, 1978; FRANCO; LANDGRAF, 2002; WINN et al., 2008).

O número de gêneros e espécies desta família teve um acelerado aumento, principalmente depois da aplicação de novas tecnologias de identificação com a participação da engenharia genética. O número de espécies, que em 1972 era de 26 distribuídas em 11 gêneros, chega hoje a 139 em 31 gêneros descritos. A taxonomia de Enterobacteriaceae é bastante confusa. Atualmente, alguns autores defendem a divisão desta família em sete tribos a fim de facilitar o diagnóstico de grupos que possuem características metabólicas semelhantes. A classificação atual da família é a seguinte:

Domínio Bacteria
 Filo Proteobacteria
 Classe γ -Proteobacteria
 Ordem Enterobacteriales
 Família Enterobacteriaceae (WINN et al., 2008)

Os membros desta família podem ser incriminados como causadores de uma série de doenças infecciosas. Tradicionalmente, as síndromes diarréicas e disentéricas eram relacionadas a espécies de *Salmonella* e *Shigella*; os casos clássicos de pneumonia eram causados por *Klebsiella*

pneumoniae e *Escherichia coli* e espécies de *Proteus*, *Klebsiella* e *Enterobacter* foram isolados de feridas traumáticas ou inclusões abdominais após cirurgias do trato gastrointestinal (WINN et al., 2008).

2.3.1 Coliformes totais

Os chamados coliformes totais (Ct) fazem parte de um grupo de bacilos não formadores de esporos e que pertencem aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. São capazes de fermentar a lactose com produção de gás quando incubados a 35-37°C por 48 horas (JAY, 1978; FRANCO; LANDGRAF, 2002; VIEIRA et al., 2003; WINN et al., 2008).

Denominam-se microrganismos indicadores aqueles capazes de ser utilizados na avaliação microbiológica em alimentos, da qualidade sanitária e ambiental da água, dentre outros. O grupo coliforme é o mais frequentemente utilizado como indicador de poluição fecal. Estes podem estar intimamente relacionados à presença de agentes etiológicos de doenças de natureza bacteriana, como *Salmonella* spp., viral ou parasitária. Apesar de os coliformes totais serem largamente utilizados como indicadores da qualidade microbiológica de alimentos e água, sua utilização com esta função é atualmente muito questionada. A presença de coliformes totais não indica, necessariamente, contaminação fecal ou ocorrência de patógenos. Isso se deve ao fato de que representantes de três dos quatro gêneros deste grupo, exceto *Escherichia*, poderem também ser encontrados no solo ou serem mais resistentes do que certas bactérias patogênicas de origem intestinal. Contudo, quando membros da família Enterobacteriaceae estão presentes em grandes quantidades em alimentos frescos de origem animal, é indicativo forte da sua manipulação ou armazenamento inadequados em condições não-higiênicas (FRANCO; LANDGRAF, 2002; VIEIRA et al., 2003; VIEIRA, 2004; GALVÃO, 2004; BARROS et al., 2005; FAO, 2007; VIEIRA et al., 2007a).

2.3.2 Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

Os coliformes que continuam fermentando a lactose com produção de gás a temperaturas de 44-45,5°C são denominados coliformes termotolerantes ou fecais (CT). A presença de coliformes termotolerantes ou de *E. coli* na água pode ser mais seguramente associada à contaminação de origem fecal e à indicação da presença de patógenos (BARROS et al., 2005). De uma maneira geral, os coliformes podem resistir em água do mar desde poucas horas até alguns poucos dias, sob condições favoráveis de temperatura e radiação solar (FUJIOCA et al., 1981; GABUTTI et al., 2000; CHANDRAN; HATHA, 2005). O pH ótimo de sobrevivência de coliformes fecais em água do mar varia entre 6 e 7 (SOLIC; KRSTULOVIC, 1992).

Acredita-se que cerca de 90% dos coliformes termotolerantes enumerados pelos métodos tradicionais correspondam a cepas de *E. coli* (CCE, 1991; FRANCO; LANDGRAF, 2002; PINHEIRO JR., et al., 2002). Dos 151 cepas de coliformes totais isoladas a partir de ostras, 76% eram de *E. coli*, 17% de *Enterobacter* spp., 4% de *Citrobacter freundii* e 3% de *Klebsiella* spp. (BARROS et al., 2005).

A bactéria *Escherichia coli* vem sendo utilizada há mais de cem anos como um indicador de contaminação de origem fecal. Por se tratar de um organismo natural da microbiota digestiva de animais endotérmicos, desempenhando papel importante na fisiologia intestinal, é liberada para o ambiente juntamente com suas fezes (JAY, 1978). É considerada como um microrganismo exclusivamente de origem fecal. A ausência deste microrganismo em análises bacteriológicas não implica, necessariamente, a ausência de patógenos. Certas cepas de *Salmonella*, por exemplo,

podem ser mais resistentes do que *E. coli* sob determinadas condições (GABUTTI et al., 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2002; VIEIRA et al., 2003; CHANDRAN; HATHA, 2005; VIEIRA et al., 2007a). *S. Typhimurium* foi menos resistente que *E. coli* em experimento conduzido em águas estuarinas por Chandran e Hatha (2005). O grupo dos coliformes fecais mostrou-se mais sensível a altas salinidades do que *Salmonella*, estreptococos fecais e estafilococos, sob temperaturas de 22±2°C (GABUTTI et al., 2000). Tal fato justifica a necessidade de uma análise mais criteriosa das amostras, incluindo a utilização de meios de cultura próprios para o desenvolvimento dos principais agentes causadores de enfermidades veiculados por alimentos (BRASIL, 2001; BRASIL, 2003).

Escherichia coli é geralmente inofensiva, mas certas cepas são patogênicas (Quadro 1.1), provocando doenças do tubo digestivo que podem ser fatais, dependendo da patogenicidade do microrganismo, do grau de exposição e da susceptibilidade do paciente. As cepas patogênicas apresentam fímbrias especializadas em se ligar a células do intestino. As *E. coli* também são capazes de produzir toxinas. (THATCHER; CLARK, 1968; HUSS, 1997; TORTORA et al., 2002; BARROS et al., 2005).

ESTIRPE	SIGLA UTILIZADA
<i>E. coli</i> enteropatogênica	EPEC
<i>E. coli</i> enterotóxica	ETEC
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	EIEC
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	EHEC / VTEC ou
<i>E. coli</i> produtora de verotoxina	<i>E. coli</i> O157:H7

Quadro 1.1: Cepas patogênicas de *E. coli* (Adaptado de HUSS, 1997).

A cepa reconhecidamente mais virulenta é a *E. coli* O157:H7, habitante ocasional de intestinos animais. Em humanos, especialmente crianças, a toxina desta cepa pode causar complicações quando atinge os rins (síndrome hemolítico-urêmica). Estima-se que apesar de mal-diagnosticada, essa síndrome seja responsável por cerca de 200 a 500 casos de óbito por ano nos EUA. Para a identificação de *E. coli* O157:H7 utiliza-se como ferramenta o fato de ela não conseguir fermentar o sorbitol, diferenciando-a de outras cepas. A medida profilática é o cozimento das carnes, respeitando-se sempre o binômio tempo x temperatura de cozimento adequado (TORTORA et al., 2002).

A presença de *E. coli* em ambiente marinho determina risco à saúde pública não apenas por fatores relacionados a sua própria patogenicidade, mas também por ser veículo de genes de resistência a antimicrobianos neste meio e terem a capacidade de transmiti-los a outros microrganismos patogênicos (BARROS et al., 2005).

2.3.3 *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* são membros da família Enterobacteriaceae, caracterizando-se por serem bacilos não formadores de esporos, Gram-negativos e anaeróbios facultativos. Apresentam ampla ocorrência no trato intestinal de diversos animais, como aves domésticas, suínos e pescado, além de estarem presentes em ambientes poluídos com excrementos animais e humanos. Dentre as salmonelas, existem diversos graus de patogenicidade, entretanto todas são consideradas patogênicas, causando salmonelose ou

gastroenterite por *Salmonella* tanto em animais quanto em humanos. Podem ainda produzir toxinas (HUSS, 1997; TORTORA et al., 2002).

Produtos de origem animal como carnes, especialmente de frango, apresentam-se como principais fontes de disseminação das salmonelas (CARVALHO; CORTEZ, 2005). Contudo, a carne de pescado, incluindo moluscos como mexilhões, também pode funcionar como uma via de contaminação (HENRIQUES et al., 2000; HUSS, 2003; FURLAN, 2004). Uma outra forma de disseminação pouco conhecida é através de répteis de estimação, uma vez que até 90% desses animais são portadores de bactérias do gênero *Salmonella* (TORTORA et al., 2002).

Em humanos, a rota de invasão das salmonelas inicia-se na mucosa intestinal, onde se multiplicam causando inflamação. Pode ocorrer a penetração dos sistemas linfático e sanguíneo por sua passagem através da mucosa intestinal, disseminando-se assim para muitos outros órgãos. Seus sintomas são febre moderada, náuseas, vômitos, dores abdominais, cólicas e diarreia e começam a aparecer geralmente 6 a 18 horas após o consumo o alimento contaminado (THATCHER; CLARK, 1968). No Brasil, as salmoneloses apresentam grande relevância entre as doenças microbianas veiculadas por animais, havendo registro de surtos nas diversas regiões do país, inclusive com relatos de casos fatais (OPS, 2007).

A profilaxia para qualquer patologia é primariamente a informação. A prevenção específica da contaminação por salmonelas depende de saneamento básico, refrigeração correta de produtos de origem animal utilizados na alimentação tanto de seres humanos como de outros animais e cozimento do alimento em uma temperatura interna de, no mínimo, 60°C (TORTORA, et al., 2002).

A principal via de transmissão de *Salmonella* para animais e humanos vem sendo através de água ou alimentos contaminados. A rota mais comum de infecção de hospedeiros é a oral-fecal, entretanto as bactérias podem permanecer por longo período de tempo no ambiente, favorecendo a sua disseminação. A exposição do microrganismo às condições ambientais como a luz solar pode ser um método eficiente de descontaminação. A viabilidade de *Salmonella* em águas marinhas e sob influência da luz solar vem sendo bastante estudada (CARO et al., 1999; CHANDRAN; HATHA, 2005). Estudos *in vitro* verificaram que em um período de apenas 24h ocorre uma redução da ordem de 3-5 log₁₀ no número de células de *Salmonella* presentes em superfícies e expostas à radiação UV-A e UV-B (NYELETI et al., 2004). As salmonelas permanecem com suas células viáveis por até 56 e 80 horas *in vitro* em salinidades de 35 e 27, respectivamente (GABUTTI et al., 2000).

A presença de bactérias do gênero *Salmonella* é detectada através de análises dos alimentos, das fezes ou dos tecidos corpóreos dos animais e, no caso do ambiente aquático, da água, uma vez que esta também pode funcionar como veículo de contaminação do pescado (THATCHER; CLARK, 1968). O isolamento do gênero requer utilização de meios especializados, seletivo e diferencial, com o auxílio de testes bioquímicos que geralmente apresentam resultados em cerca de 5 dias (JAY, 1978; FRANCO; LANDGRAF, 2002; VIEIRA et al., 2004). Recentemente outros métodos mais sensíveis foram desenvolvidos para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos utilizando-se técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (BEJ et al., 1994; WINN et al., 2008).

2.4 *Staphylococcus coagulase positiva*

Os estafilococos são cocos Gram-positivos, imóveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, com exceção de *Staphylococcus aureus* subesp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus* que crescem em condições anaeróbias. A maioria das espécies é catalase-

positiva, porém existem cepas raras de estafilococos catalase-negativos, como patógenos infecciosos pertencentes às espécies *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. Sob microscopia ótica, aparecem predominantemente em grupamentos que se assemelham a cachos de uvas, podendo também ocorrer na forma de células isoladas, pares, tétrades e cadeias curtas. Quanto à sua taxonomia atual, inclusive baseada em técnicas de biologia molecular, o gênero *Staphylococcus* é classificado da seguinte forma:

Domínio Bacteria

Filo Firmicutes

Classe Bacilli

Ordem Bacillales

Família Staphylococcaceae

Gênero *Staphylococcus* (WINN et al., 2008)

Os estafilococos apresentam ampla distribuição ambiental, e esta ubiquidade faz com que sejam encontrados na água, ar, poeira, leite, esgotos, solo, nariz, garganta e pele de animais, inclusive do homem. É um organismo mesófilo que encontra sua temperatura ótima de proliferação em torno dos 37°C, mas pode produzir toxinas se a temperatura ambiente estiver acima dos 15°C (HUSS, 1997).

Depois das bactérias da família Enterobacteriaceae, os cocos Gram-positivos são os microrganismos mais isolados de amostras clínicas. Bactérias Gram-positivas têm capacidade de causar infecções e produzir toxinas que agem em locais distantes daqueles em que o microrganismo se encontra. Dentre as doenças causadas por estafilococos, as infecções de pele, olhos e ouvido são mais freqüentemente relatadas do que as que acometem o trato gastrointestinal com toxinas. As toxinas estafilocócicas são implicadas em intoxicações alimentares, na síndrome da pele escaldada e na síndrome do choque tóxico. Muitas espécies de estafilococos são reconhecidas como patógenos veterinários e podem colonizar humanos que tenham contatos freqüentes ou estreitos com animais (GABUTTI et al., 2000; TORTORA et al., 2002; WINN et al., 2008).

Alguns dos estafilococos patogênicos, tanto para animais quanto para humanos, são geralmente capazes de produzir a enzima coagulase, cuja função de coagular o plasma sanguíneo é utilizada em laboratório, juntamente com outros testes bioquímicos, na identificação presuntiva dos tipos virulentos da bactéria. Entretanto, uma das maneiras de se confirmar a patogenicidade do microrganismo é a realização de análises que detectem a presença de toxinas na amostra (STAMFORD et al., 2006) ou de genes associados a caracteres de virulência (WINN et al., 2008).

A produção da coagulase sendo a característica metabólica mais confiável para se proceder a identificação laboratorial de *S. aureus*, visto que são raras suas cepas coagulase-negativas. Sendo assim, o teste de coagulase em tubos continua sendo o método de referência para a identificação de *S. aureus*, inclusive sendo estabelecido como critério classificatório da segurança de alimentos pela legislação brasileira. Neste teste a coagulase secretada extracelularmente pela bactéria reage com uma substância do plasma de coelho colocado num tubo de ensaio, o fator de reação coagulase – CRF, formando um complexo que, ao reagir com o fibrinogênio transforma-o em fibrina produzindo assim o coágulo. A leitura deve ser realizada depois de 6 horas de incubação a 36±1°C e, nos casos desta ser negativa, os tubos devem ser mantidos à temperatura ambiente para efetuar-se uma nova leitura depois de 18 a 24 horas.

Algumas cepas podem produzir fibrinolisinase que desfaz o coágulo depois de prolongada incubação a 35°C (BRASIL, 2001; BRASIL, 2003; VIEIRA, 2004; WINN et al., 2008).

O teste da catalase é rotineiramente utilizado para diferenciar estafilococos ou micrococcos de estreptococos, enterococos ou outras bactérias semelhantes a estreptococos. Em geral, o teste é efetuado com peróxido de hidrogênio a 3% em lâmina, onde a produção imediata de bolhas indica a transformação do H₂O₂ em água e gás oxigênio. É indicado que se faça este teste antes do teste de coagulase (BRASIL, 2003; WINN et al., 2008).

Staphylococcus aureus sobrevive bem em ambiente aquático, inclusive com salinidades de 27 e 35. De uma maneira geral, os estafilococos são halofílicos e, devido a sua maior estabilidade em águas com altas salinidades do que outras bactérias, seu uso como um novo parâmetro de qualidade da água do mar vem sendo bastante indicado (GABUTTI et al., 2000). A presença de elevados números de *S. aureus* pode indicar falha no saneamento, além de risco potencial à saúde pública. Organismos marinhos como moluscos bivalves podem estar contaminados por *Staphylococcus aureus* provenientes do ambiente. (FRANCO; LANDGRAF, 2002; GALVÃO, J. et al., 2006).

A produção de exotoxinas termorresistentes por algumas cepas de *S. aureus* durante seu crescimento em alimentos contaminados é uma das causas mais comuns de surtos de intoxicações de origem alimentar. A toxina do tipo sorológico A, que resiste a até 30 minutos de fervura, é a mais freqüentemente relacionada aos casos de intoxicação alimentar estafilocócica. Esta causa, dentro de duas a quatro horas após o consumo de produtos contaminados, os seguintes sintomas: vômito, cólicas abdominais, náuseas e diarreia. Esses sintomas duram, em geral, cerca de 24 horas. (HUSS, 1997; TORTORA et al., 2002; VIEIRA, 2004; FAO, 2007).

Os estafilococos caracterizam-se por serem fracos competidores, ou seja, não crescem bem na presença de outros microrganismos. Sendo assim, pode ocorrer proliferação rápida e conseqüente produção de toxina no pescado pré-cozido devido à eliminação de microrganismos competidores pelo processo de cocção (HUSS, 1997; TORTORA et al., 2002; VIEIRA, 2004; GALVÃO, J. et al., 2006). No caso do pescado, o controle da proliferação de estafilococos se dá através do controle da temperatura e de boas condições sanitárias na manipulação do produto desde sua saída do mar até a chegada ao consumidor. É necessária atenção especial ao pescado pré-cozido, uma vez que esse produto possui riscos de contaminação secundária e proliferação rápida destes microrganismos com produção de enterotoxinas (VIEIRA, 2004; SALÁN et al., 2008).

2.5 Legislação sobre Áreas Próprias ao Cultivo

No que se refere às águas marinhas próprias ao cultivo de moluscos bivalves no Brasil, os atuais padrões químicos e microbiológicos necessários à regulamentação das áreas de cultivo estão dispostos na Resolução CONAMA nº. 357 de 17 de março de 2005. Esta Resolução descreve os padrões bacteriológicos regulamentares ao desenvolvimento da atividade e estabelece que somente é permitido o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana em áreas cuja média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes de, no mínimo 15 amostras do mesmo local, não exceda 43/ 100mL, além de não ter mais de 10% das amostras com contagens acima de 88 coliformes por 100 mililitros de água do cultivo. Além dos padrões colimétricos, esta resolução dispõe sobre os limites aceitáveis de uma série de compostos químicos, orgânicos e inorgânicos, que devem ser respeitados se a área for utilizada para o cultivo de organismos com fim de consumo humano (BRASIL, 2005a). A resolução anterior, do ano de 1986 e atualmente substituída pela de 2005, só estipulava os limites para animais que

fossem ingeridos crus. Tais limites eram de até 14 coliformes fecais em 100 mililitros de água do cultivo, com não mais que 10% das amostras excedendo 43 CT/ 100mL (BRASIL, 1986).

As diretrizes estabelecidas internacionalmente pela Comissão do Codex Alimentarius (FAO; OMS, 2004) são bastante confusas no que diz respeito à utilização de coliformes como indicadores da presença de microrganismos patogênicos. Ao mesmo tempo em que afirmam não haver associação da presença de *Vibrio* e vírus patogênicos com as bactérias indicadoras de contaminação fecal, admitem o uso de coliformes fecais ou *E. coli* e até mesmo de coliformes totais como indicadores da presença de vírus entéricos patogênicos e de alguns patógenos bacterianos presentes naturalmente no ambiente. No Brasil, a contagem de coliformes totais não apresenta caráter determinante para a classificação das águas apropriadas ao cultivo de moluscos filtradores (BRASIL, 2005a). Sendo assim, a legislação brasileira de classificação bacteriológica das zonas de criação de moluscos em aptas ou não é ainda mais específica do que as recomendações do Codex Alimentarius.

Ainda segundo o Codex Alimentarius (2004), a identificação, classificação e vigilância das águas utilizadas para criação de animais devem ser tarefas das autoridades competentes em cooperação com pescadores e produtores primários. Além disso, o órgão oficial competente deverá avaliar os dados e classificar as zonas de criação de acordo com as normas e critérios oficiais, anunciando-os imediatamente ao setor produtivo. Entretanto, as autoridades brasileiras transferiram legalmente, a partir de 1995, esta responsabilidade para os aqüicultores, assim como a avaliação da qualidade sanitária dos moluscos que comercializam (BARARDI et al., 2006). A fim de não contrariar as diretrizes internacionais, o Brasil precisa reavaliar com bom-senso a que órgão oficial caberá tal tarefa, uma vez que os produtores nacionais não dispõem das condições básicas de recursos técnicos e financeiros para identificar, classificar e monitorar as áreas próprias ao cultivo dos moluscos.

Os níveis aceitáveis e os grupos bacterianos utilizados na classificação das águas marinhas utilizadas em aqüicultura dependem de cada país, mas em linhas gerais seguem as disposições da FAO e da OMS. Os EUA sempre estiveram na vanguarda do assunto e desde a década de 1920 discutiam sobre o Programa Nacional de Sanidade de Moluscos que, posteriormente, serviu como ponto de referência para outros países. A partir deste programa, as normas para áreas onde os moluscos poderiam ser criados foram estabelecidas, sendo classificadas de acordo com a contaminação por coliformes, mas atualmente citam também análises de toxinas marinhas e espécies patogênicas de *Vibrio* (RICHARDS, 2003).

Na Nova Zelândia, um dos principais produtores de mexilhão do mundo, eram consideradas aprovadas as áreas que possuem índices médios de coliformes fecais abaixo de 14 NMP/100ml e quando não mais que 10% das amostras ultrapassassem o valor de 43NMP/100ml quando do uso de séries de 5 tubos da técnica do Número Mais Provável (BROCK et al., 1985). Sendo assim, a Nova Zelândia possui limites mais exigentes do que os praticados atualmente no Brasil.

2.6 Fatores Abióticos e Sua Influência Sobre a Presença de Microrganismos em Águas Marinhas

A partir do extenso uso de grupos bacterianos como indicadores de qualidade das águas marinhas, tornou-se necessária a determinação do período de sobrevivência das bactérias na água do mar e os principais fatores ambientais que influenciam neste tempo. Muitos são os fatores de inativação de bactérias no mar, eles podem ser abióticos como altas salinidades, presença de metais tóxicos, radiação ultravioleta, temperatura; ou bióticos como competição por nutrientes,

predatismo por protozoários, lise celular induzida por bacteriófagos (FUJIOCA et al., 1981; ROSEN; BELKIN, 2001; CASTRO, 2003; CHANDRAN; HATHA, 2005). A agregação e adsorção à matéria orgânica particulada podem proteger as bactérias de muitos destes fatores letais (VIEIRA et al., 2007a). Sendo assim, as características ambientais podem afetar significativamente as quantidades de bactérias presentes nas águas marinhas, inclusive onde são desenvolvidas atividades de cultivo ou extrativismo de moluscos bivalves. Tais fatores deveriam ser sempre levados em consideração quando da escolha tanto de locais de criação de animais marinhos quanto de descarga de esgoto no mar.

Uma vez que entram em contato com o ambiente marinho e com todas as influências inerentes a ele, a capacidade de formar colônias em meios sólidos parece ser a primeira habilidade perdida pelas enterobactérias. Desta forma, entram no estado conhecido como Viável Mas Não-Cultivável – VMNC, no qual as células permanecem metabolicamente ativas, mas são incapazes de se reproduzir em meios de cultura onde crescem normalmente. A interpretação dos estudos sobre a viabilidade de bactérias na água do mar depende da metodologia adotada, uma vez que as células que entram no estado VMNC não são detectáveis pelos métodos de cultura (ROSEN; BELKIN, 2001). É necessário que se destaque que o monitoramento da poluição marinha também é normalmente realizado através de técnicas tradicionais de cultura (PINHEIRO JR. et al., 2002; BRASIL, 2005a; VIEIRA et al., 2002, 2003, 2007a, b; CARDONHA et al., 2004, 2005; CASTRO et al., 2006).

2.6.1 Salinidade e precipitação de chuvas

De uma maneira geral, a salinidade da água do mar diz respeito à concentração de sais dissolvidos nela. A influência de fatores ambientais sobre esta concentração depende das características oceanográficas de cada região, podendo ser alterada, por exemplo, por taxa de evaporação da água do mar induzida por forte insolação, por degelo (em regiões polares), por precipitação de chuvas em regiões litorâneas e, no caso dos estuários, por maior influência de águas vindas de mar aberto na maré alta e do continente durante a maré baixa (NYBAKKEN, 2001).

Na região costeira, a salinidade é fortemente influenciada por fatores meteorológicos como recebimento de águas de chuva vindas do continente. O aporte da água doce da chuva em águas marinhas litorâneas faz com que os valores médios de salinidade verificados no mar após dias chuvosos sejam menores do que em períodos sem precipitação pluviométrica. Sendo assim, a salinidade apresenta correlação com dados de precipitação verificados em dias anteriores à coleta das amostras (BROCK et al., 1985; LEE; MORGAN, 2003).

A incidência de chuvas sobre as cidades litorâneas, especialmente nas que apresentam saneamento básico deficiente ou onde são desenvolvidas atividades de pecuária, acarreta o aumento da presença de bactérias alóctones na água do mar em períodos seguintes à precipitação. A ocorrência de chuvas fortes e por prolongado período de tempo vem agravar tal cenário. Logo, as galerias de águas pluviais ou o escoamento direto da água a partir de encostas tornam-se duas das principais fontes de microrganismos de origem externa detectados em águas marinhas. A correlação entre índices pluviométricos e a presença de coliformes no mar foi discutida por diversos outros autores como BROCK et al (1985), VIEIRA et al. (2002, 2003), CARDONHA et al. (2004, 2005), GALVÃO (2004), dentre outros.

A salinidade da água, principalmente quando potencializada pela radiação solar, parece ser um dos fatores que contribuem para a mortalidade de bactérias nas águas marinhas. Na verdade, a capacidade de sobrevivência em altas salinidades vai ser definida pelo poder de cada

microrganismos em resistir ao choque osmótico e restaurar a homeostase celular quando entram em contato com a água salgada (SOLIC; KRSTULOVIC, 1992; ROSEN; BELKIN, 2001). Em estudo conduzido em microcosmos de água do mar com salinidades de 27 e 35 e sem a interferência de temperatura, luz, competição por nutrientes, dentre outros fatores letais para bactérias, *Staphylococcus aureus* mostrou-se mais resistente à alta salinidade do que *Salmonella* e coliformes fecais (GABUTTI et al., 2000).

2.6.2 Temperatura

A temperatura de sobrevivência de bactérias na água do mar está relacionada às características intrínsecas à biologia de cada espécie. Desta forma, algumas espécies têm maior tolerância do que outras às variações de temperatura ocorridas em ambiente aquático. No caso das enterobactérias, elas atingem o ótimo de seu crescimento quando a temperatura está em torno dos 37°C, mas isso não significa que não possam sobreviver em outras temperaturas. *E. coli*, por exemplo, apresenta maior estabilidade sob temperaturas mais elevadas (ROZEN; BELKIN, 2001).

Em estudo sobre a viabilidade de células bacterianas em água estuarina com sua característica biótica mantida, *S. Typhimurium* mostrou manter viabilidade celular por um período de tempo mais longo sob temperaturas de 20°C do que a 30°C. Por conseguinte, esta parece ser uma bactéria cuja sobrevivência é mais favorecida em menores temperaturas do que *E. coli* (CHANDRAN; HATHA, 2005).

2.6.3 Insolação e penetração da luz solar na água

Evidências de que a luz solar constitui o principal fator ambiental responsável pela mortalidade de bactérias no ambiente marinho são conhecidas desde a década de 1960 (FUJIOKA et al., 1981). Mais recentemente, a obtenção de informações sobre a ação da luz na viabilidade de bactérias tem sido foco de interesse de muitos autores em diversas partes do mundo, como Solic e Krstulovic (1992), Pommepuy et al. (1996), Caro et al. (1999), Rosen e Belkin (2001), Nyeleti et al. (2004), Chandran e Hatha (2005) e Castro et al. (2006). Ressalta-se que este último estudo fora conduzido no Brasil.

Nyeleti et al. (2004) verificaram que o tempo de sobrevivência de *Salmonella* spp. sobre superfícies é menor quando as mesmas são expostas à radiação semelhante à encontrada no ambiente natural de países tropicais.

A água do mar é um ambiente desfavorável à manutenção do metabolismo de bactérias entéricas, contudo representantes do grupo coliformes podem permanecer viáveis por cerca de 1 a 3 dias neste ambiente sob determinadas condições. Quando constantemente expostas à luz solar direta, o tempo de inativação destas bactérias é reduzido para 30 a 90 min (FUJIOKA et al. 1981).

Apesar da luz solar típica de dias ensolarados contribuir rapidamente para a mortalidade de coliformes, a insolação indireta verificada em dias nublados também possui efeito bactericida (FUJIOKA et al. 1981). Contudo, a resistência apresentada por *E. coli* na água do mar em dias nublados é muito maior do que em dias ensolarados (CASTRO et al., 2006). Caso a contaminação se dê durante a noite, a disseminação dos microrganismos na água provavelmente ocorrerá em maior escala até o próximo nascer do sol (FUJIOKA et al. 1981).

A penetração da luz solar em águas marinhas depende diretamente de sua transparência. Ao se chocar com as moléculas dissolvidas na água, os raios luminosos podem ser refletidos em

diversas direções, fazendo com que atinjam uma menor profundidade. A turbidez em um corpo d'água pode ser ocasionada pela presença de matéria orgânica particulada, de compostos químicos, de sedimento suspenso, dentre outros agentes (NYBAKKEN, 2001). Mesmo contribuindo para um ambiente mais rico em alimento para a biota marinha, uma maior quantidade de matéria orgânica particulada presente na água pode trazer conseqüências sérias a esse ecossistema, pois além de servir como fonte de nutrientes para o crescimento bacteriano, também reduz a inativação destas células que seria ocasionada pela ação da luz solar (FUJIOCA et al. 1981; NYELETI et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudos

A fazenda marinha utilizada no presente estudo localiza-se na Ponta da Passagem em frente à ilha Guaíba. Esta ilha encontra-se 1,6 km à frente do bairro de Engenheiro Junqueira no município de Mangaratiba e a aproximadamente 4,0 km do centro do município-sede. A região localiza-se na linha imaginária que separa as baías de Sepetiba e Ilha Grande, no litoral sul do estado do Rio de Janeiro (Figura 1.1).

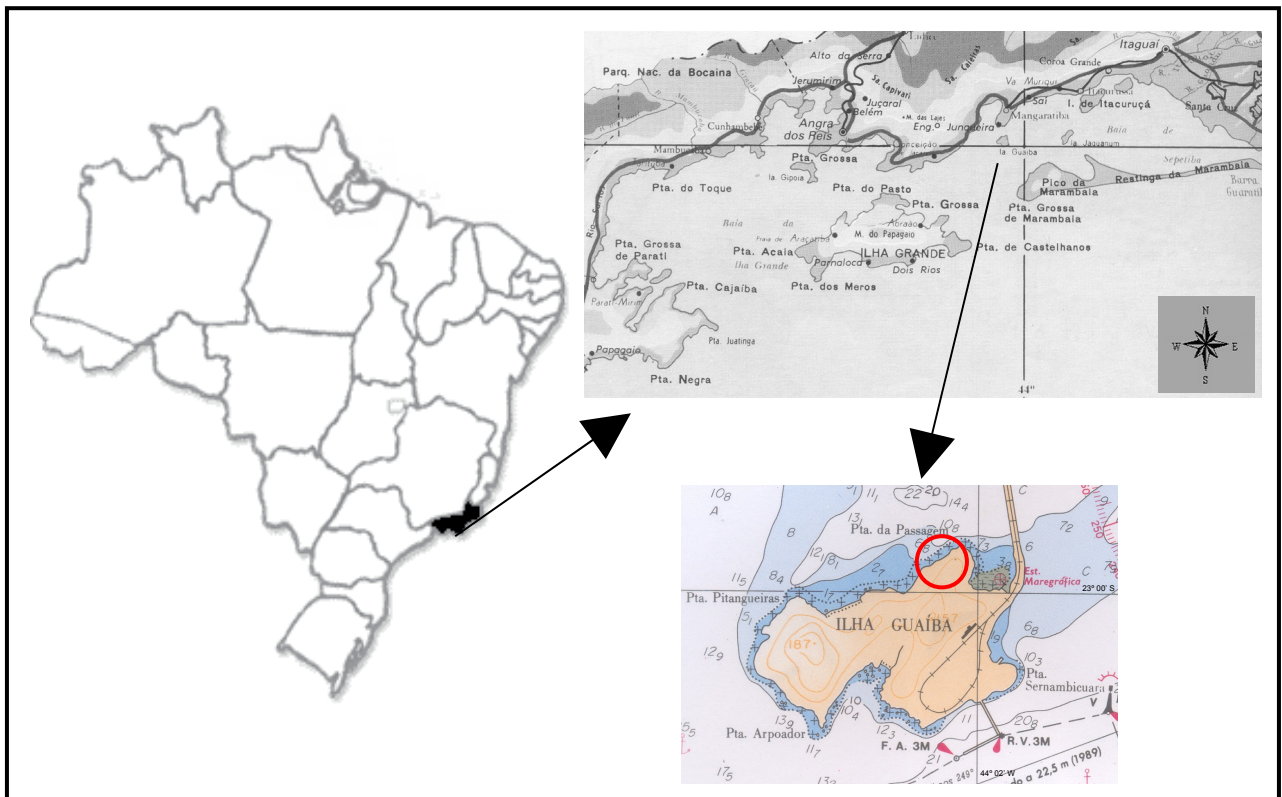


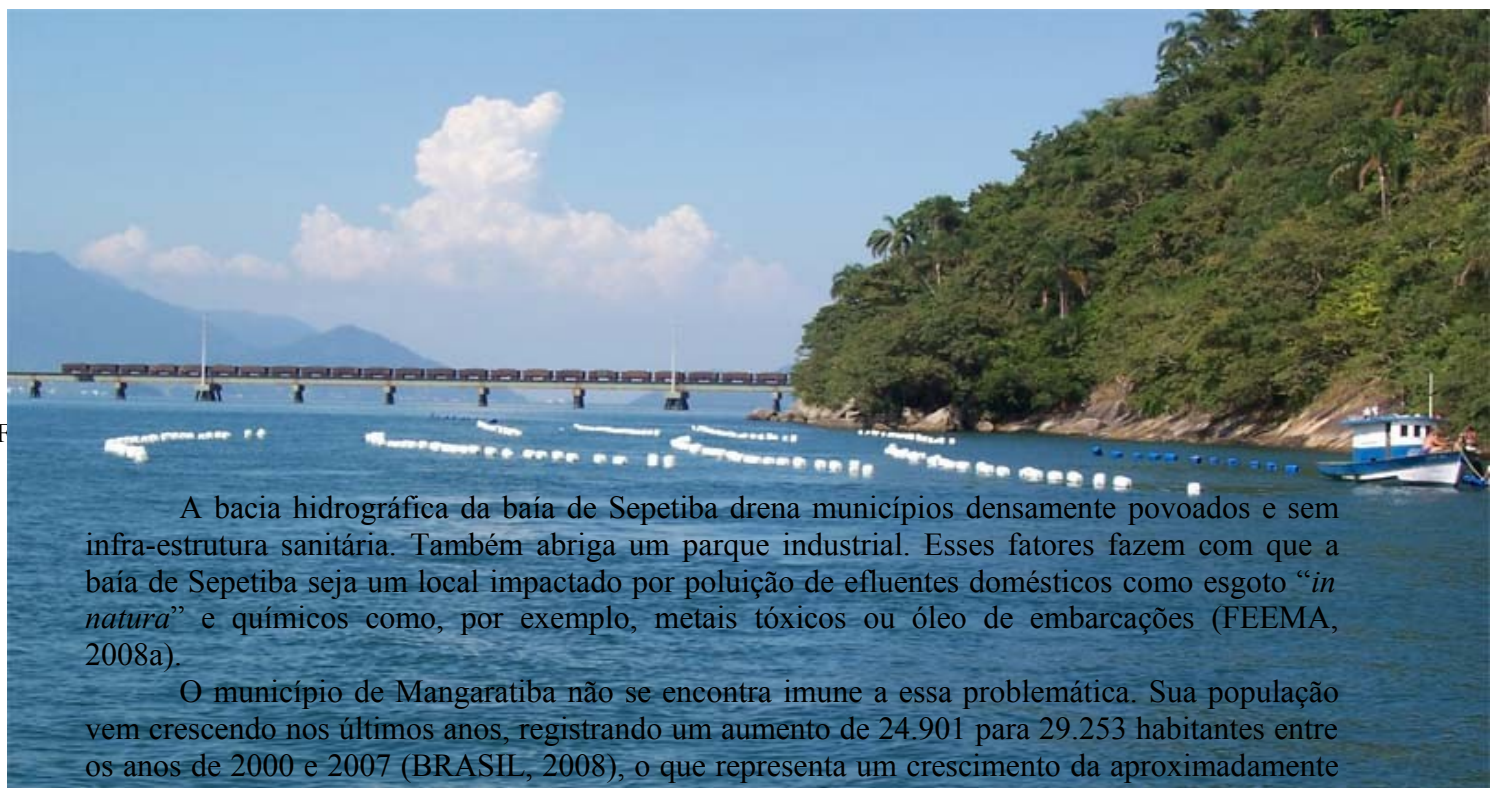
Figura 1.1 – Ilha Guaíba, município de Mangaratiba. Detalhe da carta náutica 1621 ER1, 2ª edição, 22 de março de 2004. Diretoria de Hidrografia e Navegação da Marinha do Brasil. Escala 1:5000. Assinalada com círculo o local onde foi instalado o experimento.

A fazenda marinha utilizada comercialmente pela AMAR desde o ano de 2005, disponibilizada para o presente trabalho, possui atualmente dez espinhéis (Figura 1.2) onde são cultivados mexilhões *Perna perna* e vieiras *Nodipecten nodosus*. Existe previsão expansão após a instalação de balsas que facilitarão o trabalho de manejo dos maricultores. As coordenadas geográficas da área de cultivo encontram-se dispostas no Quadro 1.2¹. O espinhel utilizado para o presente experimento localiza-se dentro da área, cujo perímetro foi demarcado pelas linhas imaginárias que ligam as quatro bóias.

¹ SOUZA, Marcos Luiz de. **Comunicação pessoal**. 2007. (Presidente da Associação de Maricultores de Mangaratiba em 2007 – AMAR).

Bóia	Latitude	Longitude
1	22°59'47''S	44°02'11''W
2	22°59'52''S	44°02'16''W
3	22°59'51''S	44°02'20''W
4	22°59'46''S	44°02'14''W

Quadro 1.2 – Posições geográficas da área de maricultura da AMAR, Mangaratiba, RJ.



A bacia hidrográfica da baía de Sepetiba drena municípios densamente povoados e sem infra-estrutura sanitária. Também abriga um parque industrial. Esses fatores fazem com que a baía de Sepetiba seja um local impactado por poluição de efluentes domésticos como esgoto “*in natura*” e químicos como, por exemplo, metais tóxicos ou óleo de embarcações (FEEMA, 2008a).

O município de Mangaratiba não se encontra imune a essa problemática. Sua população vem crescendo nos últimos anos, registrando um aumento de 24.901 para 29.253 habitantes entre os anos de 2000 e 2007 (BRASIL, 2008), o que representa um crescimento da aproximadamente 17,5% em apenas 7 anos. Além dos residentes permanentes, durante períodos de férias escolares e no verão, ocorre adensamento populacional em áreas turísticas, quando os problemas de ordem sanitária se agravam (IPP, 2001). O saneamento básico é deficiente ou até mesmo inexistente. As moradias geralmente são equipadas com fossas, filtros e sumidouros, porém algumas fazem uso de ligações clandestinas onde o esgoto doméstico escoar diretamente para o mar². A ilha Guaíba situa-se a aproximadamente 1,6km do continente. Esta também é a distância das moradias mais próximas, localizadas no bairro de Engenheiro Junqueira, e que poderiam influenciar mais ativamente a contaminação microbiológica das águas que rodeiam a ilha.

Em relação ao aporte de carga orgânica – DBO, que se reflete diretamente na qualidade de suas águas, a baía de Sepetiba foi dividida em três setores: do litoral de Guaratiba até a Ilha da Madeira; entre as costas oeste da Ilha da Madeira e de Jaguanum e a partir da costa oeste de Jaguanum. A maioria dos rios que chegam a esta baía deságuam nos setores I e II, onde também se localizam os manguezais. Os setores II e III recebem apenas 1,6 % da carga orgânica total diária

² SOUZA, Marcos Luiz de. **Comunicação pessoal**. 2008. (Presidente da Associação de Maricultores de Mangaratiba em 2007 – AMAR).

lançada nesta baía (SEMA, 1998). O cultivo da Ilha Guaíba está localizado no setor III e sua boa qualidade de água é principalmente devido à intensa troca com o Oceano Atlântico, favorecendo a dispersão de contaminantes. É importante ainda salientar que os manguezais mais próximos da Ilha Guaíba ficam em Itacuruçá e na Ilha de Itacuruçá, ou seja, a aproximadamente 15km de distância (SCOTT, 1998).

Contudo, há necessidade de pesquisas bacteriológicas na Baía de Sepetiba, uma vez que os dados sobre a qualidade microbiológica da região ainda são escassos. Apesar da FEEMA (2008b) realizar o monitoramento da qualidade bacteriológica das águas de cerca de 120 praias, distribuídas por 15 municípios do Rio de Janeiro, nenhuma delas está localizada no litoral sul do estado. Além disso, a maioria das pesquisas sobre a poluição da Baía de Sepetiba é realizada com metais tóxicos, por serem contaminantes de inegável relevância para a região (SCOTT, 1998; LIMA JR., 2002).

Relatos históricos do século XVIII já indicavam a importância da pesca da Baía de Sepetiba para economia fluminense. O talento natural da região para a atividade era tanto que no ano de 1941 foi inaugurada a Escola de Pesca Darcy Vargas na Ilha da Marambaia. Desde o ano de 1971 a escola é extinta e os pescadores da região não contam mais com uma formação técnica. Acredita-se que o aumento da competição pelos recursos pesqueiros seja um dos principais fatores que vêm impulsionando pescadores a mudar seu foco de atuação profissional, inclusive para a maricultura (SCOTT, 1998).

3.2 Amostragem

A cada mês no período entre abril de 2007 e março de 2008 foram coletadas 2 amostras de água marinha ao redor do cultivo. Sendo assim, foram analisadas um total de 20 amostras. Nos meses de junho e outubro de 2007 não foi possível a realização das análises por impossibilidades técnicas no laboratório.

3.3 Coleta e Transporte das Amostras

As coletas eram realizadas com o auxílio de traineira (Figura 1.3) financiada pela Prefeitura Municipal de Mangaratiba, de acordo com Termo de Compromisso assumido entre a Secretaria Municipal de Meio Ambiente, Aqüicultura e Pesca deste município e o Instituto de Tecnologia da UFRRJ. O trajeto de barco posterior à coleta foi realizado a partir da Ilha Guaíba até a Praia de Junqueira, Mangaratiba (RJ), sendo este percurso de aproximadamente 1,6 km.



Figura 1.3 – Traineira e bote financiados pela Prefeitura de Mangaratiba para realização do experimento.

Para a coleta da água do cultivo foram utilizados frascos de vidro com capacidade para 500ml, os quais foram previamente esterilizados em autoclave. No presente estudo, não houve necessidade do uso de frascos cor âmbar para diminuir a incidência de luz sobre a amostra porque estas eram coletadas e imediatamente acondicionadas dentro de caixa isotérmica de isopor, protegendo-as da ação da luz solar (POMMEPUY et al., 1996; CASTRO et al, 2006).

As amostras foram transportadas no interior da caixa isotérmica até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para processamento das amostras em período não superior a 3 horas a partir da coleta. O trajeto das amostras da Praia de Junqueira, Mangaratiba (RJ) até o laboratório foi realizado de carro. Sendo a distância deste percurso de aproximadamente 56 km, gastava-se em média mais uma hora para a chegada das amostras desde Junqueira até o laboratório.

3.4 Preparo das Amostras

Para o preparo das amostras foram seguidas as recomendações do MAPA, publicadas na Instrução Normativa N° 62 de 26 de agosto de 2003 que oficializa os métodos analíticos para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. Com a amostra ainda dentro do recipiente em que foi transportada, realizou-se sua homogeneização por inversão do recipiente. Antes da abertura da embalagem, procedeu-se a assepsia da mesma por meio de algodão embebido em etanol 70°GL.

3.5 Análises Bacteriológicas

3.5.1 Coliformes totais e coliformes termotolerantes

Para a prova presuntiva, foram inoculados 10ml diretamente da amostra em uma série de cinco tubos contendo Caldo Lauril Sulfato – CLS (Himedia®) em concentração dupla. Inocularam-se também volumes de 1ml e 0,1ml da amostra em 2 séries de cinco tubos contendo o mesmo caldo em concentração simples. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por até 48h. Foram consideradas positivas para a prova presuntiva, as amostras que obtiveram formação de gás no interior dos tubos de Durhan.

Cada tubo considerado positivo na etapa anterior foi repicado para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile 2% Lactose – VB (Oxoid®) e caldo E.C. (Oxoid®), os quais foram incubados por até 48 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ e $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$, respectivamente. Os tubos com formação de gás em Caldo VB confirmaram a presença de coliformes totais. Já os tubos positivos contendo Caldo EC confirmam a presença de coliformes fecais.

De posse dos resultados quanto ao número de tubos positivos para coliformes totais e fecais em cada série de cinco tubos, o número de NMP foi calculado utilizando-se a planilha do “software” Excel disponibilizada pelo FDA (BLODGETT, 2001). A técnica do Número Mais Provável não gera o valor zero quando todos os 5 tubos apresentam resultados negativos, mas sim $< 1,8$. Para fins de análises estatísticas e cálculo de médias, o valor $< 1,8$ foi considerado 1,8, posto que para a realização de médias geométricas não pode ser utilizado o valor zero.

3.5.2 *Salmonella* spp.

Seguindo-se as recomendações do MAPA (BRASIL, 2003) para pesquisa de *Salmonella* em água usada em aqüicultura, transferiu-se 100ml da amostra para um frasco contendo 50ml de Água Peptonada 1% Tamponada em concentração tripla. Esta solução de pré-enriquecimento foi incubada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas. Para a etapa de enriquecimento seletivo, foram utilizados os Caldos Rappaport Vassiliadis (Merck®) e Selenito Cistina (Merck®). A partir desses caldos, procedeu-se a semeadura em estrias em placas contendo Agar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose – BPLS (Himedia®) e Agar *Salmonella-Shigella* – ASS (Merck®), as quais foram incubadas por $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Quando do desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella*, estas foram inoculadas em Agar Ferro Três Açúcares – TSI, Agar Lisina Ferro – LIA TSI (Merck®) e Agar Uréia (Merck®), incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, e realizada subsequente reação sorológica frente ao anti-soro polivalente O (Probac®).

3.5.3 *Staphylococcus coagulase* positiva

Foram semeadas por esgotamento alíquotas de 0,25ml da água do mar sobre a superfície seca de cada uma das quatro placas de Petri contendo Agar Baird Parker (Himedia®) preparado previamente com emulsão de gema de ovo (Himedia®) e telurito de potássio 3,5%. São consideradas colônias típicas de *S. aureus* aquelas negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio (BRASIL, 2003). As colônias típicas e atípicas presentes em cada placa foram contadas e, posteriormente, um máximo de 5 de cada uma delas foi semeada em meio contendo Caldo Cérebro-Coração – BHI (Oxoid®) e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Para a prova da coagulase, foram transferidos 0,3ml de cada tubo de BHI para tubos contendo 0,3ml de coagu-plasma (Laborclin®) e incubados por $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 horas, segundo recomendações do MAPA (BRASIL, 2003). A prova da catalase foi realizada com auxílio de palito de madeira 665estéril, com o qual uma alíquota do cultivo

realizado em Agar Nutriente (Oxoid®) foi transferida para uma lâmina de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%.

3.6 Obtenção de Dados Abióticos

3.6.1 Temperatura e salinidade da água

Os valores de temperatura e salinidade dos dois primeiros metros da coluna d'água foram medidos no momento da coleta com o auxílio de termômetro acoplado à Garrafa Van-Dorn Alpha-Tecnoquímica (capacidade para 2 litros) e refratômetro Unity modelo RTS-101ATC, respectivamente. A profundidade de aferição dos dados foi escolhida devido às cordas de cultivo dos mexilhões se localizarem entre um e dois metros de profundidade ao longo da coluna d'água. Para a realização das análises estatísticas, foram utilizadas médias aritméticas simples dos dados de 1 e 2m de profundidade.

3.6.2 Precipitação de chuvas

Os valores da precipitação de chuvas na Ilha Guaíba diários e acumulados durante cada mês no período entre julho de 2007 e março de 2008 foram medidos pela estação meteorológica MBR-TIG e cedidos pela empresa Vale do Rio Doce para utilização no presente estudo. Os índices diários eram medidos às 23:59h de cada dia. Sendo assim, para a realização das análises estatísticas, os dados dos de precipitação do dia anterior e do dia da coleta foram somados (LEE e MORGAN, 2003).

3.6.4 Profundidade Secchi

A profundidade em que a luz penetra em um corpo d'água pode ser verificada com a utilização do disco de Secchi. Este equipamento secularmente utilizado consiste num círculo de metal achatado pintado alternadamente em branco e preto, o qual é unido a uma corda graduada, onde é realizada a leitura da profundidade. O disco é lançado dentro d'água, sendo afundando até o momento em que não é mais visto pelo observador, quando é então realizada a medição da profundidade alcançada pelo disco na corda graduada. A profundidade Secchi é, portanto, uma estimativa abstrata da penetração vertical da luz solar ao longo da coluna d'água. A profundidade Secchi foi verificada entre os meses de abril de 2007 a março de 2008, exceto nos meses de setembro de 2007 e março de 2008 quando, por impossibilidades técnicas não foi possível proceder a aferição dos valores.

3.6.5 Radiação global

A radiação global é a medida de energia solar que incide sobre uma superfície de 1m². Os dados diários de radiação global entre os meses de julho de 2007 a março de 2008 foram fornecidos pela empresa Vale do Rio Doce e são provenientes da estação meteorológica MBR-TIG, localizada na Ilha Guaíba.

3.7 Análise Estatística

A análise dos dados das colimetrias, transformados previamente em raiz quadrada, foi realizada pela análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey para comparação de médias, ambos ao nível de 5% de significância (VIEIRA, 2006).

O estudo do nível de associação entre as variáveis abióticas e as colimetrias foi realizado através do coeficiente de correlação linear de Pearson ao nível de 5% de significância (VIEIRA, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fatores Abióticos

Os resultados das verificações de dados abióticos de cada mês de coleta, bem como suas respectivas médias, estão dispostos na Tabela 1.1.

A temperatura da água do cultivo dos dois primeiros metros de profundidade variou de 20 a 26°C, com uma média anual de 23,1°C. Já sua salinidade teve uma variação de 33 a 36,5, com média anual de 35,2. De acordo com a Resolução CONAMA n°. 357 (BRASIL, 2005a), estas águas seriam classificadas em salinas, uma vez que nenhuma das verificações obteve resultados inferiores a 30. A salinidade da água é fortemente influenciada pela precipitação pluviométrica, cuja variação foi de 0 a 31,0mm, 5,1mm de média entre os meses de julho de 2007 e março de 2008.

A radiação solar próxima ao local do cultivo variou entre 15,42 e 31,50W/m², com uma média de 22,91W/m² verificada nos oito meses em que os dados foram aferidos. A profundidade Secchi, cuja média é de 2,4m durante o mesmo período, variou entre 1,8 e 3,0m.

Tabela 1.1 – Fatores abióticos registrados na Ilha Guaíba, RJ, no período de abril de 2007 a Março de 2008.

Mês	Temperatura (°C)	Salinidade	Precipitação (mm)	Prof. Secchi (m)	Radiação (W/m ²)
2007					
Abr.	25,36	36,5	1,9	1,9	22,35
Mai.	23,53	35,5	1,8	1,8	21,36
Jul.	21,36	20,18	42	2,2	22,35
Ago.	22,35	22,01	9,96	2,2	22,35
Set.	22,35	22,01	9,96	2,2	22,35
Nov.	24,33	31,03	0,24	2,5	26,36
Dez.	26,36	20,53	1,50	2,00	25,36
Jan.	25,36	30,02	1,58	2,1	23,47
Fev.	22,34	27,62	8,15	4,2	22,34
Mar.	20,35	25,0	17	2,4	22,35
Média	23,13	35,25	5,12	2,42	22,91

Em pesquisa desenvolvida na Baía de Guanabara, também no estado do Rio de Janeiro, entre os meses de janeiro e outubro de 1999, os valores médios de salinidade e temperatura para os cinco pontos de coleta estiveram bem próximos das médias verificadas no presente estudo (PINHEIRO JR. et al., 2002). Apesar disto, temperatura e salinidade da água do mar são facilmente influenciadas pelas condições oceanográficas específicas de cada região como atuação de correntes, deságüe de rios, chuvas, dentre outros (NYBAKKEN, 2001).

Os resultados de temperatura e salinidade coincidiram com as médias anuais apresentadas por Scott (1998) para o entorno da ilha Guaíba.

Quando ocorrem chuvas em áreas costeiras e a água chega até o ambiente marinho, esta dissolve os sais presentes na água do mar, fazendo com que a salinidade verificada diminua (BROCK et al., 1985; LEE; MORGAN, 2003; PINHEIRO JR. et al., 2002). A correlação negativa entre estes dois fatores foi confirmada ($r = -0,86$, Tabela 1.2). Sendo assim, pode-se

dizer que as duas variáveis são inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior a precipitação de chuvas, menor será a salinidade verificada nas áreas sob a influência deste fenômeno natural. Os demais fatores abióticos não apresentam correlações significativas entre si (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Coeficiente de correlação linear de Pearson entre os fatores abióticos temperatura (°C), salinidade, radiação global (w/m²), precipitação (mm) e profundidade Secchi (m), abr. 2007 – mar. 2008.

<i>Salinidade</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Radiação global</i>	<i>Precipitação</i>	<i>Prof. Secchi</i>
0,271	0,271	0,190	0,511	0,190
0,061	0,440	0,570	0,140	0,521

* **Correlação linear de Pearson significativa (P<0,05)**

4.2 Análises Bacteriológicas

4.2.1 Coliformes totais e termotolerantes

Quanto ao índice de coliformes totais presentes nas amostras de água, estes obtiveram valores que variaram entre $<1,80$ e $9,43 \times 10 \text{ NMP.100mL}^{-1}$. As médias mensais das duplicadas ficaram entre $1,8$ e $4,81 \times 10 \text{ NMP.100mL}^{-1}$ e a média geométrica anual foi de $6,23 \text{ NMP.100mL}^{-1}$ (Tabela 1.3).

A metodologia para determinação do NMP de coliformes não gera o valor zero quando as concentrações bacterianas não são detectáveis. De acordo com a planilha utilizada para este cálculo (BLODGETT, 2001), o menor valor obtido quando a produção de gás é negativa para os cinco tubos da seqüência é $< 1,8 \text{ NMP.100mL}^{-1}$ para amostras de água e $< 0,18 \text{ NMP.g}^{-1}$ para os mexilhões (este último discutido posteriormente no capítulo II). Para proceder análises estatísticas e demais cálculos, estes valores foram considerados como $1,8$ e $0,18$, respectivamente. É importante frisar que estes são os menores valores passíveis de serem encontrados como resultado e representam concentrações não detectáveis pelo método. O cálculo do valor da média expressa em números logarítmicos apresentados nas tabelas abaixo fora efetuado para realizar-se uma melhor comparação dos resultados obtidos para a água e para os mexilhões, realizada no capítulo II da presente dissertação.

Tabela 1.3 – Número Mais Provável de coliformes totais em duas amostras de água do cultivo da Ilha Guaíba e suas médias em NMP.100mL⁻¹, abr. 2007 – mar. 2008.

Mês	Amostra 1	Amostra 2	Média	Logaritmo da Média	Abr.<
	1,806,844,320,63				
Mai.<	1,809,43	x 104,81	x 101,68	3,64<	
	1,802,720,43				
Ago.<	1,80<	1,801,800,25			
Set.<	1,80<				
	1,801,800,25				
Nov.4,56	x 104,83	x 104,69	x 101,67	Dez.<	1,80<
	1,801,800,25				
Jan.1,07	x 102,16	x 101,61	x 101,21	Fev.1,69	x
	102,31	x 102,00	x 101,30	Mar.7,801,07	x 109,250,97
				Média Geométrica Total	6,23

Os resultados das análises de coliformes termotolerantes evidenciaram valores entre < 1,8 e 2,71 x 10 NMP.100mL⁻¹ e médias mensais de 1,80 até 2,51 x 10 NMP.100mL⁻¹ (Tabela 1.4). Tendo por base a classificação bacteriológica do CONAMA (BRASIL, 2005a), a região da Ilha Guaíba, onde o experimento foi desenvolvido, se encontra apta ao cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, posto que a média geométrica dos resultados de coliformes termotolerantes das 20 amostras analisadas foi de 2,69, ou seja, não ultrapassa o valor limite de 43 NMP.100mL⁻¹ e que nenhuma das amostras apresentou valor igual ou superior a 88 NMP.100mL⁻¹ de água do cultivo. A baixa contagem da maioria das amostras se deve principalmente ao fato de o cultivo da Ilha Guaíba estar localizado em uma região de circulação de maré no setor III, uma das áreas que menos recebe aporte de esgoto da Baía de Sepetiba (SEMA, 1998). Além disso, a ilha apresenta proximidade com a região oceânica onde a renovação de água é constante, sendo fortemente influenciada por ação de correntes e marés que dispersam os microrganismos. A ilha Guaíba situa-se a aproximadamente 1,6km do continente. Esta também é a distância das moradias mais próximas e que poderiam influenciar a contaminação microbiológica das águas que a rodeiam. Porém, diante do exposto na Tabela 1.4, pode-se inferir que a poluição bacteriológica das águas ao redor da ilha Guaíba é leve e intermitente, ocorrendo em maiores índices apenas nos períodos posteriores às fortes chuvas.

Mês	Amostra 1	Amostra 2	Média	Logaritmo da Média	Abr.<
	1,801,821,810,26				
Mai.<	1,80<	1,801,800,25			
	1,802,720,43				
Ago.<	1,80<	1,801,800,25			
Set.<	1,80<				
	1,801,800,25				
Nov.2,31	x 102,71	x 102,51	x 101,4	Dez.<	1,80<
	1,801,800,25				
Jan.<	1,80<	1,801,800,25			
Fev.2,001,28	x				
	107,400,87			Mar.<	1,80<
				Média Geométrica Total	2,69

No estado do Ceará, o estuário do rio Jaguaribe apresentou valores de NMP para coliformes totais e termotolerantes em água que variaram entre $<1,8$ a 3500 e $<1,8$ a 490/100mL, respectivamente. A média geométrica de coliformes termotolerantes encontrada no estudo foi de 6,18, fato que também classificaria a água do rio Jaguaribe no local e período pesquisados como apta ao cultivo de bivalves (VIEIRA et al., 2007b).

Em Ubatuba, região de São Paulo próxima ao litoral sul do estado do Rio de Janeiro, três pontos foram analisados e apresentaram índices de coliformes totais variando entre 3,4 a $3,6 \times 10^2$ NMP/100mL e de coliformes termotolerantes de $<3,0$ a $5,7 \times 10^1$. Sendo assim, 6,7% das amostras estariam acima dos limites estipulados pela legislação durante o período do estudo (GALVÃO, 2004).

Ao analisar o potencial para a instalação de novos cultivos de moluscos bivalves no Rio de Janeiro, Pinheiro Jr. et al. (2002) apontam que Piratininga e Rio Branco são pontos da baía de Guanabara que apresentam provável propriedade para esta instalação, enquanto que Icaraí, Boa Viagem e Santa Cruz não apresentariam tal capacidade devido aos resultados de colimetria da água marinha estarem acima dos padrões estabelecidos pela legislação vigente na época do estudo. Segundo o autor, estes também seriam locais indicados para serem utilizados em processos de depuração natural de moluscos cultivados em águas mais contaminadas.

Pesquisas desenvolvidas na Croácia por Solic et al. (1999) constataram concentrações entre 0 e 63095 CT/100mL de água do mar nas diversas estações de coleta testadas. As maiores concentrações foram verificadas nos meses de verão e as menores nos meses de inverno.

Como demonstram as Tabelas 1.3 e 1.4, as maiores contagens de coliformes totais e fecais presentes nas amostras de água do cultivo da Ilha Guaíba se deram nos meses de novembro de 2007 e fevereiro de 2008. No mês de novembro, houve ocorrência de chuvas nos 5 dias anteriores e também no dia da coleta das amostras, sendo o índice de precipitação acumulada durante estes 6 dias de 104,60mm, ou seja, aproximadamente 40% do que choveu durante todo o mês. Este foi um dos meses mais chuvosos do ano de 2007 para a região, registrando uma precipitação mensal da ordem de 255,40mm. Também no mês de fevereiro, houve registro de precipitação de 7,60mm no dia da coleta. A observação destes fenômenos, somada às informações obtidas na literatura consultada de que existe correlação entre a quantidade de bactérias presentes na água do mar e a ocorrência de chuvas (BROCK et al., 1985; VIEIRA et al., 2002; LEE e MORGAN, 2003; CARDONHA et al., 2004) direcionaram a necessidade de se realizar testes estatísticos que confirmassem a influência do fator precipitação e, conseqüentemente, da salinidade da água (BROCK et al., 1985; LEE; MORGAN, 2003), no aumento das contagens bacterianas também para esta região. Os resultados estatísticos demonstraram que o fator ambiental que apresenta maior correlação com as contagens de coliformes fecais na água é a precipitação ($r = 0,99$, Tabela 1.2), concordando com Brock et al. (1985). Conseqüentemente, estas contagens apresentam correlação negativa com as salinidades verificadas ($r = -0,83$, Tabela 1.5).

As maiores contagens de coliformes encontradas em menores salinidades provavelmente sofrem influência de dois fatores: o aumento da descarga das células bacterianas no mar junto

com a chuva e a diluição que esta causa nos sais presentes, favorecendo um maior tempo de sobrevivência dos coliformes. Estudos *in vitro* demonstram que o tempo transcorrido para haver 90% de morte de coliformes fecais é de 48 horas em salinidades de 35 e 72 horas sob salinidade de 27 (GABUTTI et al., 2000).

A temperatura da água não apresentou correlação significativa com o NMP de coliformes verificados nas amostras (Tabela 1.5). Embora alguns estudos tenham demonstrado que a temperatura pode interferir no tempo de sobrevivência de bactérias na água do mar, as variações térmicas verificadas na Ilha Guaíba por ocasião das coletas das amostras não parecem ser suficientes para influenciar a contaminação por coliformes no local, concordando com Solic et al. (1999).

Apesar da radiação solar ser o maior fator de ação deletéria sobre células bacterianas na água do mar (FUJIOCA et al., 1981; SOLIC; KRSTULOVIC, 1992, POMMEPUY et al., 1996, CARO et al., 1999, ROSEN; BELKIN, 2001, CHANDRAN; HATHA, 2005; CASTRO et al. 2006), as análises de correlação de radiação global, profundidade Secchi com coliformes totais ou termotolerantes não apresentaram resultados significativos em nenhum dos pares analisados (Anexo A).

Tabela 1.5 – Coeficiente de correlação linear de Pearson entre a colimetria da água e os fatores abióticos de salinidade e temperatura, abr. 2007 – mar. 2008.

Col. totais *Col. termotolerantes* *Salinidade* *Temperatura* *Col. totais* *Col. termotol.* **0,71*** *Salinidade* **-0,63*** **-0,83*** *Temperatura* **0,100,070,271*** **Correlação linear de Pearson significativa (P<0,05)**

Os valores de Ct e CT nas amostras de água apresentam correlação positiva ($r = 0,71$, Tabela 1.5). Este resultado é semelhante aos obtidos por Pinheiro Jr. et al. (2002) e Vieira et al. (2007b) e pode ser explicada através da avaliação da própria metodologia de determinação do Número Mais Provável (BRASIL, 2003), uma vez que somente é verificada a presença de CT em tubos que se apresentaram positivos na prova presuntiva para Ct e ainda que o grupo dos coliformes termotolerantes encontra-se incluso no grupo dos coliformes totais (WINN et al., 2008).

4.2.2 *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva

Em nenhuma das amostras representativas foram isolados os microrganismos *Salmonella* spp. ou *Staphylococcus* coagulase positiva.

Apesar da legislação brasileira basear-se somente na análise de coliformes para a classificação das áreas de cultivo de moluscos, análises diretas dos microrganismos patogênicos refletem com maior confiabilidade a qualidade bacteriológica da água para a maricultura (GABUTTI et al., 2000; BRASIL, 2005a; VIEIRA et al., 2007a). E por não apresentar estes microrganismos nas amostras analisadas, o resultado de que a água utilizada pela AMAR para maricultura é própria ao cultivo é reafirmado.

Das amostras de água do mar testadas por Brock et al. (1985) e Galvão (2004), nenhuma delas apresentou presença de *Salmonella*, concordando com os resultados do presente estudo. Este último autor discute o fato das salmonelas serem encontradas em pequenas quantidades na coluna d'água, diminuindo a probabilidade do seu isolamento a partir de pequenas amostras representativas. Chandran e Hatha também apresentam como justificativa para uma menor detecção de *Salmonella*, o fato de sua sobrevivência ser menor em águas estuarinas, quando comparada a outros microrganismos, como *E. coli*. É importante ressaltar que, neste caso, a temperatura da água em torno dos 20°C, como a encontrada na Ilha Guaíba, poderia prolongar a sobrevivência de salmonela por um tempo maior (CHANDRAN; HATHA, 2005)

Ao pesquisar os aspectos microbiológicos de águas estuarinas nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará utilizadas para abastecimento de cultivos de camarão e ostras, Vieira et al. (2007a) detectaram e caracterizaram vários sorovares de *Salmonella* presentes nas amostras de água. Dentre eles estão *S. Braenderup* e *S. Carrau* no rio Jaguaribe; *S. Carrau*, *S. Freetown*, *S. Newport* e *S. enterica* subsp. *enterica* no rio Açú e *S. Braenderup* no rio Curimataú. Os mesmos autores destacam que as diferentes espécies de *Salmonella* são resistentes a mudanças ambientais, apresentando capacidade de sobrevivência em diversos sistemas aquáticos e seriam, dentre os patógenos bacterianos, o mais indicado para proceder a avaliação sanitária das águas.

Em estudo conduzido por Galvão, J. et al. (2006) em cultivos de Ubatuba também não se detectou presença de *S. aureus* nas amostras de água. Entretanto, esta bactéria é capaz de sobreviver por mais de 98 horas em água do mar com salinidades de 35 (GABUTTI et al., 2000), tal qual a concentração média de sais encontrada no presente experimento para as águas da ilha Guaíba. Estes autores defendem ainda que *S. aureus* deveria ser utilizado como um novo indicador de qualidade de água do mar, uma vez que sua sobrevivência sob altas salinidades é maior do que coliformes fecais e *Salmonella*.

5 CONCLUSÕES

As águas que rodeiam a Ilha Guaíba apresentam qualidade bacteriológica satisfatória para seu uso em aqüicultura, pois não foram isolados *Salmonella* ou *Staphylococcus* coagulase positiva e a contaminação por coliformes é discreta, ocorrendo em períodos isolados influenciados principalmente pela ocorrência de chuvas na região.

A partir dos resultados obtidos é possível concluir-se que a região da Ilha Guaíba encontra-se apta ao cultivo dos moluscos bivalves se considerada a legislação vigente no Brasil.

Dentre os fatores abióticos testados, a precipitação pluviométrica é o que apresenta maior correlação com as concentrações de coliformes, seguida pela salinidade da água. Tanto os dados de precipitação quanto de salinidade podem ser utilizados pelos maricultores a fim de terem uma estimativa mais prática da contaminação de origem fecal presente no local.

Para uma definição confiável sobre a qualidade bacteriológica da água, deve ser realizado um monitoramento por prolongado período de tempo e com amostragem freqüente e intensa nas áreas de interesse, além da inclusão de outros parâmetros fundamentais para a classificação da região para maricultura, como análises de biotoxinas e metais tóxicos.

Apesar da realização de análises colimétricas freqüentes da água do cultivo, é fundamental o monitoramento bacteriológico dos próprios moluscos cultivados na região antes de sua comercialização, uma vez que eles refletem com mais clareza sua segurança como alimento.

CAPÍTULO II
ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS EM MEXILHÕES CULTIVADOS NA
ILHA GUAÍBA

RESUMO

O mexilhão *Perna perna* é a espécie de molusco bivalve predominante nas fazendas marinhas de todo o Brasil. O monitoramento bacteriológico de moluscos comercializados deve ser realizado freqüentemente devido aos bivalves serem capazes de bioacumular contaminantes presentes na coluna d'água onde crescem. Os mexilhões são animais filtradores utilizados para alimentação humana, portanto, a contaminação ambiental afeta tanto a sanidade do animal quando a Saúde Pública. Os níveis de coliformes totais e termotolerantes presentes nos moluscos foram determinados através da técnica do Número Mais Provável (NMP), bem como a verificação da presença de *Salmonella* e de *Staphylococcus* coagulase positivo, em amostras coletadas no período de abril de 2007 a março de 2008. Os níveis de coliformes totais nos tecidos dos mexilhões variaram de $<1,8 \times 10^{-1}$ a $1,61 \times 10^2$ NMP.g⁻¹, enquanto que os termotolerantes estiveram entre $<1,8 \times 10^{-1}$ e $3,57 \times 10$ NMP.g⁻¹. Não foram encontrados os microrganismos *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positivo. Os resultados sugerem que os mexilhões cultivados na Ilha Guaíba encontram-se aptos à comercialização, não comprometendo a segurança alimentar de seus consumidores. Entretanto, análises específicas para cada patógeno, principalmente os de origem autóctone, precisam ser desenvolvidas.

Palavras-chave: mexilhões, análises bacteriológicas, sanidade animal.

ABSTRACT

The most predominant species of bivalve mollusc cultivated in Brazil's marine farms is the brown mussel *Perna perna*. Bacteriological monitoring of commercialized shellfish has to be carried out frequently due to their ability to concentrate contaminants from the water column where they grow up. Mussels are filter-feeding animals used in human diet. Therefore, environmental contamination not only does affect their own sanitation, but also the public health. Total and fecal coliform levels present in shellfish were determined by the Most Probable Number (MPN) technique, and also the screening for the presence of *Salmonella* and *Staphylococcus* positive coagulase from samples collected from April 2007 to March 2008. Total and thermotolerant coliform concentrations of varied from $<1,8 \times 10^{-1}$ to $1,60 \times 10^2$ NMP.g⁻¹ and $<1,8 \times 10^{-1}$ e $3,57 \times 10$ NMP.g⁻¹, respectively. No *Salmonella* or *Staphylococcus* positive coagulase was detected from the samples. Results have suggested that the mussels which have been cultivated in Ilha Guaíba can be commercialized and do not damage consumers' food assurance. However, specific analyses for each pathogen are still to be carried out, mainly for those ones which have autochthon origin.

Key words: mussels, bacteriological monitoring, animal sanitation.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de mexilhões, ou mitilicultura, representa um importante papel no desenvolvimento econômico e social dos municípios das regiões costeiras, especialmente nos estados de Santa Catarina e Rio de Janeiro. Mundialmente, esses animais, e demais bivalves, correspondem a cerca de 22% da produção aquícola. Desde a década de 1950 até o ano 2007, dados de revelam uma tendência de declínio na produção pesqueira e incremento na aquíicultura.

Tal fato deve-se, entre outros fatores, à ocupação espacial da região litorânea que tem favorecido uma crescente pressão antrópica sobre tais ecossistemas, sem que se leve em conta a capacidade de suporte destes ambientes e, desta forma, promovendo sérios impactos que ocasionam não só a degradação do meio ambiente natural como também a degradação socioeconômica e cultural das comunidades destas regiões.

Neste contexto, a maricultura surgiu no Brasil como atividade alternativa, absorvendo a mão-de-obra anteriormente dedicada à pesca, o que garantiu a permanência das famílias no seu local de origem através da possibilidade de nova fonte de renda, preservando a sua herança cultural com qualidade de vida.

No estado do Rio de Janeiro, a expansão da mitilicultura vem ocorrendo principalmente nas baías de Sepetiba e Ilha Grande. Mangaratiba é um dos mais promissores municípios do estado do Rio de Janeiro para o desenvolvimento de uma maricultura sustentável e responsável. Atualmente vemos para o litoral do Rio de Janeiro uma mudança de paradigma tal qual ocorrida em Santa Catarina que alia ao conceito de sustentabilidade às questões de sanidade dos animais e a segurança destes como alimento para seus consumidores. Cabe, entretanto, às instituições de pesquisa e ensino do estado a geração de conhecimento que possa ser imediatamente aplicado às realidades de cada região produtora. A partir do estreitamento das relações entre Universidade, setor produtivo e governamental do município de Mangaratiba, o presente estudo veio satisfazer a necessidade de informações sobre a qualidade microbiológica dos moluscos bivalves cultivados na Ilha Guaíba. Dados que assegurassem a sanidade dos animais eram ainda inexistentes para a região do estudo.

O objetivo deste trabalho foi analisar a qualidade bacteriológica dos mexilhões cultivados na Ilha Guaíba, através da determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes e verificar a presença de *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva. O parâmetro para avaliação utilizado foram as legislações brasileiras e da Comunidade Européia para análise de alimentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia dos Moluscos Bivalves e da Espécie *Perna perna*

Os moluscos bivalves compreendem uma classe do filo Mollusca. São, portanto, animais de corpo mole envolvido por duas valvas que são unidas por uma dobradiça protéica. A classe Bivalvia apresenta simetria bilateral, corpo achatado transversalmente com tronco dorsal. A sua respiração é branquial e realizam reprodução sexuada com fecundação externa ou na cavidade paleal. Seu habitat é aquático e marinho na sua maioria e possuem modo de vida fixa ou livre. O sistema digestivo é completo, constituído pela boca com palpos labiais, faringe, esôfago, estômago, intestino, glândula digestiva, reto e ânus. A sua alimentação é facilitada pelo fluxo de água corrente promovido pelos cílios que têm origem nos palpos labiais atuando também nas brânquias e esôfago (RUPPERT e BARNES, 1996; OLIVEIRA e ALMEIDA, 2000). Mexilhões alimentam-se de matéria orgânica particulada, viva ou não. A seleção é realizada pelos palpos labiais em função do tamanho das partículas, cujo diâmetro pode variar desde poucos micrômetros a 2 mm (SOLIC et al., 1999; FAO, 2006b).

Perna perna (Figura 2.1) é a espécie da família Mytilidae mais abundante no litoral brasileiro, sendo encontrados na faixa do médio-litoral, onde se fixa naturalmente aos costões rochosos (HENRIQUES et al., 2000). A maioria dos estudos relata que a distribuição geográfica da espécie no Brasil se dê desde o Espírito Santo até o sul do Rio Grande do Sul (MAIA et al. 2006). Henriques et al. (2000) constataram que *P. perna* era a espécie de bivalve mais abundante nos costões rochosos da Baixada Santista, SP. Por se tratar de uma espécie nativa do Brasil (MAGALHÃES et al., 2007), é resistente às variações de fatores abióticos, como salinidade e temperatura, ocorrente no litoral brasileiro, característica essa que possibilita o cultivo e facilita as atividades de manejo da maricultura e a utilização destes animais em trabalhos de pesquisa. Resgalla Jr. et al. (2007) relatam que os mexilhões das diversas espécies são os invertebrados mais estudados em todo o mundo, principalmente devido à facilidade de trabalho em laboratório, seu hábito sésil, tamanho, resistência a alterações ambientais e importância econômica. São muito utilizados como modelos para produção em ambientes costeiros e indicadores de qualidade ambiental. Quanto à sua taxonomia, o animal pertence à seguinte classificação:

Domínio Eukaria

Filo Mollusca

Classe Bivalvia

Subclasse Pteriomorpha

Superordem Mytilida

Ordem Mytiloida

Família Mytilidae

Gênero *Perna*

Espécie *Perna perna* (LINNAEUS, 1758)

O ciclo sexual da espécie *P. perna* é praticamente contínuo, havendo liberação de gametas durante todo o ano. Porém, dependendo da região, a atividade reprodutiva se intensifica em determinados meses como o verificado por Galvão, M. et al. (2006). Estes autores relataram picos de desova nos meses de janeiro-fevereiro, maio e julho-agosto para a praia de Guaraú (Peruíbe, SP), e em janeiro e setembro para a Ilha Urubuqueçaba (Baía de Santos, SP) e

relacionam esta diferença na periodicidade reprodutiva à variação de fatores abióticos de cada região.

Dentre os mitilídeos, *Perna perna* é a espécie que chega ao maior tamanho. De acordo com a disponibilidade de nutrientes no local do cultivo, este animal pode chegar ao tamanho ideal para ser comercializado em 6 a 10 meses com uma massa de aproximadamente 22 a 45g. (MARENZI; BRANCO, 2005; TORRENS, 2005; FIPERJ, 2007). São utilizados na alimentação humana, pois representa uma fonte alternativa de proteína animal de baixo custo, de fácil digestão e rica em aminoácidos essenciais. Mexilhões constituem importante fonte de ômega-3, sendo superada apenas pelo salmão e, além disso, é um alimento pobre em gorduras saturadas e rico em ácidos graxos poliinsaturados. É isento de colesterol e os esteróis presentes, os chamados fitoesteróis, impedem a absorção do colesterol de outras fontes alimentares. Outro importante fator nutricional é a presença de vitaminas e minerais essenciais como zinco, selênio e ferro (DONG, 2001).



Figura 2.1 – Mexilhões *Perna perna* utilizados para as análises bacteriológicas.

2.2 Sanidade de Mo

Em condição: água do mar por ho substâncias ou microrganismos presentes na coluna d'água podem ser bioacumulados por até 1000 vezes nos moluscos bivalves, tornando-se muitas vezes patogênicos para os próprios animais. Porém, a capacidade de filtração e, conseqüentemente, de acúmulo de partículas depende tanto de seu tamanho, quanto da espécie de bivalve considerada. Diversos microrganismos podem apresentar potencial patogênico para estes animais, tais como vírus, bactérias, fungos, microalgas, protozoários, dentre outros (PIPE; COLES, 1995; CANESI et al., 2001; LIMA et al., 2001; SILVA et al., 2001; HUSS et al., 2003; MOLES; HALE, 2003; ABESSA, 2006)

Acredita-se que a patologia que mais acomete os mexilhões seja o parasitismo por larvas de trematódeos da família Bucephalidae. Os animais parasitados pelos tramatódeos apresentam manto com aspecto filamentosso, devido à ramificação dos esporocistos de cor alaranjada, motivo pelo qual a doença é popularmente conhecida como “doença laranja”. A bucefalose afeta o ciclo

reprodutivo dos animais, podendo reduzir ou inviabilizar sua gametogênese. Tal fato tem conseqüências para o setor produtivo devido à redução do número de sementes para um próximo período de cultivo (LIMA et al., 2001; GALVÃO, M. et al., 2006; MAGALHÃES; FERREIRA, 2006; FERREIRA, 2007). Segundo Galvão, M. et al. (2006), a frequência de parasitismo por bucefalídeos em mexilhões *Perna perna* pode estar relacionada à contaminação bacteriológica, especialmente por coliformes termotolerantes.

A bucefalose, assim como outras patologias foram detectadas no estado do Rio de Janeiro por Lima et al. (2001). Dos 120 animais analisados por estes pesquisadores, 75% apresentavam incidência de pelo menos uma doença, incluindo bucefalose, presença de protozoários *Nematopsis* sp., inclusões basofílicas não específicas, encapsulamentos parasitários e cistos epiteliais branquiais.

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são os agentes etiológicos da criptosporidiose, doença zoonótica diarréica que afeta tanto animais quanto o homem. Este coccídio caracteriza-se por não ter especificidade de hospedeiros, atingindo mamíferos, aves, répteis e peixes (XIAO et al., 2004). Seus oocistos podem estar presentes em águas marinhas, onde permanecem viáveis por longo tempo, como conseqüência da descarga de esgoto advindo de domicílios ou de fazendas de criação pecuária. Uma vez os oocistos presentes no ambiente marinho, moluscos bivalves podem contaminar-se, tornando potenciais vetores desta zoonose (GÓMEZ-COUSO et al., 2003). É importante ressaltar a possibilidade de correlação entre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e de coliformes termotolerantes, visto que possuem a mesma origem. O papel da presença destes coccídios na fisiologia do mexilhão não foi encontrado na bibliografia consultada, indicando a necessidade de maiores estudos nesta área.

HENRIQUES et al. (2003, 2006 e 2007) discutem a possível influência da contaminação por coliformes no tempo de resistência do mexilhão à exposição ao ar, baixas salinidades e altas temperaturas, mesmo que esta contaminação esteja bem abaixo dos limites indicados para o consumo humano. Em pesquisa desenvolvida por Henriques et al. (2003), estes autores propõem que a contaminação bacteriológica afetaria o tempo de resistência do mexilhão *Perna perna* à exposição ao ar, mesmo que esta contaminação estivesse abaixo dos limites máximos permitidos para o consumo. Em se confirmando tal relação, este fato teria implicações diretas sobre a comercialização do produto que, em geral, é feita com os animais ainda vivos e expostos ao ar atmosférico. Além disso, animais que estiveram em contato com esgoto não-tratado durante um prolongado período de tempo também secretam menos bisco, atrapalhando sua adesão aos costões rochosos (MOLES e HALE, 2003).

Os moluscos são sensíveis a contaminantes e seu sistema imunológico funciona como agente de alerta a estresses ambientais, alterando o estado de bem-estar dos animais. Estudos demonstram que os bivalves possuem em sua hemolinfa células responsáveis por inúmeros mecanismos de defesa. Os hemócitos são responsáveis principalmente pelos processos de fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas lisossomais. Sendo assim, sua hemolinfa possui atividade microbicida capaz de eliminar células bacterianas, influenciando diretamente sobre a capacidade de depuração desses moluscos. Porém, tal atividade antibactericida da hemolinfa depende tanto da variedade bacteriana que entra em contato com os hemócitos quanto da integridade do sistema imunológico dos bivalves (CANESI et al., 2001; AKAISHI, 2007).

Canesi et al. (2001) estudaram a interação entre a superfície celular de *Escherichia coli* e os hemócitos presentes na hemolinfa do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* e concluíram que células de *E. coli* que possuem fimbrias do tipo 1 são mais facilmente removidas da circulação dos animais do que cepas que não possuem este apêndice. Os hemócitos parecem expressar

receptores de superfície que se ligam às fimbrias, aproximando seu ataque às bactérias. Além disso, a presença da fração sérica da hemolinfa (soro) pode potencializar a interação entre as células bacterianas e os hemócitos como consequência da ação de fatores humorais de aglutinação (agrutininas).

Além dos mecanismos supracitados, as células podem ainda produzir compostos que possuem ação bactericida, como é o caso do peróxido de nitrito. Entretanto, a resposta imunológica de organismos aquáticos pode ser alterada quando são expostos a esgoto sem tratamento, bloqueando sua capacidade de eliminar bactérias patogênicas presentes em seus tecidos. Experimentos demonstraram haver uma taxa de mortalidade de 100% em mexilhões da espécie *M. edulis* infectados com a bactéria *Listonella anguillarum* que haviam sido expostos a esgoto doméstico *in natura*. A exposição ao esgoto por prolongado período de tempo apresenta uma tendência de inibir a atividade fagocítica dos hemócitos do mexilhão. Também foi verificada uma maior incidência de alterações morfofisiológicas em órgãos e tecidos, principalmente nas brânquias e gônada digestiva, em animais submetidos a este tratamento. Tais alterações são evidenciadas com exposição aguda aos contaminantes, já respostas hormonais e reprodutivas são detectadas apenas após exposições crônicas (AKAISHI, 2007).

Do ponto de vista da sanidade dos bivalves marinhos, a literatura relata diversos surtos de enfermidades e de mortalidade em massa ocorridos como consequência da disseminação de patógenos em diversas partes do mundo. Diante deste fato, países do hemisfério norte têm produzido muito conhecimento científico nos últimos 40 anos (BARARDI et al., 2006). Entretanto, é necessário se ter cautela ao utilizar estes dados para a realidade brasileira, uma vez que as condições bióticas e abióticas de nosso litoral são distintas, além de cultivarmos espécies diferentes daquelas encontradas na Europa e nos EUA, como é o caso das espécies nativas, a vieira *Nodipecten nodosus* e o mexilhão *Perna perna* (FERREIRA, 2007; MAGALHÃES, 2007).

Com o grande desenvolvimento da atividade maricultora no Brasil, dados que assegurassem a sanidade dos moluscos cultivados em cada região tornaram-se cada vez mais necessários, uma vez que está intrinsecamente relacionada às condições do ambiente no qual o animal se desenvolveu durante todo o seu ciclo vital. É necessário se ter conhecimento sobre os organismos patogênicos, seu modo de contaminação e ação sobre os moluscos, além da disseminação de informações para a prática de controle e prevenção de enfermidades como ocorre em outros setores da cadeia produtiva animal. Fatores como temperatura, salinidade, quantidade de nutrientes disponíveis e a presença de microrganismos patogênicos são determinantes para o crescimento sadio do animal, o que se reflete na sua qualidade como alimento quando comercializado. (AVELAR, 1998; SOLIC et al., 1999; SUPLICY, 2001; BARROS et al., 2005; FERREIRA, 2007).

Atualmente encontra-se em processo de elaboração o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves a ser coordenado pela Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. Com ele, as instituições participantes visam assegurar a sanidade dos animais, a partir do monitoramento bacteriológico e de ficotoxinas, além de implementar um sistema de rastreabilidade para os moluscos produzidos (BRASIL, 2005b; SUPLICY, 2007).

2.3 Maricultura

Os recursos pesqueiros não constituem fonte inesgotável de alimento, necessitando de atividades complementares que forneçam produtos de qualidade para o mercado consumidor. A maricultura vem se intensificando como atividade alternativa à extração de organismos dos seus ambientes naturais, constituindo uma via de geração de empregos e renda para comunidades

costeiras, pescadores e ex-pescadores (ARAÚJO, 2007). Contudo alguns parâmetros precisam ser analisados antes da instalação de novos cultivos a fim de garantir um produto que possa ser produzido dentro dos padrões de qualidade visados pelo consumidor (LENOCH, 2003; BASTOS et al., 2004; BARROS et al., 2005; FERREIRA, 2007). Segundo a FIPERJ (2007), a pesquisa básica compreende uma das etapas da maricultura e um de seus objetivos é conciliar os resultados de desenvolvimento tecnológico obtidos em pesquisas científicas com as práticas de criação realizadas nas fazendas de cultivo.

No litoral brasileiro existem muitas espécies de moluscos comestíveis e que apresentam potencial de cultivo. O início do desenvolvimento da malacocultura brasileira data da década de 1970, podendo ser considerada uma atividade de produção animal ainda muito recente (FERREIRA, 2007). Desde então os bivalves marinhos mais cultivados são os mexilhões da espécie *Perna perna*, as ostras, especialmente a espécie *Crassostrea gigas* e, mais recentemente, a vieira nativa *Nodipecten nodosus* (MARENZI; BRANCO, 2005; FERREIRA, 2007; MAGALHÃES et al., 2007).

O Rio de Janeiro apresenta em seu litoral características geomorfológicas e oceanográficas que propiciam o desenvolvimento da maricultura, como um extenso litoral, baías, enseadas, lagoas costeiras. Desde os primórdios da maricultura no Rio de Janeiro, o mexilhão *Perna perna* vem sendo uma das três espécies de moluscos bivalves mais cultivadas no estado. A produção nacional saltou de 190 para 11.760 toneladas entre os anos de 1990 e 2000, contribuindo para a posição brasileira de primeira em produção de mexilhões *Perna perna* e segunda em produção por aquíicultura no ranking latino-americano, apenas atrás do Chile. Nos anos posteriores, a produção nacional apresentou declínio devido a problemas no fornecimento de sementes, falta de um programa nacional de sanidade de moluscos e de mecanização, além da burocracia na regulamentação das fazendas de cultivo. O Estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional, respondendo por aproximadamente 97% da produção de mexilhões (LIMA et al., 2001; SUPPLY, 2001; BORGHETTI et al., 2003; NETO et al., 2001; FAO, 2006a; DIEGUES, 2006; FERREIRA, 2007; FIPERJ, 2007; FAO, 2008).

No estado do Rio de Janeiro, a expansão da mitilicultura vem ocorrendo principalmente nas baías de Sepetiba e Ilha Grande (ARAÚJO, 2007; OLIVEIRA e MAGALHÃES, 2007). Scott (1998) avaliou o potencial da Baía de Sepetiba para o desenvolvimento da maricultura e concluiu, baseado em que esta apresenta consideráveis áreas com bom potencial para a atividade. Mangaratiba é um dos cinco municípios do estado do Rio de Janeiro a ser contemplado pelo governo federal com o Plano de Desenvolvimento Local da Maricultura (PLDM) desenvolvido através da SEAP. Este plano tem por um dos objetivos integrar o setor acadêmico ao setor produtivo, a fim de fornecer aos maricultores dados científicos que assegurem a produtividade atrelada à qualidade do alimento produzido (BRASIL, 2007). Cabe, entretanto, às instituições de ensino do estado a geração de conhecimento que possa ser imediatamente aplicado às realidades de cada região.

A comercialização de moluscos bivalves no município de Mangaratiba também teve seu início a partir da extração de mexilhões de bancos naturais, seguindo a mesma tendência histórica de outras regiões do Brasil. Acredita-se que a extração na ilha de Itacuruçá, por exemplo, tenha sido realizada a partir da década de 1980. Entretanto, devido à atividade de extração levar à depleção das comunidades de mexilhões, iniciativas de cultivar estes organismos através de maricultura foram muito incentivadas na região. É importante ressaltar que os sistemas de cultivo contribuem para o restabelecimento das populações dos bancos naturais devido às características reprodutivas do animal (OLIVEIRA e MAGALHÃES, 2007). A produção do município possui caráter artesanal, gerando renda complementar para as famílias envolvidas com a atividade

maricultora. Mesmo sendo apoiada por empresas atuantes na região, pelo setor governamental em escala municipal, estadual e federal, e por outras associações e organizações, a maricultura em Mangaratiba depende ainda de outros fatores para alavancar seu crescimento. Os próprios maricultores elegem a falta de um local adequado para realizar o beneficiamento de seu produto como um entrave para aumentar a comercialização dos moluscos produzidos. Além disso, apóiam e reivindicam a atuação do setor acadêmico na região através de pesquisas que gerem conhecimentos que possam ser traduzidos numa maior confiabilidade de seu produto no mercado.

A expansão da maricultura depende diretamente da qualidade ambiental das águas costeiras. Principalmente na economia dos países da América Latina, que carecem da ampliação da rede de saneamento básico, a maricultura tem se tornado uma atividade cada vez mais expressiva. Atualmente ocorre uma mudança de paradigma onde o aumento na produção deve estar atrelado ao monitoramento da qualidade dos moluscos cultivados (CCE, 1991; GALVÃO, 2004; FAO, 2006b; FERREIRA, 2007; SUPPLY, 2007). A seguir apresenta-se o trecho de um artigo escrito por Supply (2001, p. 27) onde este autor destaca a importância da análise bacteriológica como sendo um pré-requisito ao desenvolvimento da maricultura: “Como exportar e atender os padrões de qualidade do exigente mercado externo sem ter, ao menos, o monitoramento bacteriológico e toxicológico das áreas de cultivo?”

O Ministro da Agricultura, Manejo da Natureza e Pesca da Holanda Laurens Jan Brinkhorst enfatizou em fórum ocorrido naquele país em 2001 (BRINKHORST, 2003, p. 71) “Este é o momento de introduzir inovações: métodos de produção que não sejam lucrativos somente em termos financeiros, mas que também tragam benefícios em termos de proteção ambiental, bem-estar animal e segurança alimentar.”

Constata-se então que o cultivo de moluscos marinhos está atrelado a três grandes questões: a qualidade ambiental, a sanidade do animal e a segurança deste como alimento. O desenvolvimento da maricultura depende que estes três quesitos sejam explorados por pesquisas científicas que forneçam dados confiáveis que possam ser utilizados como indicadores de qualidade do produto cultivado pelos maricultores. A grande maioria dos trabalhos publicados desenvolvidos no litoral sul do Estado do Rio de Janeiro foi desenvolvida com metais tóxicos, pois estes contaminantes apresentam grande relevância para a região (SCOTT, 1998; LIMA JR., 2002). As pesquisas em outras linhas, como análises de bactérias, biotoxinas, vírus entéricos, dentro outros, são ainda insipientes.

A qualidade do pescado deve ser garantida desde a criação do animal até sua chegada ao consumidor final. (OLIVEIRA; VIEGAS, 2004; BARROS et al., 2005). Portanto, o local onde se dará a criação deve ter as condições adequadas ao seu desenvolvimento saudável tais como quantidade adequada de nutrientes para o seu crescimento, apresentar baixos índices de contaminação microbiológica e de biotoxinas, não conter parasitos que sejam capazes de causar patologias nos moluscos, dentre outros (AVELAR, 1998; SOLIC, 1999; HENRIQUES, et al., 2000; HUSS et al., 2003; RODRIGUES, 2005; FERREIRA, 2004; MARINÉ, 2007). Uma das dificuldades em se prognosticar as produções de moluscos bivalves para os anos futuros é o fato de que a produção mundial de destes animais está atrelada à qualidade da água das regiões costeiras (BORGHETTI et al., 2003).

A carne de moluscos bivalves, quando consumida crua ou parcialmente cozida, apresenta condições ideais para a proliferação de microrganismos tornando-se um veículo potencial para contaminação humana (BARROS et al., 2005; SALÁN et al., 2008). Além disso, perdas econômicas resultantes da deterioração do alimento por atividade microbiana comprometem o faturamento das atividades pesqueiras (HUSS, 1997; HUSS et al., 2003; VIEIRA, 2004).

2.4 Influência de Fatores Abióticos Sobre o Cultivo de Moluscos Bivalves

No Brasil há poucos estudos sobre a influência de fatores abióticos no crescimento e resistência de moluscos bivalves. A maior parte dos dados disponíveis referem-se a áreas de estudos em países de clima temperado, sendo assim é ainda pouco conhecido o comportamento das espécies em regiões de clima tropical ou subtropical (HENRIQUES et al., 2006; RESGALLA JR. et al., 2007).

Moluscos bivalves são animais filtradores, motivo pelo qual concentram contaminantes a níveis muito mais altos do que aqueles presentes nas águas em que são criados. Por isso, são frequentemente utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental (JORGE et al., 2002; DE DONNO et al., 2008). A contaminação bacteriológica de seus tecidos é fortemente influenciada pelas condições do ambiente (BROCK et al., 1985; SOLIC et al., 1999; HENRIQUES et al., 2000; VIEIRA et al., 2007b). Dentre as variáveis ambientais estudadas por Lee e Morgan (2003), aquelas que apresentaram maior influência sobre a contaminação bacteriológica nos moluscos foram época do ano, as marés e a precipitação de chuvas em dias anteriores à coleta das amostras. Porém, estes autores destacam que os efeitos das variáveis ambientais sobre a contaminação bacteriológica dos moluscos são específicos para cada região e precisam ser analisados para a realidade local de cada ponto. Brock et al. (1985) verificaram as relações existentes entre chuvas, aumento no nível de rios e a salinidade e a contaminação de moluscos bivalves.

Os dois principais fatores ambientais envolvidos em alterações fisiológicas nos mexilhões, inclusive sendo determinantes para a distribuição geográfica da espécie são a temperatura e a salinidade da água do mar (RESGALLA JR. et al., 2007).

2.4.1 Salinidade

A salinidade da água do mar onde se dará a criação dos moluscos bivalves interfere diretamente na sua fisiologia, sendo um fator que precisa ser analisado nos locais onde são desenvolvidas as atividades de maricultura. A reação mais comum do animal à mudança de salinidade é a redução do metabolismo e o fechamento das valvas. Acredita-se que mexilhões da espécie *Perna perna* consigam boa aclimação em salinidades que variam de 20 a 40 (RESGALLA JR. et al., 2007).

Henriques et al. (2006), verificaram que uma variação entre 24 e 34 é confortável para a espécie, porém estes animais não suportaram salinidades abaixo de 14 por um período maior que 80 horas. Em salinidades muito baixas, os moluscos param de filtrar e, conseqüentemente, de se alimentar (LEE e MORGAN, 2003). A inibição da filtração ocorre em salinidades inferiores a 15 e superiores a 40. Em salinidades de 15 ocorre também a inibição da respiração do animal (RESGALLA JR. et al., 2007).

Ao reafirmar o potencial da Armação do Itapocoroy em Santa Catarina, para o desenvolvimento da atividade mitilicultora, Marenzi e Branco (2005) indicaram que as variações de salinidade verificadas no local, entre 26 e 33‰, permitem o cultivo de *Perna perna*.

2.4.2 Temperatura

A temperatura da água do mar onde o animal cresce é reconhecidamente um dos fatores que mais influencia a taxa de respiração e o balanço energético dos organismos marinhos. A variação térmica possui associação direta com o ciclo reprodutivo de *Perna perna*, suas taxas de

filtração, de respiração e de excreção, ou seja, influi no crescimento do animal, (AVELAR, 1998; MARENZI e BRANCO, 2005; HENRIQUES et al., 2007; RESGALLA JR. et al., 2007).

Em ambientes naturais, a temperatura também interfere indiretamente na disponibilidade de alimento para o animal e na concentração de oxigênio dissolvido, pois age sobre a taxa de produção primária no ambiente marinho. Os sistemas protéticos utilizados por seres vivos autotróficos para a realização da fotossíntese são regulados pela temperatura do ambiente, seja ele terrestre ou aquático (NYBAKKEN, 2001).

Temperatura é um fator ambiental limitante na distribuição geográfica da espécie *Perna perna*, atuando como barreira por apresentar envolvimento com processos fisiológicos, especialmente na sua reprodução. A variação de temperatura confortável para esta espécie estaria dentro da faixa de 15 a 30°C, sendo a temperatura ótima de crescimento de 25°C (RESGALLA JR. et al., 2007). As pesquisas realizadas por Henriques et al. (2007) corroboram com esta estimativa, uma vez que verificaram 100% de mortalidade de mexilhões *P. perna* submetidos a temperaturas de 34,0°C por até 24 horas ou 32,5°C por até 216 horas ou nove dias. Os mexilhões apresentaram alta tolerância a temperaturas de 29,5 e 31,0°C.

Um dos mais importantes fatores ambientais que controlam a taxa de filtração dos moluscos bivalves é a temperatura (HENRIQUES et al., 2007). Dentro de uma determinada faixa, a taxa de filtração aumenta conforme a temperatura sobe. A temperatura ideal à maior taxa de filtração depende da espécie de molusco em questão. Mexilhões do mediterrâneo possuem seu pico de filtração entre 15 e 25°C, já os do Mar Báltico filtram bem quando a temperatura está por volta dos 17°C e não ultrapassa os 20°C (SOLIC et al., 1999). Para a espécie *Perna perna* as temperaturas ideais à sua maior taxa de filtração giram em torno de 15 a 30°C (RESGALLA JR. et al., 2007).

2.4.3 Profundidade Secchi

Como já exposto no capítulo I, vários são os fatores que podem interferir na maior ou menor penetração de luz na coluna d'água. Um deles é a concentração de partículas em suspensão, constituídas tanto por matéria orgânica particulada quanto por microalgas que servem de alimento para os bivalves. O aumento na quantidade de fitoplâncton disponível na água intensifica as taxas de clareamento dos bivalves até um valor máximo, quando, então, passa a decrescer. (RESGALLA JR.; BRASIL, 2007). Sendo assim, a turbidez da água também desempenha importante papel sobre as taxas de concentração dos moluscos (GALVÃO, J. et al., 2006).

2.5 Microrganismos Veiculados por Animais Aquáticos Utilizados para Alimentação Humana: Questão de Vigilância Sanitária

Embora todo peixe não submetido a processos de conservação possa estar contaminado, é improvável que o nível de contaminação natural seja suficiente para causar doenças caso não haja proliferação microbiológica. Já em moluscos bivalves, como o mexilhão, o mesmo fato não pode ser confirmado devido ao processo de acúmulo de células patogênicas realizado durante a filtração (HUSS et al., 2003).

O conhecimento sobre os microrganismos presentes em animais aquáticos e que apresentam potencial de causar doenças de origem alimentar é indispensável para dar subsídios às ações de vigilância sanitária com objetivo de prevenir o surgimento de novos casos clínicos. Os microrganismos mais freqüentemente envolvidos nas enfermidades veiculadas por pescado,

segundo a Organização Panamericana de Saúde, são *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. e *Staphylococcus aureus*.

A família Enterobacteriaceae inclui numerosos gêneros, porém os mais relevantes para o consumo de pescado são *Escherichia*, *Salmonella* e *Shigella*. O gênero *Salmonella* está entre os microrganismos mais freqüentemente envolvidos nas enfermidades veiculadas por pescado, sendo *S. Typhi* o patógeno mais implicado nos surtos ocasionados por moluscos nos EUA. Bactérias entéricas patogênicas, como alguns sorotipos de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., podem ser encontradas na biota marinha se o ambiente for submetido ao aporte de efluentes domésticos (BARARDI et al., 2006; VIEIRA, 2004). A contaminação do pescado por coliformes termotolerantes tem sido freqüentemente associada à poluição das águas de ambientes aquáticos com esgoto ou ao transporte, manuseio e manutenção do pescado em condições não higiênicas (HUSS, 1997; BARROS et al., 2005). Os resultados das análises colimétricas em ostras comercializadas na Praia do Futuro, Ceará, chamam a atenção para o risco potencial inerente ao consumo de moluscos bivalves sem o conhecimento sobre sua qualidade microbiológica e procedência. Das 60 amostras analisadas, aproximadamente 70% estavam fora dos padrões exigidos para o consumo humano (BARROS et al., 2005).

Diversos autores têm relatado a presença de coliformes totais, termotolerantes ou *E. coli* em moluscos bivalves, como Henriques et al. (2000; 2003), Barros et al. (2005), Vieira et al. (2007b) no Brasil e Brock et al. (1985), Solic et al. (1999) no exterior.

O comportamento de bactérias no trato intestinal e tecidos dos moluscos ainda é pouco conhecido, entretanto elas podem sobreviver neste ambiente por mais tempo do que na água do mar e também conseguem reproduzir. A quantidade de coliformes fecais encontrada nos bivalves reflete o resultado da interação de diversos processos fisiológicos dos animais, como taxa de filtração, retenção e produção de pseudo-fezes, contudo tais processos são fortemente influenciados por uma série de fatores ambientais (SOLIC et al., 1999).

A concentração de *Salmonella* no tecido dos bivalves pode ser até 50 vezes maior do que na água do cultivo (OMS, 1988 *apud* SOLIC et al., 1999).

Ultimamente tem sido exigida uma maior especificidade na análise de bactérias patogênicas em pescado. A própria legislação brasileira preconiza atualmente a análise *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Salmonella* nos moluscos bivalves antes de comercializá-los (BRASIL, 2001).

2.6 Descontaminação dos Moluscos

Um dos processos utilizados para a eliminação de contaminantes em moluscos é a depuração. Este processo consiste em filtração natural de água limpa realizada pelo animal em tanques ou em ambiente natural que possua água com qualidade comprovadamente adequada. Findo o período de depuração, os moluscos devem passar por análises bacteriológicas a fim de comprovar a redução da carga bacteriana até os níveis legais permitidos (LENOCH, 2003).

Ao proceder análises bacteriológicas mensais na região da Baixada Santista – SP, Henriques et al. (2000) observaram haver depuração natural dos mexilhões *Perna perna* que cresciam sobre os costões. É importante ressaltar que além da diferente intensidade de ação da fonte contaminante de um mês para outro, os mexilhões possuem mecanismos ativos de seu sistema imunológico contra a presença de bactérias em seus tecidos favorecendo a depuração (CANESI et al., 2001).

Em experimento realizado na Itália, comprovou-se que mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* levam apenas cinco horas para reduzir a contaminação de *E. coli* em até 95,8%

da concentração inicial presente em seus tecidos. Entretanto, a utilização de *E. coli* como indicador de sanidade microbiológica é discutível, principalmente porque a eficácia da depuração para os grupos bacterianos em questão é muito diferente (CROCI et al., 2002).

Lourenço et al. (2007) verificaram evidência de depuração natural da toxina ácido ocadaico em mexilhões da espécie *Perna perna*. Esta toxina é a responsável por desencadear o Envenenamento Diarréico por Moluscos em humanos que consomem animais contaminados com concentrações bem maiores do que as verificadas nos animais cultivados na baía de Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.

A obrigatoriedade dos moluscos serem submetidos ao processo de depuração quando apresentam qualidade microbiológica insatisfatória depende da legislação específica adotada em cada país (BARROS et al., 2005). Pinheiro Jr. et al. (2002) indicam que os pontos Piratininga e Rio Branco, ambos na Baía de Guanabara, RJ, apresentariam condições bacteriológicas de serem utilizados como área de depuração natural de moluscos cultivados em águas contaminadas.

2.7 Legislação

A legislação que estabelece os microrganismos utilizados como indicadores da sanidade dos moluscos a serem comercializados e, conseqüentemente da sua segurança como alimento, é a Resolução RDC nº. 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA. Sendo assim, somente é permitida a comercialização dos moluscos bivalves *in natura*, resfriados ou congelados, não consumidos crus que apresentarem ausência de *Salmonella* spp. e que os índices de estafilococos coagulase positivos não ultrapassem o valor de 10^3 UFC por grama da amostra representativa. Cabe ressaltar que atualmente o Brasil não apresenta em sua legislação específicos parâmetros para coliformes em moluscos bivalves *in natura* não consumidos crus, características dos animais utilizados no presente estudo (BRASIL, 2001).

Os padrões microbiológicos estabelecidos anteriormente no Brasil para os moluscos bivalves eram definidos pelo Ministério da Saúde através da Secretaria de Vigilância Sanitária. No ano de 1987, os limites bacteriológicos que entraram em vigor através da portaria nº. 01 de 28 de janeiro de 1987 definiam um limite máximo de 100 coliformes de origem fecal por grama de tecido mole e ausência de *Salmonella* spp. em 25g da amostra (HENRIQUES et al., 2007). Tal legislação foi revogada por uma outra, a portaria nº. 451, de 19 de setembro de 1997, também do Ministério da Saúde. Esta continuou a adotar os mesmos limites da portaria anterior para coliformes fecais e *Salmonella* e ainda *Staphylococcus aureus*, que poderia ser encontrado até o número máximo de 10^3 NMP/g na amostra, e *Vibrio parahaemolyticus*, cujo limite era de 5×10^3 NMP/g. Esta última, por sua vez, foi revogada pela RDC nº. 12 de 2001 que retira os limites de coliformes para moluscos *in natura* não consumidos crus e *Vibrio* para todos os tipos de pescado (BRASIL, 1997; BRASIL, 2001; VIEIRA, 2004; GALVÃO, 2004; VIEIRA et al., 2007b).

Muitos pesquisadores vêm questionando o fato da pesquisa por espécies patogênicas de *Vibrio* não ser uma exigência da legislação brasileira para pescado. Esta bactéria é um dos principais patógenos associado a este tipo de alimento, especialmente em moluscos filtradores (VIEIRA, 2004; RODRIGUES, 2005; VIEIRA et al., 2007b). Pereira et al. (2007a, b) alertam para o fato de que o binômio tempo x temperatura de pré-cozimento de moluscos bivalves deve ser respeitado para a prática ser eficiente contra os víbrios. Além disso, as ostras são comumente consumidas cruas, potencializando o risco de transmissão do patógeno (SOUZA et al., 2004).

O desenvolvimento do monitoramento bacteriológico o mais amplo possível dos próprios moluscos cultivados antes de sua comercialização é fundamental, uma vez que eles refletem com

mais clareza sua segurança como alimento (BARROS et al., 2005; VIEIRA et al., 2007b; PEREIRA et al., 2008a).

A metodologia recomendada nacionalmente para proceder as análises bacteriológicas em alimentos e água encontra-se compilada na Instrução Normativa n°. 62, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

Além de análises de bactérias indicadoras, a União Européia recomenda também a verificação de vírus patogênicos, *Vibrio parahaemolyticus* e biotoxinas. Destaca ainda a importância de se estabelecer critérios para tais microrganismos, condizentes com a garantia de segurança alimentar do consumidor (CCE, 1991). Além dos parâmetros supracitados, o Codex Alimentarius enumera a necessidade de análise de metais tóxicos.

Na Nova Zelândia, Brock et al. (1985) relatam que naquele país, além da análise bacteriológica da água, a legislação adota também limites bacteriológicos para os próprios moluscos que só podem ser comercializados se o NMP de coliformes fecais não ultrapassar 230 por 100g de carne, com exceção de 2 a cada 5 amostras que pode ter níveis entre 230 e 2300NMP/100g.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudos

A fazenda marinha na qual o experimento foi instalado localiza-se na Ponta da Passagem, Ilha Guaíba, Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro. A área de estudos foi previamente descrita no Capítulo I da presente dissertação.

3.2 Instalação do Cultivo Experimental

Nos meses de março e outubro de 2007, foram confeccionadas um total de 81 cordas mexilhoneiras, com 100 animais jovens da espécie *Perna perna* em cada uma, pela equipe do Laboratório de Toxinas Marinhas (ToxMar) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com colaboração da Associação de Maricultura de Mangaratiba (AMAR) e da Prefeitura Municipal de Mangaratiba. Os mexilhões foram fornecidos pela Associação de Maricultores de Mangaratiba e extraídos dos cabos da própria estrutura de cultivo, sendo desta maneira oriundos do mesmo local onde posteriormente as cordas foram instaladas.

De cada lote de 100 animais foram amostrados ao acaso 10 espécimes para aferição do comprimento das valvas realizada com auxílio de paquímetro. Os animais apresentavam, em média, tamanho de $5,86 \pm 0,76$.

As cordas, dispostas em uma estrutura suspensa de cultivo chamada espinhel ou “long-line”, foram amarradas no cabo-mestre com espaçamento de meio metro entre cada uma delas, de forma a assegurar uma boa circulação de água com alimento entre as mesmas. O suprimento de alimento para os animais (microalgas e material orgânico particulado) foi fornecido pelo próprio ambiente marinho. A confecção das cordas utilizou baixa densidade de organismos para assegurar acesso ao alimento para todos os animais. Cordas confeccionadas com alta densidade dificultam a alimentação dos animais que permanecem em seu interior (METRI et al., 2002). As cordas foram confeccionadas segundo o utilizado por Marenzi e Branco (2005).

Os mexilhões contidos nas 81 cordas mexilhoneiras confeccionadas neste período foram também utilizados para outras análises realizadas pelo ToxMar.

3.3 Amostragem

Os mexilhões foram coletados durante os meses de abril de 2007 a março de 2008. Em cada uma das 10 coletas foram extraídas 2 amostras, cada qual composta por 12 mexilhões adultos (BRASIL, 2003). Sendo assim, foram analisados um total de 240 espécimes. Nos meses de junho e outubro de 2007 não foram realizadas coletas devido a impossibilidades técnicas.

Para as análises realizadas entre abril e setembro de 2007, os indivíduos foram coletados a partir das cordas mexilhoneiras confeccionadas no mês de março de 2007. Já nas análises realizadas de novembro de 2007 a março de 2008, os mexilhões foram provenientes das cordas confeccionadas no mês de outubro de 2007. Durante o mês de setembro de 2007, a estrutura de cultivo sofreu afundamento por quebra dos galões utilizados como flutuadores. Diante disso, mesmo havendo animais que resistiram ao afundamento, os mesmos poderiam ter-se contaminado com uma carga microbiana maior por terem tido contato com o sedimento. Fato que impossibilitou que os animais fossem utilizados no presente estudo e fazendo com que houvesse

a necessidade de se proceder uma nova semeadura para as coletas posteriores à setembro de 2007. A idade dos mexilhões *Perna perna*, determinada por seu tamanho, parece não influenciar os teores de contaminantes bacteriológicos em seus tecidos (HENRIQUES et al., 2000). Estudos fisiológicos em diferentes classes de tamanho demonstraram que a eficiência de absorção em *Perna perna* apresentou independência com relação ao peso do animal (RESGALLA JR. et al., 2006). Além disso, só foram utilizados para as análises microbiológicas mexilhões adultos, maiores que 60mm (AVELAR, 1998).

3.4 Coleta e Transporte das Amostras

A partir de cada uma das cordas mexilhoneiras, 12 animais eram retirados ao acaso e ao longo de toda a corda para compor cada amostra. Depois de removidos os epibiontes, os mexilhões tiveram suas valvas lavadas e escovadas utilizando-se a água do mar do próprio cultivo para retirada de sujidades. Cada amostra foi acondicionada em bolsa de polietileno (Ziploc[®]), seguindo até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em caixa isotérmica refrigerada com gelo reciclável. Todas as amostras foram processadas em até 3 horas a partir da coleta.

3.5 Preparo das Amostras

Para o preparo das amostras foram seguidas as recomendações do Ministério da Agricultura, publicadas na Instrução Normativa Nº 62 de 26 de agosto de 2003. As amostras foram preparadas adotando-se igual procedimento para cada uma delas.

Com a utilização de luvas estéreis, os animais eram retirados das bolsas de polietileno, colocados em bandejas previamente limpas com álcool 70°GL, no interior das quais se realizava outra lavagem dos mesmos com água do mar estéril. A partir deste ponto, os mexilhões tiveram suas valvas abertas assepticamente com auxílio de faca previamente esterilizada em autoclave. O bisco era cortado com tesoura também esterilizada. A massa e o líquido intravalvar dos animais foram recolhidos diretamente pelos copos estéreis de liquidificador, no interior dos quais a amostra era homogeneizada por um período total de 60 segundos, com intervalos a cada 15 segundos.

3.6 Análises Bacteriológicas

3.6.1 Coliformes totais e coliformes termotolerantes

Foi adicionado 25g da amostra a 225ml de Água Peptonada 0,1% (Himedia[®]), obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . A partir da diluição inicial (10^{-1}) foram inoculados volumes de 10mL e 1 mL em série de cinco tubos contendo Caldo Lauril Sulfato – CLS (Himedia[®]) em concentração dupla e simples, respectivamente. Também a partir dessa diluição inicial (10^{-1}) foi preparada a diluição 10^{-2} , a partir da qual foi transferido 1ml para outra séries de cinco tubos contendo CLS em concentração simples. Incubaram-se os tubos a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de 24 a 48 horas. Foram consideradas positivas as amostras que obtiveram formação de gás no interior dos tubos de Durham.

Cada tubo considerado positivo na etapa anterior foi repicado para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile 2% Lactose (Oxoid[®]) e Caldo E.C. (Oxoid[®]), os quais foram incubados por até 48 horas a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $45 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

De acordo com o número de tubos positivos confirmados, calculou-se o NMP utilizando-se a tabela do “software” Excel disponibilizada pelo FDA (BLODGETT, 2001). A técnica do Número Mais Provável não gera o valor zero quando a série de 5 tubos apresenta resultado negativo, mas sim $< 0,18$. Para fins de análises estatísticas foi utilizado o valor 0,18, uma vez que o valor zero não pode ser utilizado para fins de cálculo de médias geométricas.

3.6.2 *Salmonella* spp.

Foi pesada uma alíquota de 25g da amostra previamente preparada, a qual foi adicionada de 225ml de Água Peptonada 1% Tamponada (Himedia[®]), obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . Esta solução de pré-enriquecimento foi incubada a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16 a 20 horas. Para a etapa de enriquecimento seletivo, foram utilizados os Caldos Rappaport Vassiliadis (Merck[®]) e Selenito Cistina (Merck[®]), incubando-os a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 30 horas. A partir desses caldos, procedeu-se a semeadura em estrias em placas contendo Agar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (Himedia[®]) e Agar *Salmonella-Shigella* (Merck[®]), as quais foram incubadas por $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Quando do desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella*, estas foram semeadas em Agar Ferro Três Açúcares (Merck[®]), Agar Lisina Ferro (Merck[®]) e Agar Uréia (Merck[®]) e conseqüente reação sorológica frente ao anti-soro polivalente O (Probac[®]).

3.6.3 *Staphylococcus* coagulase positiva

A partir da diluição 10^{-1} preparada conforme descrito no item 3.6.1, foi semeado por esgotamento 0,25mL em cada uma das 4 placas de Petri contendo Agar Baird Parker (Himedia[®]) preparado previamente com emulsão de gema de ovo (Himedia[®]) e telurito de potássio 3,5%. As colônias típicas foram semeadas em Caldo Cérebro-Coração -BHI (Oxoid[®]) e incubadas a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Foram realizadas as provas de catalase e coagulase (BRASIL, 2003).

3.7 Análise Estatística

A análise dos dados das colimetrias, transformados previamente em raiz quadrada, foi realizada pela análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey para comparação de médias, ambos ao nível de 5% de significância (VIEIRA, 2006).

O estudo do nível de associação entre as variáveis abióticas e as colimetrias foi realizado através do coeficiente de correlação linear de Pearson ao nível de 5% de significância (VIEIRA, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Temperatura, Salinidade e os Mexilhões

Como já apresentados no Capítulo I da presente dissertação, os valores de temperatura superficial da água variaram entre 20 e 26°C com média anual de 23,1°C. Em verificações mensais de temperatura no litoral paulista, Henriques et al. (2007) registraram uma faixa que oscilou de 22,5 a 27,0°C no período de um ano, bem próximos dos resultados obtidos no presente estudo. Galvão et al. (2004) apresentaram uma amplitude de variação térmica da água de 25 a 30°C em diferentes pontos de coleta no litoral de Ubatuba (SP). Tais temperaturas verificadas nestes dois trabalhos coincidiram com a coleta de amostras de mexilhões *P. perna*.

Embora a temperatura tenha sido verificada pontualmente no momento das coletas para a presente dissertação, todos os valores situaram-se dentro do intervalo de tolerância relatado para a espécie *Perna perna* (HENRIQUES et al., 2007; RESGALLA JR. et al., 2007).

Os valores mensais de salinidade, medidos no momento das coletas, foram anteriormente apresentados no capítulo I. Variações de salinidades entre 33 e 36,5‰ estariam dentro da faixa confortável para a espécie *P. perna* (HENRIQUES et al., 2006; RESGALLA JR. et al., 2007).

Nestas condições de temperatura e salinidade, os mexilhões mantêm seu metabolismo normal, com as taxas de filtração, absorção, respiração e excreção normais para a espécie.

4.2 Coliformes Totais e Termotolerantes

Apesar do Brasil não apresentar padrões máximos para coliformes em moluscos bivalves *in natura* não consumidos crus, sua contagem fora realizada a fim de confirmar a condição higiênico-sanitária destes, uma vez que tal grupo de microrganismos vem sendo largamente utilizado como indicador da qualidade microbiológica em alimentos e da qualidade sanitária e ambiental da água do mar onde os mexilhões são cultivados, apesar do fato de sua presença não indicar necessariamente que patógenos estejam também presentes (SILVA-SOUZA, 2006; BARROS et al., 2005; GALVÃO, 2004; VIEIRA, 2004).

Os valores de coliformes totais (Ct) presentes nos mexilhões variaram de $<1,8 \times 10^{-1}$ a $1,61 \times 10^2$ NMP.g⁻¹ (tabela 2.1), enquanto que para os termotolerantes (CT) os valores estiveram entre $<1,8 \times 10^{-1}$ e $3,57 \times 10$ NMP.g⁻¹ (tabela 2.2). Observou-se que as médias de concentrações de coliformes encontradas nos tecidos dos bivalves nos meses de novembro de 2007 e fevereiro de 2008 foram significativamente superiores às obtidas nos demais meses ($P < 0,05$).

Para os cálculos de médias, os valores de $<0,18$ obtidos por características próprias da metodologia de análise utilizada foram considerados iguais a 0,18, e para melhor comparação com a legislação internacional, os valores em NMP g⁻¹ foram adequados e expostos nas tabelas abaixo na unidade de NMP.100g⁻¹. O cálculo da média expressa em números logarítmicos fora realizado para proceder-se comparação dos resultados obtidos para a água e os mexilhões.

Tabela 2.1 – Número Mais Provável de coliformes totais em duas amostras de mexilhões cultivados na Ilha Guaíba e suas médias em **NMP.100g⁻¹**, abr. 2007 – mar. 2008.

Mês	Amostra 1	Amostra 2	Média	Logaritmo da Média
Abr.	4,27 x 10 ²	9,43 x 10 ²	6,85 x 10 ²	2,84
Mai.	9,43 x 10 ²	4,27 x 10 ²	6,85 x 10 ²	2,84
Jul.	2,31 x 10 ²	2,31 x 10 ²	2,31 x 10 ²	2,31
Ago.	3,60 x 10 ¹	< 1,8 x 10 ²	2,70 x 10 ¹	1,43
Set.	3,60 x 10 ¹	9,20 x 10 ¹	6,40 x 10 ¹	1,81
Nov.	1,61 x 10 ⁴	1,61 x 10 ⁴	1,61 x 10 ⁴	4,21
Dez.	2,00 x 10 ¹	1,69 x 10 ²	9,45 x 10 ¹	1,97
Jan.	3,29 x 10 ²	1,09 x 10 ²	7,07 x 10 ²	2,85
Fev.	5,42 x 10 ³	5,42 x 10 ³	5,42 x 10 ³	3,73
Mar.	4,93 x 10 ²	4,93 x 10 ²	4,93 x 10 ²	2,69
Média Geométrica Total			4,71 x 10 ²	

Tabela 2.2 – Número Mais Provável de coliformes termotolerantes em duas amostras de mexilhões cultivados na Ilha Guaíba e suas médias em **NMP.100g⁻¹**, abr. 2007 – mar. 2008.

Mês	Amostra 1	Amostra 2	Média	Logaritmo da Média
Abr.	< 1,80 x 10 ^A	< 1,80 x 10 ^A	1,80 x 10 ¹	0,25
Mai.	9,20 x 10 ^A	< 1,80 x 10 ^A	5,50 x 10 ¹	0,74
Jul.	9,20 x 10 ^A	2,31 x 10 ²	1,61 x 10 ²	2,21
Ago.	< 1,80 x 10 ^A	< 1,80 x 10 ^A	1,80 x 10 ¹	0,25
Set.	< 1,80 x 10 ^A	< 1,80 x 10 ^A	1,80 x 10 ¹	0,25
Nov.	5,42 x 10 ^{3B}	1,72 x 10 ^{3B}	3,57 x 10 ³	3,55
Dez.	< 1,80 x 10 ^A	2,0 x 10 ¹	1,90 x 10 ¹	0,28
Jan.	< 1,80 x 10 ^A	< 1,80 x 10 ^A	1,80 x 10 ¹	0,25
Fev.	7,92 x 10 ^{2B}	7,92 x 10 ^{2B}	7,92 x 10 ²	2,9
Mar.	4,5 x 10 ^A	< 1,80 x 10 ^A	3,15 x 10 ¹	0,5
Média Geométrica Total			6,60 x 10 ^A	

NMP.100g-1 B – entre 300 e 6000

No Brasil, a análise de coliformes na carne dos moluscos *in natura* não é determinante para a liberação do produto para comércio e consumo. Entretanto, o mesmo não ocorre nos países membros da Comunidade Européia (CE), onde somente os bivalves que possuírem um número de coliformes termotolerantes de até 300NMP.100g⁻¹ de molusco podem ser diretamente comercializados – classe A (tabela 2.2). Os moluscos que apresentarem índices de 300 a 6.000 NMP.100g⁻¹ estariam dentro da classe B e necessitariam passar por processo de depuração. Tem-se ainda as classes C, para um índice entre 6.000 e 60.000 NMP.100g⁻¹, e D na qual os moluscos

teriam sua comercialização proibida quando apresentassem valores acima de 60.000 NMP.100g⁻¹ (RICHARDS, 2003).

Ao realizar análise de ostras nativas *in natura* cultivadas no Ceará, Vieira et al. (2007b) encontraram as seguintes variações nos índices de Ct e CT: <1,8 a 9200 NMP/g e <1,8 a 430NMP/g, respectivamente. Das 15 amostras de *Crassostrea rhizophorae* analisadas, 73,3% estariam enquadradas na classe A, 13,3% na classe B e 13,3% na classe C indicadas pela CE. Em ostras da mesma espécie comercializadas cozidas na praia do Futuro, também no Ceará, o número de coliformes a 45°C encontrado variou de 4 a 930NMP/g. Das 60 amostras analisadas, 43 delas, ou aproximadamente 70%, encontravam-se fora dos padrões estabelecidos pela ANVISA para este tipo de alimento cujo limite de coliformes termotolerantes é de até 5x10NMP/g.

Se compararmos os dados obtidos aos padrões europeus, das 20 amostras analisadas no presente estudo, 80% estariam aptas a serem comercializadas diretamente para a CE (classe A). As demais, coletadas nos meses de novembro e fevereiro, estariam na classe B e precisariam de depuração. Segundo Pereira et al. (2008b), se os mexilhões desta região forem pescados logo após períodos chuvosos aumenta-se a probabilidade de eles apresentarem maiores índices de coliformes termotolerantes. Tal fato instiga o alerta de que os mexilhões não devem ser coletados para o consumo humano logo após a ocorrência de chuvas. Cardonha et al. (2004) confirmam a correlação existente entre a maior presença de bactérias de origem fecal na água do mar e a ocorrência de precipitação pluviométrica em dias imediatamente precedentes à coleta das amostras. Dentre as variáveis ambientais estudadas por Lee e Morgan (2003), a precipitação de chuvas em dias anteriores à coleta das amostras foi a que apresentou maior influência, mesmo que indiretamente, sobre a contaminação dos moluscos com bactérias de origem fecal.

Em local onde a poluição é leve ou intermitente, como nas águas que rodeiam a ilha Guaíba, a colheita deve ser restringida nos períodos em que os moluscos possuem maior probabilidade de estarem contaminados. A situação ideal seria se possível fosse medir o nível de contaminação bacteriológica no cultivo e obter resultados instantâneos que revelassem quando os moluscos poderiam ser coletados e comercializados de maneira segura para o consumidor (BROCK et al., 1985; HENRIQUES et al., 2000). Contudo, os métodos usualmente recomendados no Brasil para análise de bactérias são laboriosos e seus resultados somente são conhecidos depois de, no mínimo, 96 horas (PINHEIRO JR. et al., 2002; BRASIL, 2003).

Nos Estados Unidos, o manejo nas áreas de cultivo classificadas como condicionalmente aprovadas é organizado em função de fatores abióticos, principalmente baseado na ocorrência de chuvas. Nestas áreas, os moluscos não devem ser coletados após períodos de fortes precipitações (BROCK et al., 1985).

Mediante a forte correlação evidenciada entre a presença de coliformes termotolerantes nos mexilhões e a precipitação de chuvas na região do cultivo ($r = 0,97$, tabela 2.4)), torna-se possível inferir que o acompanhamento da previsão dos índices pluviométricos pode indicar com maior praticidade ao maricultor quando a colheita dos moluscos pode ser realizada sem restrições ou quando pode ocasionar perigo à saúde de seus consumidores.

Tabela 2.3 – Coeficiente de correlação linear de Pearson entre os fatores abióticos (radiação global em W/m² e precipitação em mm) e os resultados colimétricos nos mexilhões, de temperatura e de salinidade da água do cultivo, abr. 2007 – mar. 2008.

Col.totais *Col. termot.* *Salinidade* *Temperatura* *Radiação global* *Precipitação*. Radiação global - 0,23-0,200,190,511 Precipitação **0,94*0,97*-0,86*0,19-0,061*** **Correlação linear de Pearson significativa (P<0,05)**

Após análise da correlação entre o NMP de Ct e CT e a salinidade (tabela 2.4), verificou-se que há correlação negativa entre os parâmetros ($r = -0,81$ para Ct e $-0,84$ para CT), confirmando a contaminação do ambiente aquático e, conseqüentemente dos mexilhões, por fortes chuvas que aconteceram às vésperas da coleta do mês de novembro, fazendo com que o valor da salinidade da água do mar neste mês decaísse. No mês de fevereiro, houve também a incidência de chuva no mesmo dia em que a coleta fora realizada. Na impossibilidade de se ter acesso aos dados de pluviosidade da região, a salinidade mostrou ser mais um dos fatores abióticos que pode ser utilizado para indicar ao maricultor a provável presença de um maior número de bactérias de origem fecal. É importante ressaltar que a salinidade pode ser aferida de maneira prática, *in situ* e no momento do manejo, com auxílio de um refratômetro portátil como o utilizado no presente estudo.

Tabela 2.4 – Coeficiente de correlação linear de Pearson entre a colimetria da água e dos mexilhões e os fatores abióticos de salinidade e temperatura, abr. 2007 – mar. 2008.

Col.tot.mex *Col. term.mex* *Col.tot.ag* *Col. term.ag* *Salinidade* *Temperatura* *Col.tot.mex.1* *Col. term.mex.1* *Col.tot.ag.1* *Col. term.ag.1* *Salinidade* **-0,81*-0,84*-0,63*-0,83*1** *Temperatura* **0,080,010,100,070,271*** **Correlação linear de Pearson significativa (P<0,05)**

Do ponto de vista da sanidade do animal, os níveis de coliformes presentes em seus tecidos também podem ser utilizados como indicativo de que o animal se encontra em estado saudável. Segundo Galvão, M. et al. (2006), frequência de parasitismo por bucefalídeos, principal patologia de mexilhões *Perna perna*, parece estar relacionada à contaminação bacteriológica por coliformes termotolerantes, o que pode ser explicado devido à maior incidência dos trematódeos em mexilhões provenientes de áreas mais abrigadas e com menor ação hidrodinâmica de ondas, geralmente com maior grau de contaminação de origem fecal.

Mexilhões podem contaminar-se com parasitos causadores de zoonoses, como os pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* quando o ambiente encontra-se contaminado por seus oocistos (GÓMEZ-COUSO et al., 2003). Por possuírem a mesma origem das bactérias fecais, torna-se comum a associação entre a presença de coliformes termotolerantes.

No ambiente marinho, as bactérias que ficam retidas nos tecidos dos moluscos bivalves podem ser provenientes de origem autóctone, como as pertencentes ao gênero *Vibrio*, ou alóctones como os coliformes. Em uma primeira análise, a ocorrência simultânea destes dois

grupos bacterianos no mar parece não ter correlação direta, principalmente devido às suas diferentes origens. Porém, alguns pesquisadores vêm salientando que a reprodução dos vibrios poderia ser favorecida pela poluição orgânica de natureza fecal, cuja presença pode ser constatada através das análises de coliformes termotolerantes (VIEIRA et al, 2007a). Ainda segundo estes autores (2007b), coliformes termotolerantes e *Vibrio* na água do estuário do Rio Jaguaribe, Ceará, apresentam correlação ($r = 0,5247$).

Mexilhões provenientes de regiões mais contaminadas por coliformes totais e fecais seriam menos resistentes a altas temperaturas (HENRIQUES et al., 2007), a baixas salinidades (HENRIQUES et al., 2006) e a exposição ao ar (HENRIQUES et al., 2003; MOLES e HALE, 2003), o que acarretaria maior índice de mortalidade durante a sua comercialização. As médias anuais de coliformes totais encontradas no presente estudo são inferiores às detectadas nas pesquisas de Henriques et al. (2003; 2006 e 2007), contudo as médias de coliformes termotolerantes são maiores, podendo indicar alguma susceptibilidade dos animais da ilha Guaíba a situações de estresse como exposição ao ar, baixas salinidades e altas temperaturas. Porém, outros autores demonstram que os bivalves possuem mecanismos naturais de defesa do animal. Um exemplo são os hemócitos, células da hemolinfa responsáveis por eliminar bactérias, influenciando diretamente sobre a capacidade de depuração desses moluscos. A competência destes mecanismos tem relação com a variedade bacteriana presente e com a integridade do sistema imunológico do animal (CANESI et al., 2001; AKAISHI, 2007).

4.3 *Salmonella* spp.

Todas as amostras de mexilhão analisadas apresentaram ausência de *Salmonella* spp., concordando com as pesquisas realizadas com a mesma espécie por Galvão (2004) e Henriques et al. (2007) também na região sudeste do Brasil e com os parâmetros estabelecidos nacionalmente para alimentos de origem animal. Na Nova Zelândia, Brock et al. (1985) também não isolaram *Salmonella* das amostras de moluscos testadas, assim como Miller et al. (2006) nos EUA.

Das 59 amostras analisadas por Henriques et al. (2000), apenas uma apresentou a presença salmonelas na carne do molusco.

4.4 *Staphylococcus Coagulase Positiva*

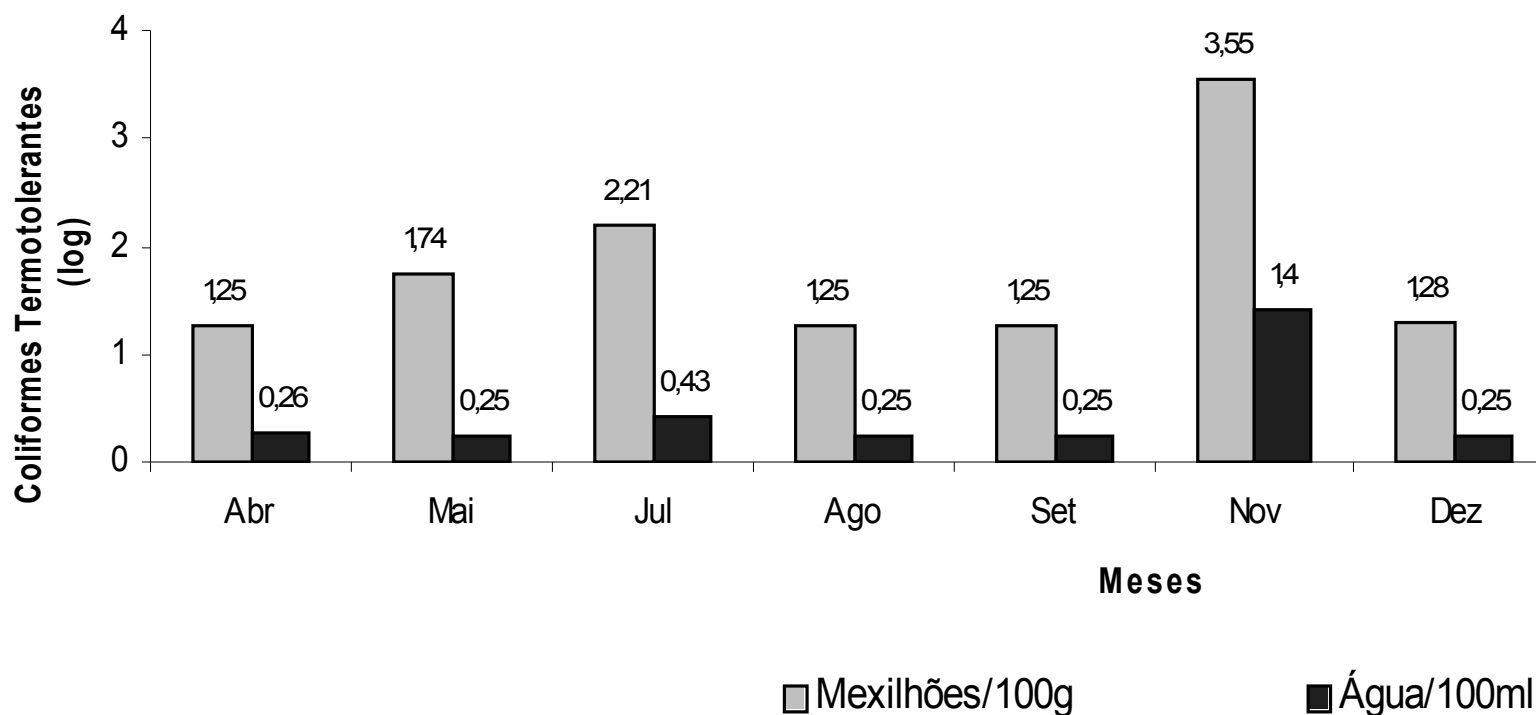
Apesar de terem sido isoladas colônias típicas de *S. aureus* das amostras, nenhuma delas foi capaz de produzir a enzima coagulase. Todas as amostras de mexilhões analisadas apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pelo regulamento técnico Resolução RDC nº. 12 da ANVISA (BRASIL, 2001).

Os resultados obtidos foram semelhantes aos de Galvão, J. et al. (2006) em mexilhões provenientes de Ubatuba, SP, analisados no período de novembro de 2002 a março de 2003. Henriques et al. (2000) também não registraram a de *S. aureus* nas amostras de mexilhões provenientes de bancos naturais do litoral da Baixada Santista, SP.

4.5 Água do Cultivo x Mexilhões

Embora exista correlação entre o número de coliformes das amostras de água e de mexilhão (tabela 2.4), os valores obtidos nos mexilhões são maiores (Figura 2.2), concordando com Brock et al. (1985), Solic et al. (1999), Galvão (2004) e Vieira et al. (2007b). As análises de variância foram realizadas por ANOVA, observando-se que as médias do NMP de coliformes

totais e termotolerantes para o mexilhão foram significativamente superiores ($p < 0,05$) às obtidas para a água de cultivo (Anexo B).



aumenta e apresenta índices bem maiores do que na água em que eles são cultivados, demonstrando seu poder concentrador.

Diversos fatores contribuem para uma maior detecção de bactérias na carne dos moluscos. Apesar do comportamento bacteriano nos animais ser ainda pouco conhecido, sabe-se que o interior do corpo dos bivalves representa maiores possibilidades de manutenção de células cultiváveis do que na água. Além de ser este um ambiente mais propício para haver a reprodução bacteriana, a radiação solar seria um fator de redução no número de *E. coli* detectáveis na água do mar pelos métodos de cultura. A luz solar contribui para a permanência das células no estado Viável Mas Não-Cultivável na água (POMMEPUY, 1996; VIEIRA, 2004; CASTRO et al., 2006).

A taxa de filtração é um outro fator que influencia no acúmulo de bactérias pelos moluscos e este processo é regulado decisivamente pela temperatura ambiental (SOLIC et al., 1999). A taxa de filtração da espécie *Perna perna* aumenta com a temperatura até o limite de aproximadamente 25°C, quando esta taxa passa a reduzir-se com o aumento da temperatura (REGALLA JR. et al., 2007).

Apesar disso, não foi verificada correlação significativa entre os dados de NMP de coliformes e a temperatura da água do cultivo (Tabela 2.4). Tais resultados apontam que a temperatura da água não é um dos fatores mais atuantes sobre as taxas de acúmulo de coliformes nos bivalves desta região. Provavelmente, a pouca amplitude de variação térmica verificada neste experimento, de 21 a 26°C, não foi suficiente para atuar modificando significativamente a taxa de filtração dos moluscos (GALVÃO, 2004; HENRIQUES et al., 2007).

Em estudo conduzido por um período de dois anos na Croácia, Solic et al. (1999) verificaram que as maiores médias de CT tanto nos moluscos quanto na água ocorreram durante o verão e as menores no período de inverno. Porém, quando os índices de coliformes presentes na água são os mesmos em estações frias e quentes, mexilhões podem bioacumular mais CT durante o inverno do que no verão. Provavelmente, as temperaturas observadas no verão deste país são superiores ao limiar de filtração máxima. Tais autores demonstram ainda que quando as concentrações bacterianas nos moluscos são pequenas, o acúmulo aumenta conforme aumenta a temperatura. Entretanto, depois de determinada concentração de bactérias presentes em seus tecidos, taxa de clareamento e a temperatura tornam-se variáveis inversamente proporcionais. O fator de concentração de coliformes fecais nos mexilhões parece ter maior influência das concentrações bacterianas presentes na água do que propriamente da temperatura. Este fato também pôde ser verificado na presente dissertação através das análises entre as variáveis CT nos mexilhões e CT na água cuja correlação foi bem maior ($r = 0,99$, Tabela 2.4) que CT nos mexilhões e temperatura da água ($r = 0,01$, Tabela 2.4).

A Comunidade Européia baseia-se principalmente na análise microbiológica dos próprios moluscos para avaliar sua sanidade e qualidade como alimento. No Brasil, além da análise de no mínimo 15 amostras anuais da água do cultivo, a legislação também apresenta os limites microbiológicos para os próprios moluscos, porém não estipula qual deve ser a amostragem e tampouco a periodicidade destas análises. O Instituto Francês de Estudos sobre o Mar – IFREMER – defende a utilização dos próprios moluscos devido à grande probabilidade de flutuação de resultados obtidos a partir de amostras de água, influenciadas por marés, correntes, ventos, chuvas e outros fatores relacionados à intensa dinâmica das zonas costeiras e estuarinas.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo possibilitou-nos uma posição qualitativa quanto a critérios sanitários: considerando os padrões microbiológicos estabelecidos nacional e internacionalmente para as bactérias em questão, os mexilhões cultivados na Ilha Guaíba encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente, sugerindo estarem aptos à comercialização e consumo humano durante o período estudado.

Os mexilhões da espécie *Perna perna* apresentam mais coliformes em seus tecidos do que os presentes na água do cultivo quando esta se encontra contaminada, principalmente devido à característica de bioacumulação inerente aos moluscos bivalves filtradores.

O fator abiótico que apresenta maior correlação com a contaminação dos moluscos por coliformes é a precipitação pluviométrica seguido pela salinidade da água. Estas duas variáveis abióticas podem ser utilizadas pelos maricultores desta região como indicativas de períodos nos quais a contaminação bacteriológica dos animais pode ocorrer mais intensamente, não sendo indicada a colheita durante estes períodos.

Para garantir uma ampla segurança comercial dos moluscos cultivados na região seriam necessárias análises freqüentes, nos próprios mexilhões, não só das bactérias avaliadas no presente estudo, como também das do gênero *Vibrio* e de biotoxinas, vírus entéricos, protozoários, dentre outros possíveis contaminantes como metais tóxicos.

CONCLUSÕES FINAIS

Tanto a água do mar quanto os mexilhões cultivados na Ilha Guaíba apresentam-se dentro dos padrões estabelecidos para as bactérias do grupo dos coliformes, *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva.

Do ponto de vista bacteriológico, o cultivo instalado na Ilha Guaíba encontra-se adequado à criação de moluscos bivalves.

Os moluscos apresentam maiores índices de coliformes do que os presentes na água do cultivo.

O fator abiótico que apresenta maior correlação com a contaminação colimétrica é a precipitação de chuvas, seguida pela salinidade. Estes dois fatores abióticos podem ser utilizados pelos maricultores como indicativos de épocas mais propensas à maior contaminação bacteriológica de origem fecal nos moluscos e, conseqüentemente, períodos menos indicados à pesca dos animais para consumo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D. M. S. Ecotoxicologia marinha. In: SILVA-SOUZA, A. T. (org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá: Abrapoa, 2006. p. 19-41.

AKAISHI, F. M. Avaliação dos efeitos tóxicos de esgoto doméstico tratado e não-tratado em bivalve marinho *Mytilus edulis*. 2007. 121 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

ARAÚJO, A. L. O desenvolvimento da maricultura na Baía de Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 20., 2007, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos do XX EBRAM**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2008. p. 130-132.

AVELAR, J. C. L. **Manual de Mitilicultura**. 1 ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 1998. 164p.

BARARDI, C. R. M.; SINCERO, T. C. M; CORREA, A. A. Contaminação de moluscos bivalves por patógenos humanos. In: SILVA-SOUZA, A. T. (org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá: Abrapoa, 2006. p. 95-117.

BARROS, L. M. O.; THEOPHILO, G. N. D.; COSTA, R. G.; RODRIGUES, D. P.; VIEIRA, R. H. S. F. V. Contaminante Fecal da Ostra *Crassostrea rhizophorae* Comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n.3, p. 285-289, 2005.

BASTOS, M. P.; MELLO, S.; SAAD, A.; MOSCHEN F.; COSTA, A. **Desenvolvimento e Apoio de Atividades de Maricultura Sustentáveis no Estado do Rio de Janeiro**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2., 2004, Belo Horizonte. Anais do Congresso Brasileiro de Extensão Universitária. Disponível em: <http://www.ufmg.br/congrent/Meio/Meio54.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2007.

BEJ, A. K.; MAHBUBANI, M. H.; BOYCE, M. J.; ATLAS, R.M. Detection of *Salmonella* spp. in Oysters by PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 60, p. 368-373, 1994.

BLODGETT, R. Most Probable Number from serial dilutions. In: **Bacteriological Analytical Manual Online**. FDA, 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>. Acesso em: 25 fev. 2007.

BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. **Aqüicultura: Uma Visão Geral Sobre a Produção de Organismos Aquáticos no Brasil e no Mundo**. Curitiba: Grupo integrado de aqüicultura e estudos ambientais, 2003. 128 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa n. 62 de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises**

Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União de 18 setembro 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos.** Diário Oficial da União de 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 451 de 19 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus Anexos I, II e III.** Diário Oficial da União de 22 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA. Resolução n. 20 de 18 de junho de 1986. **Dispõe sobre a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional.** Diário Oficial da União de 30 de julho de 1986.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA. Resolução n. 357 de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.** Diário Oficial da União de 18 de março de 2005a.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Cidades@.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>. Acesso em: 16 maio 2008.

BRASIL. Presidência da República. Decreto n. 5.564 de 19 de outubro de 2005. **Institui o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves - CNCMB, e dá outras providências.** Diário Oficial da União de 20 de outubro de 2005b.

BRASIL. Presidência da República. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca – SEAP. Instrução Normativa n. 02 de 13 de fevereiro de 2007. **Resolve criar o Comitê Estadual e os Comitês Locais dos Planos Locais de Desenvolvimento da Maricultura (PLDM) do Estado do Rio de Janeiro.** Diário Oficial da União de 16 fevereiro 2007.

BRINKHORST, L. J. Introduction by the Minister of Agriculture, Nature Management and Fisheries, Laurens Jan Brinkhorst, at the opening of the Food Safety & HACCP Forum: Food safety—a shared responsibility. **Food Control**, v. 14, n. 2, p. 71-72, 2003.

BROCK, R. L.; GALBRAITH, G. R.; BENSEMAN, B. A. Relationships of rainfall, river flow, and salinity to faecal coliform levels in a mussel fishery. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 19, p. 485-494, 1985.

CANESI, L. PRUZZO, C.; TARSI, R. GALLO, G. Surface interactions between *Escherichia coli* and hemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. Leading to efficient bacterial clearance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 464-468, 2001.

CARDONHA, A. M. S.; VIEIRA, R. H. S. F.; HOLLAND, N.; MELO, J. L. S.; BEZERRA, M. A. S.; DAMASCENO, K. S. F. S. C. Monitoramento da poluição da água das galerias pluviais e do mar por meio de avaliações físico-químicas e microbiológicas. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 38, p. 71-78, 2005.

CARDONHA, A. M. S.; VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; MACRAE, A.; PEIRANO, G.; TEOPHILO, G. N. D. Fecal Pollution in Water From Storm Sewers and Adjacent Seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. **International Microbiology**, v. 7, p. 213-218. 2004.

CARO, A.; GOT, P.; LESNE, J.; BINARD, S.; BALEUX, B. Viability and Virulence of Experimentally Stressed Nonculturable *Salmonella typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3229-3232, 1999.

CARVALHO, A. C. F. B., CORTEZ, A. L., *Salmonella* spp. em Carcaças, Carne Mecanicamente Separada, Lingüiças e Cortes Comerciais de Frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, 2005.

CASTRO, H. M. P. Efeito da radiação solar e da salinidade sobre o crescimento de *Escherichia coli*. 2003. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

CASTRO, H. M. P.; VIEIRA, R. H. S. F.; FONTELES-FILHO, A. A.; ALBUQUERQUE, W. F.; HOFER, E. Efeito da radiação solar na sobrevivência de *Escherichia coli*. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 39, p. 28-33, 2006.

CHANDRAN, A.; HATHA, M. Relative survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in a tropical estuary. **Water Research**, v. 39, p. 1397-1403, 2005.

CONSELHO DA COMUNIDADE EUROPÉIA (CCE). **Diretriz do Conselho Europeu 91/492/EEC de 15 de Julho de 1991**.

CRAPEZ, M. A. C. Bactérias Marinhas. In: PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. (org.). **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 83-101.

CROCI, L.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L.; TOTI, L. Effects of Depuration of Molluscs Experimentally Contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* 01 and *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 460-465, 2002.

DE DONNO, A.; LIACI, D.; BAGORDO, F.; LUGOLI, F. GABUTTI, G. *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of microbiological pollution of coastal waters: a study conducted in the Salento Peninsula (Italy). **Journal of Coastal Research**, v. 24, n. 1A, p. 216-221, 2008.

DIEGUES, A. C. **Para uma aqüicultura sustentável do Brasil**. Artigos nº. 3. São Paulo: NUPAUB-USP, 2006. 26 p.

DONG, F. M. **The Nutritional Value of Shellfish**. Published in part by Grant #NA76RG0119, Project A/PC-5, from the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) to Washington Sea Grant Program. University of Washington, 2001. p. 1-8.

FERREIRA, V. M. **Deteção de ácido ocaáico produzido por *Dinophysis* spp. (Ehremberg, 1839), em mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758), em situação de primavera e verão, nas ilhas Guaíba e Madeira, baía de Sepetiba, Rio de Janeiro**. 2004. 53 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

FERREIRA, V. M. Importância do monitoramento para a malacocultura: perspectivas para a pectinocultura. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 20., 2007, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos do XX EBRAM**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2007. p. 137-138.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **National Aquaculture Sector Overview**: Brasil. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_brazil/en#tcNB0122>. Acesso em: 21 jul. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Síntesis regional del desarrollo de la acuicultura 1. América Latina y el Caribe – 2005**. FAO Circular de Pesca, nº 1017/1. Roma: FAO, 2006a. 177 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **State of World Aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper, nº 500. Roma: FAO, 2006b. 134 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO; WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Comisión del Codex Alimentarius**. Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias. ALINORM 04/27/18. Ginebra: WHO, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA/CFSAN. **Bad Bug Book**: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>>. Acesso em: 20 mar. 2007.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002. 182 p.

FUJIOKA, R. S.; HASHIMOTO, H. H.; SIWAK, E. B.; REGINALD, H. F. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 690-696, 1981.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA DE MEIO AMBIENTE – FEEMA. **Baía de Sepetiba**. Disponível em: <<http://www.feema.rj.gov.br/baia-sepetiba.asp?cat=75>>. Acesso em: 15 jun. 2008a.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA DE MEIO AMBIENTE – FEEMA. **Balneabilidade de praias**. Disponível em: <http://www.feema.rj.gov.br/balneabilidade-praias.asp?cat=75>. Acesso em: 21 jul. 2008b.

FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESCA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – FIPERJ. **Maricultura**. Disponível em: <<http://www.fiperj.rj.gov.br/maric.html>>. Acesso em: 18 mar. 2007.

FURLAN, E. F. **Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos**. 2004. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GABUTTI, G.; DE DONNO, A.; BAGORDO, F.; MONTAGNA, M. T. Comparative survival of faecal and human contaminants and use of *Staphylococcus aureus* as an effective indicator of human pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 697-700, 2000.

GALVÃO, J. A. **Qualidade Microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP**. 2004. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GALVÃO, J. A.; FURLAN, E. F.; SALÁN, E. O.; PORTO, E.; OETTERER, M. Características Físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados na região de Ubatuba, SP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1124-1129, 2006.

GALVÃO, M. S. N.; HENRIQUES, M. B.; PEREIRA, O. M.; MARQUES, H. L. A. Ciclo reprodutivo e infestação parasitária de mexilhões *Perna Perna* (Linnaeus, 1758). **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 59-71, 2006.

GÓMEZ-COUSO, H.; FREIRE-SANTOS, F.; MARTÍNEZ-URTAZA, J.; GARCÍA-MARTÍN, O.; ARES-MAZÁS, M. E. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 97-105, 2003.

HENRIQUES, M. B.; MARQUES, H. L. A.; LOMBARDI, J. V.; PEREIRA, O. M.; GARCIA, A. L. B. Influência da contaminação bacteriológica sobre a resistência do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) à exposição ao ar. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 36, p. 95-99, 2003.

HENRIQUES, M. B.; MARQUES, H. L. A.; PEREIRA, O. M. ; LOMBARDI, J. V. Resistência do mexilhão *Perna perna* a baixas salinidades e sua relação com a contaminação bacteriológica. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 107-114, 2006.

HENRIQUES, M. B.; PEREIRA, O. M.; MARQUES, H. L. A. Resistência do mexilhão *Perna perna* a altas temperaturas e sua relação com a contaminação bacteriológica. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 40, n. 1, p. 52-57, 2007.

HENRIQUES, M. B.; ZAMARIOLI, L. A.; PEREIRA, O. M.; FAUSTINO, J. S. Contaminação Bacteriológica no Tecido Mole do Mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), nos Bancos Naturais do Litoral da Baixada Santista, Estado de São Paulo. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 33, p. 69-76, 2000.

HERVIO-HEATH, D.; COLWELL, R. R.; DERRIEN, A.; ROBERT-PILLOT, A.; FOURNIER, J. M.; POMMEPUY, M. Occurrence of Pathogenic *Vibrio* in Coastal Areas of France. *Journal of Applied Microbiology*, 92, p. 1123-1135, 2002.

1 HUSS, H. H.; ABABOUCHE, L. GRAN, L. **Assessment and Management of Seafood Safety and Quality**. FAO Fisheries Technical Paper n°. 444. Rome: FAO, 2003. 230 p.

HUSS, H. H. **Garantia da Qualidade dos Produtos da Pesca**. FAO Documento técnico sobre as pescas, n° 334. Roma: FAO, 1997. 176 p.

INSTITUTO PEREIRA PASSOS – IPP. **Relatório de desenvolvimento humano do Rio de Janeiro: meio ambiente e sustentabilidade**. Rio Estudos n° 9. Rio de Janeiro: Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro, 2001.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de Los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1978.

JORGE, L. C.; GARCIA, L. M.; MARTINS, V. B.; KOSAWA, A.; PAULS, E. Interações dos processos sócio-ambientais nas bacias das Enseadas de Icaraí e São Francisco, Niterói (RJ). 2. Organismos aquáticos como bioindicadores da qualidade ambiental com enfoque no mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), em Niterói-RJ. **Mundo & Vida**, v. 3, n. 2, p. 108-116, 2002.

LENOCH, R. Saúde Pública e os Moluscos Marinhos Cultivados. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 28 e 29, p. 65-70, 2003.

LEE, R. J.; MORGAN, O. C. Environmental factors influencing the microbiological contamination of commercially harvested shellfish. **Water Science and Technology**, v. 47, n. 3, p. 65-70, 2003.

LIMA, F.C.; ABREU, M.G.; MESQUITA, E.F.M. Monitoramento histopatológico de mexilhão *Perna perna* da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 2, 2001.

LIMA JUNIOR, R. G. S.; ARAÚJO, F.G.; MAIA, M. F.; PINTO, A. S. S. B. Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande bays, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research Section A**, v. 89, p. 171-179, 2002.

LOURENÇO, A. J.; FERREIRA, V. M.; SILVA, P. P. O.; ROSA, C. A. R.; DIREITO, G. M.; OLIVEIRA, G. M. Evidência de depuração natural da toxina diarreica ácido ocaidaico em mexilhões *Perna perna* (LINNÉ, 1758) cultivados em fazenda de maricultura na baía de ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 91-94, 2007.

- MAGALHÃES, A. R. M.; FERREIRA, J. F. Patologia e manejo em malacocultura. In: SILVA-SOUZA, A. T. (org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá: Abrapoa, 2006. p. 79-94.
- MAGALHÃES, A. R. M.; SCHAEFER, A. L. C.; FOSSARI, T. Mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758): nativo sim do Brasil. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 20., 2007, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos do XX EBRAM**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2007. p. 237.
- MAIA, C. B.; ALMEIDA, A. C. M.; MOREIRA, F. R. Avaliação do teor de chumbo em mexilhões da espécie *Perna perna* na Região Metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. **J. Braz. Soc. Ecotoxocol.**, v. 1, n. 2, p. 195-198, 2006.
- MARENZI, A. W. C.; BRANCO, J. O. O mexilhão *Perna perna* (Linnaeus) (Bivalvia, Mytilidae) em cultivo na Armação do Itapocoroy, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, v. 22, n. 2, p. 394-399, Junho 2005.
- MARINÉ, G. F. **Detecção de ácido ocadaico em cultivo de mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) e identificação do fitoplâncton potencialmente produtor, na enseada de Maciéis, Angra dos Reis, RJ**. 2007. 50f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- METRI, R.; ROCHA, R. M.; MARENZI, A. Epibiosis reduction in a mussel culture *Perna perna* (Linné, 1758). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 325-331, 2002.
- MILLER, W. A.; MILLER, M. A.; GARDNER, I. A.; ATWILL, E. R.; BYRNE, B. A.; JANG, S.; HARRIS, M.; AMES, J. JESSUP, D.; PARADIES, D.; WORCESTER, K.; MELLI, A.; CONRAD, P. A. Salmonella spp., Vibrios pp., Clostridium perfringens, and Plesiomonas shigelloides in marine and freshwater invertebrates from costal California ecosystems. **Microbial Ecology**, v. 52, p. 198-206, 2006.
- MOLES, A.; HALE, N. Use of physiological responses in *Mytilus trossulus* as integrative bioindicators of sewage pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 954-958, 2003.
- NETO, J. D. (coord.); SACCARDO, S. A.; BERNARDINO, G. Recursos pesqueiros: pesca extrativa e aqüicultura In: Relatório Perspectivas do Meio Ambiente para o Brasil – Geo Brasil. Brasília: IBAMA, 2001. 23 p.
- NYBAKKEN, J. W. **Marine Biology: An Ecological Approach**. 5. ed. Benjamin Cumming, 2001. 512 p.
- NYELETI, C.; COGAN, T. A.; HUMPHREY. Effect of sunlight on the survival of *Salmonella* on surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 617-620, 2004.
- OLIVEIRA, E. R. N.; VIEGAS, E. M. M. Qualidade do Pescado In: RANZANI-PAIVA et al. (eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 415-426.

OLIVEIRA, M. P.; ALMEIDA, M. N. **Malacologia**. Juiz de Fora: Editar, 2000. 216 p.

OLIVEIRA, M. P. C.; MAGALHÃES, M. F. A importância ecológica e social do projeto Cultivo de Mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na ilha de Itacuruçá (RJ), Brasil. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 20., 2007, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos do XX EBRAM**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2008. p. 349.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE – OPS. **Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos**. Disponível em: <<http://www.panalimentos.org/sirveta/e/index.htm>>. Acesso em: 21 Nov. 2007.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de estação experimental de cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 387-390, 2007a.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrios* patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes no Rio de Janeiro: um alerta para a Saúde Pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 300-303, 2007b.

PEREIRA, M.M.D.; SILVA, P.P.O.; VALADÃO, R.C.; FERREIRA, V.M.; OLIVEIRA, G.M.; GOMES, T.A.; MARINÉ, G.F.; LOURENÇO, A.J. Relação entre a qualidade bacteriológica da água do mar e dos mexilhões *Perna Perna* cultivados na Ilha Guaíba, RJ. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE PESCADO, 3., 2008, São Vicente. **Anais do III Simpósio de Controle de Pescado**. São Vicente: Instituto de Pesca, 2008a. p. 1 CD-ROM.

PEREIRA, M.M.D.; SILVA, P.P.O.; VALADÃO, R.C.; GOMES, T.A.; FERREIRA, V.M.; AMORIM, E.; OLIVEIRA, G.M. A família Enterobacteriaceae como indicadora da qualidade sanitária dos mexilhões *Perna perna* cultivados na Ilha Guaíba, Baía de Sepetiba, RJ. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, 3., 2008, Viçosa. **Anais do III Simpósio Mineiro de Microbiologia de Alimentos e III Fórum de Debates Sobre Vigilância Sanitária**. Viçosa: UFV e SBCTA Regional Minas Gerais, 2008b. 1 CD-ROM.

PEREIRA, O. M.; HENRIQUES, M. B.; ZENEBON, O.; SAKUMA, A.; KIRA, C. S. Determinação dos teores de Hg, Pb, Cd, Cu e Zn em moluscos (*Crassostrea brasiliana*, *Perna perna* e *Mytella falcata*). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 61, n. 1, p. 19-25, 2002.

PINHEIRO JR., A.A.; OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J. C. A. P. Colimetria de água marinha em áreas de cultivo e extrativismo de mexilhões no município de Niterói, RJ. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 4, p. 432-440, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352002000400016&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 nov. 2006.

PIPE, R.K.; COLES, J. A. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, p. 581-595, 1995.

POMMEPUY, M.; BUTIN, A. DERRIEN, A.; GOURMELON, M; COLWELL, R.R. Retention of enteropathogenicity by Viable but Nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4621-4626, 1996.

PROCTOR, L. M.; SOUZA, A. C. Method for enumeration of 5-cyano-2,3-dyotil tetrazolium choride (CTC)-active cells and cell-specific CTC activity of bentic bacteria in Riverine, estuarine and coastal sediments. *Journal of Microbiological Methods*, v. 43, p. 213-222, 2001.

REED, P. A.; FRANCIS-FLOYD, R. **Vibrio infections of fish**. Florida Cooperative Extension Service Document FA-31. Gainesville: University of Florida, 1996.

REGALLA JR., C.; BRASIL, E. S. Efeito da concentração e da qualidade do alimento nas taxas fisiológicas do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Atlântica**, v. 29, n. 1, p. 47-59, 2007.

REGALLA JR., C.; BRASIL, E. S.; SALOMÃO, L. C. Physiological rates in different classes of sizes of *Perna perna* (Linnaeus, 1758) submitted to experimental laboratory conditions. **Braz. J. Biol.**, v. 66, n. 1B, p. 325-336, 2006.

REGALLA JR., C.; BRASIL, E. S.; SALOMÃO, L. C. The effect of temperature and salinity on the physiological rates of the mussel *Perna perna* (Linnaeus 1758). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 543-556, 2007.

RICHARS, G. P. The evolution of molluscan shellfish safety. In: VILLALBA, A.; REGUERA, B.; ROMALDE, J. L.; BEIRAS, R. (eds.). **Molluscan Shellfish Safety**. Santiago de Compostela: IOC, 2003. p. 221-245.

RODRIGUES, M. M. **Características das espécies de *Vibrio* isoladas de mexilhões (*Perna perna*) cultivados em sistema de longline na Baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro**. 2005. 49 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

ROZEN, Y.; BELKIN, S. Survival of enteric bacteria in seawater. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 513-529, 2001.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. Animais Bilaterais In: **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996. p. 412-449.

SALÁN, E. ; GALVAO, J. A. ; FURLAN, E. F. ; PORTO, E. ; GALLO, C. R. ; OETTERER, M. Quality of cultivated and commercialized mussels in Ubatuba, SP- monitoration of *B. cereus* and *S. aureus* growth after post-catching processing. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 152-159, 2008.

SCOTT, P. C. Considerações sobre o uso da Baía de Sepetiba, RJ para maricultura apoiadas num Sistema de Informação Geográfica (SIG). Relatório Preliminar nº. 98.001, série 007V-2. Rio de Janeiro: Universidade Santa Úrsula, 1998. 50 p.

SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – SEMA. **Uma Avaliação da Qualidade das Águas Costeiras do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Fundação Estudos do Mar, 1998. 194 p.

SHERR, E.; SHERR, B.. Marine microbes: an overview. In: KIRCHMAN, D. L. (ed.). **Microbial ecology of the oceans**. New York: Wiley-Liss, 2000. p. 13-46.

SILVA, C. R.; LEMIESZEK, M. B.; FERREIRA, J. F.; RIBEIRO, R. H. C.; CREPPY, E.; MATIAS, W. G. Genotoxicidade do ácido ocadáico: indução de micronúcleos em mexilhões *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 56-59, 2001.

SOLIC, M.; KRSTULOVIC, N. Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity, and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. **Marine Pollution Bulletin**, v. 24, n. 8, p. 411-416, 1992.

SOLIC, M.; KRSTULOVIC, N.; JOZIC, S.; CURAC, D. The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. **Environment International**, v. 25, n. 8, p. 991-1000, 1999.

SOUSA, O. V., VIEIRA, R. H. S. F., MENEZES, F. G. R., REIS, C. M. F.; HOFER E. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó River Estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 59-62, 2004.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.

STEWART, J. E.; MARKS, L. J.; GILGAN, M. W.; PFEIFFER, E.; ZWICKER, B. M. Microbial utilization of the neurotoxin domoic acid: blue mussels (*Mytilus edulis*) and soft shell clams (*Mya arenaria*) as sources of the microorganisms. **Can. J. Microbiol.**, v. 44, p. 456-464, 1998.

SUPLICY, F. Do cultivo de mexilhões para a aquicultura: o momento do Brasil. **Panorama da Aquicultura**. v. 11, n. 68, p. 25-38, 2001.

SUPLICY, F. **Licenciamento ambiental e regularização da maricultura**. In: SEMINÁRIO ESTADUAL DE MARICULTURA, 5., 2007, Cabo Frio. Disponível em: <<http://www.sebraerj.com.br/main.asp?View=%7B65250F7C-DF79-453D-8E18-D50C415A3DB0%7D>>. Acesso em: 21 jul. 2008.

THATCHER, F. S.; CLARK, D. S. **Foods 1 - Their Significance and Methods of Enumeration**. Toronto: University of Toronto, 1968. 234 p.

TORRENS, B. M. O. Estimativa da Matéria Sólida Orgânica Produzida por Mexilhões *Perna perna* em Áreas de Produção na Baía da Babitonga – SC. 2005. 62f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, São Paulo, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Doenças Microbianas do Sistema Digestivo In: **Microbiologia**. 6. ed. Tradução de Agnes Kiesling Casali et al. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 658-691. Original em inglês.

VIEIRA, R. H. S. F. (coord.). **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado**. São Paulo: Varela, 2004. 380 p.

VIEIRA, R. H. S. F.; CASTRO, H. M. P.; REIS, C. M. F.; REIS, E. M. F.; MADRID, R. M.; HOFER, E. Aspectos Microbiológicos de Águas Estuarinas nos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 40, n. 1, p. 89-95, 2007a.

VIEIRA, R. H. S. F.; CATTER, K. M.; SAKER-SAMPAIO, S.; RODRIGUES, D. P.; THEOPHILO, G. N. D.; FONTELES-FILHO, A. A. The stormwater drain system as a pollution vector of the seashore in Fortaleza (Ceará State, Brazil). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 294-298, 2002.

VIEIRA, R. H. S. F.; NASCIMENTO, S. C. O.; MENEZES, F. G. R.; NASCIMENTO, S. M. M.; LUCENA, L. H. L. Influência das águas das galerias pluviais como fator da poluição costeira, Fortaleza, Ceará. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 36, p. 123-127, 2003.

VIEIRA, R. H. S. F.; VASCONCELOS, R. F.; CARVALHO, E. M. R. Quantificação de vibrios, de coliformes totais e termotolerantes em ostra nativa *Crassostea rhizophorae*, e na água do estuário do rio Jaguaribe, Fortim-CE. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 01, p. 01-13, 2007b. Disponível em: < <http://www.higieneanimal.ufc.br/images/trabalhos.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2007.

VIEIRA, S. **Análise de variância (ANOVA)**. São Paulo: Atlas, 2006. 204 p.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.

WINN, W. C.; ALLEN, S. D. JANDA, KONEMAN, E. W.; W. M.; PROCOP, G. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. **Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido**. 6.ed. Tradução de Eiler Fritsch Toros et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565 p. Original em inglês.