



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**BACTERIOLOGIA DA OSTRÁ *Crassostrea rhizophorae* E DA ÁGUA DO  
ENTORNO NO ESTUÁRIO DO RIO PACOTI (EUSÉBIO-CEARÁ) -  
IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli* E SUA SUSCEPTIBILIDADE A  
DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.**

**MAYLINQUE ALBUQUERQUE ATAYDE**

---

**Monografia apresentada ao Departamento  
de Engenharia de Pesca do Centro de  
Ciências Agrárias da Universidade Federal  
do Ceará, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Engenheiro de Pesca.**

---

**FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL  
JANEIRO/2007**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, D.Sc**  
**Orientador/Presidente**

---

**Fátima Cristiane Teles de Carvalho, M.Sc**  
**Membro**

---

**Karla Maria Catter, M.Sc**  
**Membro**

**VISTO:**

---

**Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc**  
**Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca**

---

**Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc**  
**Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca**



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A883b Atayde, Maylinque Albuquerque.

Bacteriologia da ostra *crassostrea rhizophorae* e da água do entorno no estuário do rio Pacoti (Eusébio-Ceará) - identificação de *escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos / Maylinque Albuquerque Atayde. – 2007.  
46 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2007.  
Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

1. Ostra - Cultivo. 2. Ostra - Microbiologia. 3. Água - Microbiologia. 4. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

---

Aos meus amados pais, Atayde e Arlete,  
por todo incentivo, paciência,  
compreensão e amor.

**Dedico este  
trabalho.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço antes de tudo a Deus pela vida, pelo seu infinito amor e bondade, pela força diante dos obstáculos e por ter estado sempre ao meu lado quando tudo parecia tão longe e incerto.

Aos meus queridos e amados pais, Atayde e Arlete, pelo amor incondicional, por proporcionarem minha educação e pelo exemplo de caráter e dignidade.

Ao meu irmão Maycon, por sempre me estimular a buscar os melhores caminhos e oportunidades e pela preocupação com os meus estudos.

À minha irmã Marla, por ser um referencial tão marcante em minha vida, pelo seu exemplo de perseverança e por sempre me ajudar quando as dúvidas e incertezas permeavam minha cabeça, se tornando o meu porto seguro.

Ao meu amado namorado, Paulo Henrique, que tanto me ajudou na realização deste trabalho, muitas vezes acordando de madrugada para me acompanhar nas coletas amostrais e principalmente pelo seu carinho, amor e paciência.

À minha grande amiga Rakel Hina, por ter dado o pontapé inicial para realização desse trabalho, por permanecer ao meu lado durante as longas horas de escrita e por me ajudar a crescer profissionalmente e como pessoa ao longo desses longos anos de amizade.

Ao Maximiano Dantas, com quem aprendi muito sobre ostras, por sempre estimular o meu progresso e valorizar o meu trabalho, independente das falhas.

Ao professor Aduino pela atenção e apoio com as análises estatísticas.

Ao meu cunhado Alcir pelo apoio e paciência na construção dos gráficos.

Às minhas colegas do Laboratório de Microbiologia do Pescado: Gleire, Cristiane, Norma, Oscarina, Dannielle, Anahy, Francileide, Rosa, Cláudia, Camila pelas horas compartilhadas.

À Edirsana que esteve ao meu lado durante os experimentos, me ajudando e repassando os valiosos conhecimentos sobre microbiologia.

À minha orientadora, professora e pesquisadora Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira pela experiente orientação que permitiu meu amadurecimento, pelo exemplo de profissionalismo e amor à pesquisa.

## **Sonata da ostra**

Regine Limaverde

Vivo nas águas.  
Sou a força e a fraqueza.  
Sou jóia e alimento.  
Sou rio e sou mar.  
Posso alimentar  
e enfeitar.  
Sou o céu  
e o inferno.  
Vivo de contradições.  
Só o homem sabe  
o que de mim fazer.  
Quero ser respeitada.  
Quero ser amada.  
Se jóia, enfeito mulheres.  
Se alimento, fortaleço o homem.  
Meu destino? Só os homens sabem.  
Estou nas águas.  
Vivo nelas.  
Morro nelas.  
Usem-me para o bem.

## SUMÁRIO

Resumo.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tabelas.....	iii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Histórico da ostreicultura.....	3
2.2 Características biológicas dos bivalves.....	5
2.2.1 Descrição da espécie em estudo.....	5
2.3 Qualidade do meio ambiente e a ostreicultura.....	6
2.4 Grupo coliformes.....	7
2.4.1 <i>Escherichia coli</i> .....	8
2.4.2 Doenças relacionadas a <i>E.coli</i> .....	8
2.5 Resistência da <i>Escherichia coli</i> a antimicrobianos.....	10
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
3.1 Quantificação de coliformes totais (Ct), coliformes termotolerantes (CT), de <i>Escherichia coli</i> e isolamento das cepas de <i>E. coli</i> das amostras.....	11
3.1.1 Amostragem.....	11
3.1.2 Determinação dos valores de temperatura, pH e salinidade.....	11
3.1.3 Diluições.....	11
3.1.4 Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e coliformes termotolerantes (CT).....	12
3.1.4.1 Prova Presuntiva.....	12
3.1.4.2 Teste de confirmação dos coliformes totais (Ct) e coliformes termotolerantes (CT).....	12
3.1.5 Quantificação e isolamento de <i>Escherichia coli</i> .....	12
3.1.5.1 Classificação morfológica e bioquímica das cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	13
3.1.5.1.1 Coloração de Gram.....	13
3.1.5.1.2 Testes bioquímicos do IMViC .....	13



3.1.5.1.3 Indol .....	13
3.1.5.1.4 Teste do Vermelho de Metila (VM).....	14
3.1.5.1.5 Teste de Voges-Proskauer (VP).....	14
3.1.5.1.6 Teste de Citrato .....	14
3.2. Testes antimicrobianos das cepas classificadas como <i>Escherichia coli</i> . ....	15
3.3 Análise estatística.....	16
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>5- CONCLUSÕES.....</b>	<b>28</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>

## RESUMO

- Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica da água do cultivo de ostras, localizado no Estuário do Rio Pacoti, assim como a qualidade das ostras, através do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e de coliformes termotolerantes (CT). Foram realizadas 15 coletas, durante o período de junho a novembro de 2006. A água do cultivo se manteve dentro dos limites permitidos pela Legislação em vigor. O NMP de Ct/100 mL variou de < 1,8 a 18.000 e de CT/100 mL de < 1,8 a 2.000, enquanto as ostras apresentaram variação de Ct e CT/g de < 1,8 a 3.500 e < 1,8 a 2.800, respectivamente. Vinte e cinco cepas identificadas como *E. coli* isoladas da água de cultivo foram testadas quanto a susceptibilidade a alguns antimicrobianos e se mostraram resistentes a ampicilina, nitrofurantoína, tetraciclina, sulfazotrin, ácido nalidíxico, ciprofloxacim, e a imipenem. Das ostras somente quatro cepas foram identificadas como *E.coli* e mostraram-se resistentes a tetraciclina e imipenem. Com base nos valores obtidos de Ct e CT da amostra de água e de ostras, foi possível constatar que: as águas do Rio Pacoti estão em boas condições segundo a legislação nacional; que a maioria das cepas de *E. coli* (59,43%), isoladas da água do Rio Pacoti foi sensível aos antimicrobianos empregados, com exceção do imipenem para o qual as cepas de *E.coli* apresentaram alto percentual de resistência (80%); que a sensibilidade das cepas de *E.coli* isoladas das amostras de ostras apresentou-se alta à maioria dos antibióticos testados. É necessário uma Legislação mais clara, que possibilite a avaliação da qualidade microbiológica de moluscos consumidos *in natura*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Desenvolvimento da produção de ostras <i>Crassostrea rhizophorae</i> /ano, no Estado de Santa Catarina.....	04
Figura 2:	Ponto de amostragem de água e ostras <i>Crassostrea rhizophora</i> no Estuário do Rio Pacoti- CE.....	04
Figura 3:	Fluxograma do antibiograma.....	16
Figura 4:	Valores de salinidade da água do cultivo das ostras <i>Crassostrea rhizophorae</i> durante o experimento.....	21
Figura 5:	Medições da temperatura da água do cultivo das ostras <i>Crassostrea rhizophorae</i> ,de junho a novembro de 2006.....	22
Figura 6:	pH <sub>s</sub> observados durante o experimento nas amostras de água e de ostras <i>Crassostrea rhizophorae</i> no estuário do Rio Pacoti, Eusébio-CE.....	23
Figura 7:	Percentual de susceptibilidades a antimicrobianos de cepas oriundas da água do cultivo.....	26
Figura 8:	Percentual de susceptibilidades a antimicrobianos de cepas oriundas do músculo e líquido intervalvar da ostra.....	28

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1:	Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e termotolerantes (CT) das amostras de água e ostra coletadas no Estuário do Rio Pacoti, Eusébio-Ce.....	17
Tabela 2:	Parâmetros físico-químicos da água coletada no Estuário do Rio Pacoti, referentes a salinidade, temperatura e pH.....	20
Tabela 3:	Susceptibilidade a antimicrobianos das cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas das amostras de água, coletadas no Estuário do Rio Pacoti, Eusébio-Ce. ....	24
Tabela 4:	Susceptibilidade a antimicrobianos das cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas das amostras de ostra coletada no Estuário do Rio Pacoti, Eusébio- Ce.....	26

**Bacteriologia da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água do entorno no Estuário do Rio Pacoti (Eusébio-Ceará) e identificação de cepas de *Escherichia coli* susceptíveis a diferentes antimicrobianos.**

**Maylinque Albuquerque Atayde**

## **1. INTRODUÇÃO**

A contaminação do mar origina dois tipos de problemas relevantes em saúde pública: riscos associados a banhos em locais contaminados e aqueles ligados ao consumo de animais habitantes dessa zona, como por exemplo, ostras e mexilhões (CERUTTI et al.1991).

O consumo de organismos aquáticos originários de águas contaminadas pode levar ao aparecimento de doenças transmitidas por alimentos (DTA) as quais podem ser causadas tanto por um agente infeccioso contaminante do alimento ingerido como pela toxina por ele produzida no alimento (BRASIL, 2001).

Vários fatores estão diretamente associados às doenças através da ingestão de ostras, uma vez que esses moluscos vivem geralmente em estuários e em áreas costeiras passíveis de poluição. A presença dos coliformes nas ostras indica que o alimento apresenta uma contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, está em condições higiênicas insatisfatórias, podendo causar no consumidor o aparecimento de sintomas desagradáveis (SILVA, 2003).

Segundo Machado et al. (2001), em muitos países, foi desenvolvido um conjunto de normas próprias para o processo de comercialização de moluscos devido aos riscos inerentes ao seu consumo. Estas normas são baseadas em análises microbiológicas da água do cultivo e/ou do tecido e líquido intervalvar.

O cultivo desses moluscos é uma alternativa para evitar o extrativismo desordenado, que pode causar a inviabilidade da atividade em

nível comercial, além de promover o desenvolvimento social e econômico de uma região, possibilitando o efetivo aproveitamento dos recursos naturais locais, com geração de renda, criação de postos de trabalho assalariado e/ou auto-emprego (VALENTI, 2000).

Embora já se conheça técnicas de cultivo de bivalves há alguns séculos, o desenvolvimento da malacocultura em escala mundial só se deu na segunda metade do século XX. Talvez porque, até então, a produção oriunda do extrativismo era suficiente para atender as demandas existentes (PROENÇA et al., 2001).

De maneira geral e, particularmente, no caso de ostras, o emprego da maricultura em substituição ao extrativismo representa uma grande mudança na gestão destes finitos recursos costeiros que precisam ser adequadamente gerenciados de forma a garantir sua longevidade (PROGRAMA NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO DA MARICULTURA, 2003).

Além da preocupação em garantir o fomento da ostreicultura é de igual importância a qualidade microbiológica do alimento produzido, por tal motivo, este trabalho tem como objetivo geral quantificar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e coliformes termotolerantes (CT) na ostra e na água do cultivo, assim como, isolar e identificar cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) das amostras e verificar a susceptibilidade de algumas delas a diferentes antimicrobianos conhecidos comercialmente.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

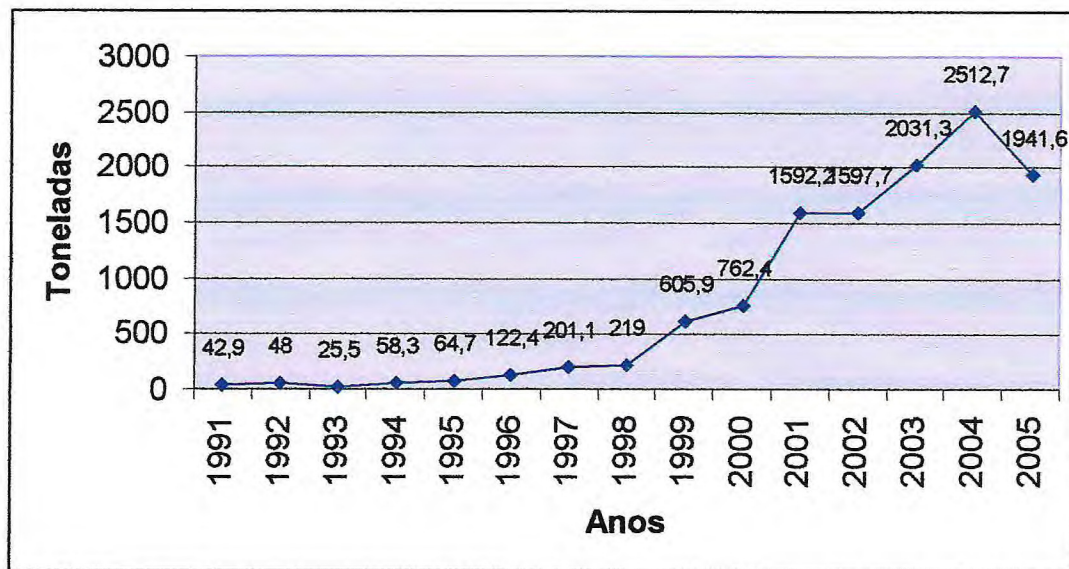
### 2.1 Histórico da ostreicultura

O cultivo de moluscos foi realizado, inicialmente, pelos japoneses (2000 a.C.) e romanos (100 a.C.), alcançando, nos dias atuais, elevado nível tecnológico, tornando-os iguaria de real valor nutritivo e elevado consumo (LIRA et al., 2000).

A ostreicultura é uma atividade praticada em quase todos os países que apresentam costa marítima. Pode-se dizer que no Brasil teve seu início com a publicação, em 1973, do relatório “A ostra de Cananéia e seu cultivo”, elaborado pelo especialista japonês Takeshi Wakamatsu, que deu maior atenção a espécie nativa, *Crassostrea rhizophorae*, por ser rústica, prolífica, de grande valor comercial e se adaptar bem às condições de cultivo (PROENÇA et al., 2001).

Os cultivos comerciais de moluscos foram introduzidos junto às comunidades de pescadores artesanais do litoral catarinense no biênio 1989-1990, servindo como uma opção alternativa de trabalho e renda para as famílias de pescadores, ameaçadas pela queda dos estoques naturais de pescado e pela falta de condições de competir com a tecnologia da pesca industrial (NOVAES, 2002).

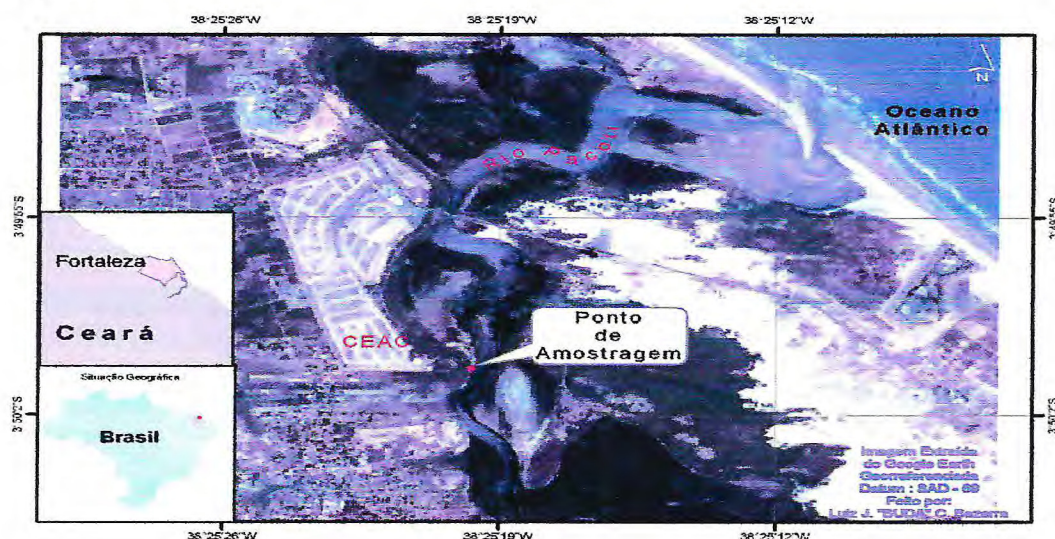
O Estado de Santa Catarina, maior produtor nacional de ostras, teve em 2005 a sua primeira queda de produção, cerca de 23%, após registrar um significativo crescimento desde o ano de 1991 (PANORAMA DA AQUICULTURA, 2006). Conforme mostra o gráfico abaixo:



**FIGURA 1-** Desenvolvimento da produção de ostras *Crassostrea rhizophorae*/ano, no Estado de Santa Catarina.

Fonte: Panorama da Aquicultura

Na região Nordeste, o cultivo de ostras destaca-se no Estado do Ceará, contando com a orientação técnica do Grupo de Estudos de Moluscos Bivalves – GEMB, do Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR/UFC. São importantes os cultivos de ostras nos Municípios de Fortim, no estuário do Rio Jaguaribe e no Município do Eusébio, no Rio Pacoti.



**FIGURA 2-** Ponto de amostragem de água e ostras *Crassostrea rhizophorae* no Estuário do Rio Pacoti- CE.

Fonte : Google Earth

## 2.2 Características biológicas dos bivalves

Moluscos bivalves (mexilhões, ostras e vieiras) são organismos filtradores que se alimentam principalmente de microalgas presentes na água do mar e concentram em seus tecidos grandes quantidades de substâncias químicas, resíduos orgânicos e inorgânicos e microrganismos ingeridos juntamente com a água (DAME, 1996).

A classe Bivalvia é de grande importância para os ecologistas que se interessam pelo controle da poluição, pois é provavelmente a maior acumuladora de poluentes do meio ambiente (ESPINULA; DIAS, 1980; LAMPARELLI, 1987).

De acordo com Nunes e Parsons (1998), os moluscos bivalves acumulam, através da filtração, todos os agentes bióticos e abióticos que se encontram na água, principalmente na massa visceral, lúmen do intestino e hepatopâncreas.

A principal característica da concha dos bivalves é sua constituição em duas valvas, unidas dorsomedianamente por um ligamento de conchiolina não calcificada e que, da mesma forma que a concha, é secretada pelo manto (BOFFI, 1979).

### 2.2.1 Descrição da espécie em estudo

A ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae*, apresenta uma distribuição geográfica que abrange a região Sul do Caribe, Venezuela, Surinami e Brasil até o Uruguai (RIOS, 1994). A mesma vive presa ao substrato, tipicamente nas raízes aéreas das árvores do mangue, preferencialmente no mangue vermelho (*Rhizophorae mangle*), podendo formar agregados submersos (bancos). Suas valvas são irregulares e ásperas, de coloração acinzentada podendo atingir até 120 milímetros de comprimento.

São animais dióicos (sexos separados), embora possam apresentar hermafroditismo seqüencial, ou seja, em um período podem se reproduzir como macho e em outro podem desovar como fêmea (GALTISOFF, 1964).

Segundo Rios (1994), a ostra *C. rhizophorae* é um molusco bivalve com a seguinte classificação sistemática:



Filo: Mollusca

Classe: Bivalvia

Ordem: Ostreoidea

Família: Ostreidae

Gênero: ***Crassostrea*** Sacco, 1897

Espécie: ***Crassostrea rhizophorae*** (Guilding, 1828)

### 2.3 Qualidade do meio ambiente e a ostreicultura

A avaliação microbiológica da água de rios, riachos, lagos, oceanos ou provenientes de alguma fonte que, por ventura, possa vir a prejudicar o homem, precisa ser realizada periodicamente para que o homem tenha controle do meio ambiente (GUILHERME et al., 2000).

Organizações internacionais, como “ Food and Drug Administration – FDA”, têm procurado através de princípios e normas, estabelecer o controle das condições sanitárias da água onde são cultivados os moluscos, objetivando garantir sua qualidade como alimento. No Brasil, a legislação pertinente, que estabelece critérios e normas de qualidade, com o objetivo de proteger e preservar sanitariamente as águas destinadas ao consumo e residuais, é bastante extensa e complexa (MORELLI, 2003).

De acordo com Bastos et al. (2000), desde os primórdios da Microbiologia Sanitária existem dificuldades em se isolar organismos patogênicos de amostras ambientais. Para tanto se sugere que a indicação de contaminação seja feita através de indicadores microbiológicos da presença de material fecal no meio ambiente. Os organismos que melhor têm cumprido este papel são as bactérias do grupo coliforme.

Portanto, para garantir a qualidade do cultivo deve-se atentar às condições ambientais, visto que uma das principais fontes de contaminação se deve à degradação do ambiente, muitas vezes decorrente do deságüe de efluentes domésticos, industriais e agrícolas, que podem causar enfermidades e prejudicar o crescimento das espécies (PITT, 1995).

A ingestão de bivalves, carne de siri e similares cozidos, temperados e não, destes moluscos crus ou parcialmente cozidos é preocupante no que diz respeito à Saúde Pública porque estes organismos são relacionados à veiculação de doenças como a hepatite, febre tifóide,

cólera, salmoneloses, e envenenamento por biotoxinas paralisantes que podem levar à morte (SANCHEZ et al., 1991).

A ostreicultura visa produzir um alimento que esteja dentro dos padrões sanitários exigidos pela legislação vigente. Além de substituir o tradicional extrativismo, que acarreta em grandes impactos aos bancos naturais, procurando garantir a sustentabilidade destes finitos recursos.

## 2.4 Grupo coliformes

O termo coliforme foi sugerido por Breed e Norton em 1937, para descrever bactérias fermentadoras de lactose, Gram-negativas, utilizadas para detectar a poluição de águas. Mais tarde foi acrescido do termo termotolerante, substituindo coliforme fecal. *E. coli* foi então diferenciada dos coliformes totais como um indicador mais específico de poluição fecal. O grupo é constituído de muitas espécies de enterobactérias incluídas nos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter* (LECLERC et al., 2001).

No grupo dos coliformes totais (Ct) estão incluídas bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que possuem a capacidade de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C (MENDONÇA-HAGLER et al., 2001).

O grupo dos coliformes termotolerantes possui uma característica importante na sua classificação, apresentando crescimento em temperaturas de 44 a 45 °C, fermentando a lactose com produção de ácido e gás em 48 horas (MENDONÇA-HAGLER et al., 2001).

Esta definição objetivou em princípio, selecionar apenas os coliformes originários do trato gastrointestinal. Atualmente, sabe-se, que o grupo dos coliformes fecais inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, dos quais (*Enterobacter* e *Klebsiella*) incluem cepas de origem não fecal. Por esse motivo, a presença de coliformes termotolerantes em água é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração direta de *E. coli* dentro do grupo fecal (SILVA et al., 2000).

Segundo Bastos et al.(2000), os termos : coliforme total e coliforme fecal ou ainda coliforme termo-resistente não têm nenhuma justificativa taxonômica, tendo significado apenas na parte laboratorial.

Dentre as bactérias de origem fecal, *Escherichia coli* é a espécie mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais (SILVA et al., 1997). O habitat natural e principal reservatório de *E. coli* é o trato intestinal de homens e de outros animais de sangue quente (LEITÃO, 1988).

#### **2.4.1 *Escherichia coli***

Em 1885, Theodor Von Escherich descreveu um organismo isolado de fezes de crianças, denominado *Bacterium commune*, também chamado *Bacillus coli*, que em sua homenagem foi finalmente denominado *Escherichia coli* (TÔRRES, 2004).

*E. coli* é um microrganismo componente da microbiota do trato intestinal humano e animal, exercendo antagonismo microbiano, desempenhando importante papel na defesa do organismo contra certas infecções, participando do metabolismo de produtos alimentares e fornecendo fatores de crescimento alimentar (SILVA et al.,1997).

Segundo Dias et al. (1994), a *E. coli* da microbiota normal do intestino humano pode contaminar, colonizar e subseqüentemente causar infecções extra-intestinais, sendo um dos principais agentes etiológicos de septicemias, meningites e infecções do trato urinário de humanos.

*E. coli* é membro da família Enterobacteriaceae, apresenta colônias relativamente grandes, cinza-escuras úmidas ou mucóide (KONEMAM et al., 1993) e caracteriza-se pela presença das enzimas  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glicuronidase. Cresce a 44-45°C, fermenta lactose e manitol com produção de ácido e gás e produz indol a partir do aminoácido triptofano (Resolução nº 274 do CONAMA, 2000).

#### **2.4.2 Doenças relacionadas a *E.coli***

A principal dificuldade do monitoramento da qualidade da água de um determinado local, é o estabelecimento de indicadores adequados e a definição dos critérios a serem adotados para esta avaliação. Neste



sentido, procura-se relacionar a presença de indicadores de poluição fecal no ambiente aquático e o risco potencial de se contrair doenças infecciosas por meio de sua utilização para recreação. Esses critérios devem estar sempre associados ao bem estar, à segurança e à saúde da população (CETESB, 2003).

A contaminação microbiana das águas é extremamente importante, devido ao seu potencial patogênico. Na água, é relativamente comum a presença de bactérias da família das *Enterobacteriaceae*, que podem ser responsáveis por uma variedade de doenças, principalmente infecções intestinais (MURRAY, 2000; TORTORA, 2000).

A principal causa de doenças diarreicas é a ingestão de alimentos e/ou águas contaminadas por microrganismos patogênicos. Um dos agentes etiológicos das infecções entéricas é a bactéria *Escherichia coli* que, presente em águas ou alimentos, indica uma contaminação de origem fecal e um possível risco à saúde (TÔRRES, 2004).

Amostras de *E. coli* que colonizam o intestino humano são inofensivas. Entretanto, dentro da espécie existem variantes patogênicas que causam síndromes distintas como a diarreia, por possuírem fatores de virulência tais como enterotoxinas e enteroadesinas (LECLERC et. al., 2001).

*E. coli* foi dividida em seis grupos baseados em fatores definidos de virulência, manifestações clínicas produzidas, epidemiologia e sorotipagem. Os grupos que são reconhecidos como causadores de diarreias são: *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC) também referida como *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Enteroinvasora (EIEC), *E. coli* Enteroagrativa (EaggEC) e difusamente agregada (DAEC) sendo que ainda existem várias outras cepas de *E. coli* produtoras de toxinas, mas o significado clínico destes organismos não é claro (NATARO; KAPER, 1998).

O consumo de moluscos, conforme registros em literatura especializada, é responsável por inúmeros surtos epidêmicos e responde diretamente pelos problemas de saúde pública, ocasionados, principalmente, quando os moluscos são ingeridos *in natura* e a qualidade

sanitária do ambiente aquático onde eles são capturados está comprometida (JOSÉ, 1996).

## 2.5 Resistência da *Escherichia coli* a antimicrobianos

O índice de cepas bacterianas resistentes a antibióticos no ambiente aquático tem aumentado desde a década de 70, do século passado. Este é resultado do uso indiscriminado dessas drogas na profilaxia ou terapêutica humana e animal ou ainda para implementar a produção de alimento. Esse aumento é consequência também da disseminação de plasmídios bacterianos, que possuem genes de resistência, proporcionando uma maior flexibilidade genética em populações microbianas para adaptações e sobrevivência em ambientes hostis (CARDONHA et al., 2004).

O primeiro plasmídio identificado em *E.coli*, foi o fator de fertilidade F, conjugativo e foi descoberto por sua habilidade em mediar a transferência de marcadores cromossômicos de uma cepa para outra (BLACK, 1990).

A ocorrência de *E.coli* em ambientes aquáticos é preocupante porque essas bactérias podem conter plasmídios de resistência a antibióticos e/ou a metais pesados, transferíveis para espécies patogênicas, tornando-as resistentes (HAGLER; HAGLER, 1988). Segundo Cardonha et al. (2004), a presença de cepas de *E.coli* com resistência a fármacos no ambiente aquático deve ser avaliada tomando-se por princípio de que tais microrganismos são produtos de uma seleção previamente ocorrida no ambiente.

A prescrição de antimicrobianos é feita para combater determinados agentes bacterianos envolvidos no processo infeccioso. A indicação de drogas específicas para o tratamento de doenças seria segura, se todas as bactérias apresentassem sensibilidade constante às drogas. No entanto, a maioria dos agentes apresenta variação de sensibilidade, sendo, assim, necessário conhecer a sensibilidade “in vitro” destes microrganismos (COSTA et al., 2002).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Quantificação de coliformes totais (Ct), coliformes termotolerantes (CT), de *Escherichia coli* e isolamento das cepas de *E. coli* das amostras.

##### 3.1.1 Amostragem

Durante 15 semanas, de junho de 2006 a novembro de 2006, foram coletadas do Estuário do Rio Pacoti, no município de Eusébio - Ceará, exemplares de ostras, *Crassostrea rhizophorae* (cerca de 10 indivíduos por amostra) e aproximadamente 500mL da água do cultivo, em vidro de cor âmbar, esterilizado. As amostras, eram acondicionadas em uma bolsa isotérmica, por um período máximo de 1 hora, até chegarem ao Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR, da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza/CE e serem processadas. O número de indivíduos analisados foi de aproximadamente 150.

##### 3.1.2 Determinação dos valores de temperatura, pH e salinidade

As amostras de água, tiveram suas temperaturas medidas no local de coleta por um termômetro de mercúrio da marca Inconterm. Em laboratório foi aferida a salinidade das amostras de água, utilizando o refratômetro da marca Atago s/mill e os valores de pH com o auxílio de um potenciômetro da marca Marconi-pa 200p.

##### 3.1.3 Diluições

As ostras, depois de passarem pelo processo de limpeza com lavagem em água corrente, foram abertas assepticamente, pesados 25 g de músculo e líquido intervalvar e homogeneizados com 225 mL de solução salina a 0,85% em liquidificador. Esta preparação correspondeu a diluição  $10^{-1}$ . As demais diluições ( $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ ) também foram feitas com solução salina a 0,85%.

### **3.1.4 Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e coliformes termotolerantes (CT)**

#### **3.1.4.1 Prova Presuntiva**

O meio utilizado para a prova presuntiva foi o Caldo Lauryl Triptose-Difco reidratado e distribuído em tubos (10mL) contendo tubos de Durhan invertidos. Nos tubos esterilizados eram depositados 1 mL da amostra de cada diluição ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) para as ostras e diluição ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) para a água, em série de cinco repetições. Os tubos eram então incubados a 35°C/48h.

O resultado positivo da prova era confirmado através da formação de gás nos tubos de Durhan e turvação do meio.

#### **3.1.4.2 Teste de confirmação dos coliformes totais (Ct) e coliformes termotolerantes (CT)**

Dos tubos positivos, na prova presuntiva, eram retiradas alíquotas com auxílio de alça de níquel-cromo e eram inoculadas em tubos de 10 mL estéreis do meio BVB (Difco) para Ct e EC (Vetec) para CT, contendo tubos de Durhan invertidos. Os tubos de caldo BVB eram incubados em estufa a 35°C/48h, enquanto os tubos de caldo EC eram incubados em banho-maria a 45°C/48h.

A positividade desta prova era verificada através da turvação do meio e formação de gás nos tubos de Durhan. Os resultados positivos de cada série eram anotados, para posterior consulta à tabela de Hoskins adaptada por Bacteriological Analytical Manual - BAM (MEHLMAN et al, 1984).

### **3.1.5 Quantificação e isolamento de *Escherichia coli***

Dos tubos positivos para CT eram retiradas alíquotas e com a ajuda de uma alça de níquel cromo eram estriadas placas de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Merck) e incubadas por 24 horas, a 35°C.

As colônias características de *E. coli*, isto é, com diâmetro de 2 a 5 mm, centro negro, com ou sem brilho metálico esverdeado, eram isoladas em tubos de ensaio contendo Agar Triptose Soja (TSA) (Merck) inclinado.



Eram isoladas duas a três colônias características de *E. coli* de cada placa de EMB correspondente a cada tubo de CT positivo. Os tubos de TSA eram incubados em estufa a 35°C por 24 horas e após esse tempo, as cepas isoladas eram identificadas em microscópio através de sua morfologia e nos testes bioquímicos do IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato) segundo Mehlman et al (1984).

### **3.1.5.1 Classificação morfológica e bioquímica das cepas de *Escherichia coli***

#### **3.1.5.1.1 Coloração de Gram**

Foram preparadas lâminas a partir do crescimento da cultura pura em TSA, e coradas segundo o método da coloração de Gram (PELCZAR, 1996) o qual se baseia no fato de que, quando certas bactérias são coradas pela violeta de genciana ou cristal violeta e posteriormente, tratadas pelo iodo (solução iodo-iodetada – lugol) forma-se um composto de coloração escura entre o iodo e o corante (iodo-pararosanilina), o qual é fortemente retido pelas bactérias e não pode ser facilmente removido pelo tratamento subsequente com álcool, nem corado posteriormente pelo corante de fundo (fucsina ou safranina). Estas bactérias são conhecidas como Gram-positivas, tendo na constituição de suas paredes uma quantidade maior de peptideoglicano, o que a torna muito espessa, enquanto as paredes das Gram-negativas possuem uma membrana externa cobrindo uma camada fina de peptideoglicano o que permite descolar-se pelo álcool e corar – se com o corante safranina. *E. coli* tem forma de bacilo curto e é Gram-negativa.

#### **3.1.5.1.2 Testes bioquímicos do IMViC**

As cepas Gram-negativas, eram testadas bioquimicamente através dos testes relacionados a seguir.

#### **3.1.5.1.3 Indol**

Era retirado um inóculo do crescimento de um tubo com TSA incubado por 24h a 35°C e inoculado em um tubo de meio SIM (Vetec),

com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo e novamente incubado a 35°C por 48h. Após este tempo, eram adicionados 0,2mL do reativo de Kovacs (paradimetilaminobenzaldeído) ao meio. O aparecimento de um anel vermelho na superfície do meio indica positividade, caracterizando a produção de Indol, oriundo da degradação do aminoácido triptofano pela enzima bacteriana triptofanase.

#### **3.1.5.1.4 Teste do Vermelho de Metila (VM)**

Do mesmo crescimento em TSA, foram retirados inóculos e introduzidos em 3mL do Caldo MR-VP (Micro MED), posteriormente incubados por 96 horas, a 35°C. Após este período de tempo, foram adicionados 3 a 5 gotas de solução do indicador de pH vermelho de metila, no interior do caldo. Ocorre surgimento de uma coloração produzida pelas bactérias coliformes que utilizam fermentação ácida mista no seu metabolismo. Os produtos finais formados dessa fermentação são responsáveis pela acidez no meio, sendo, < 4,5 o ponto de viragem do indicador vermelho de metila. *Escherichia coli* é positiva para este teste.

#### **3.1.5.1.5 Teste de Voges-Proskauer (VP)**

Tubos contendo 1 mL de Caldo MR-VP (Micro MED) eram inoculados com crescimento em TSA através de alça de níquel-cromo e incubados por 48 horas a 35°C. Para cada 1,0 mL do meio eram adicionados 0,6 mL do reativo de Barrit I ( $\alpha$ -naftol) e 0,2 mL do reativo de Barrit II (KOH a 40%). O tubo era agitado vigorosamente, aberto e deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. O aparecimento de coloração rósea indica teste VP positivo mostrando presença de acetoína (acetil metil carbinol), que em meio alcalino e em aerobiose é oxidado formando diacetil, o qual em presença de KOH e  $\alpha$ -naftol apresenta coloração vermelha. A ausência de cor vermelha indica VP negativo, característica de *E. coli*.

#### **3.1.5.1.6 Teste de Citrato**

Inóculos do crescimento em TSA foram utilizados também para estriar tubos com meio Agar Citrato de Simmons (Vetec) inclinado,



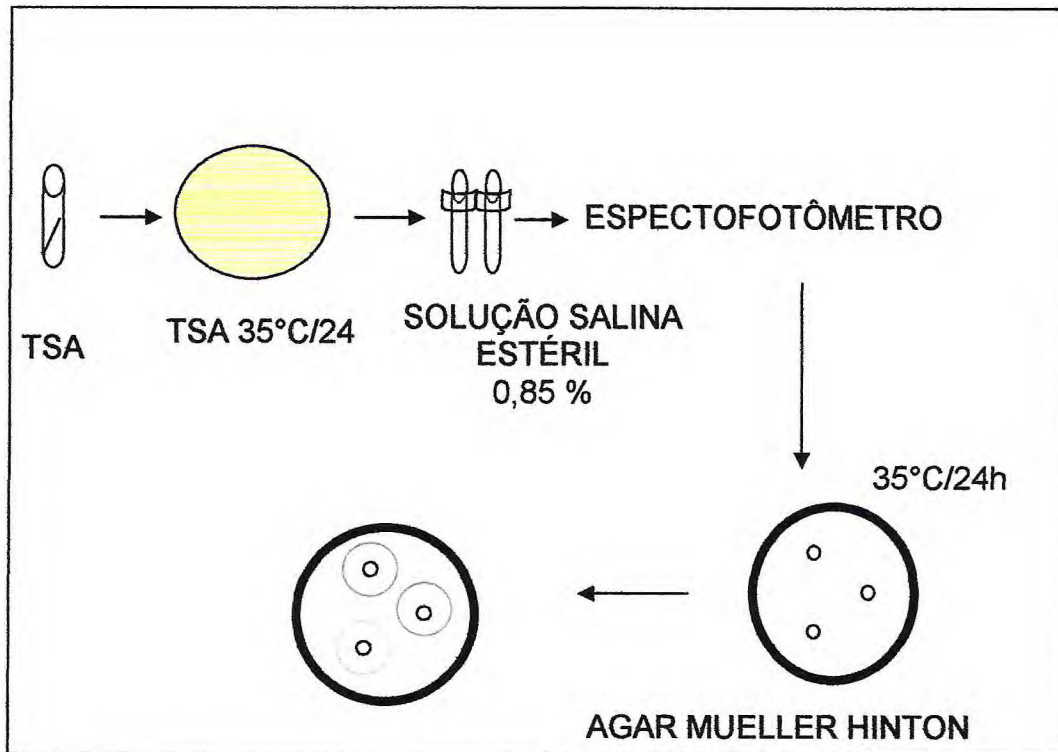
utilizando-se alça de níquel-cromo. Os tubos foram incubados a 35°C por 96 horas. A presença do crescimento, com posterior viragem do indicador (azul de bromotimol), presente no meio, indica prova positiva. A viragem do azul de bromotimol prova que o meio está alcalino com a presença de microrganismos que utilizam o citrato como única fonte de carbono. Esta prova é negativa para *E.coli*.

Após a identificação morfológica e bioquímica das cepas analisadas eram computados quantos tubos haviam sido positivos para a bactéria e novamente consultando a tabela de Hoskins adaptada pelo Bacteriological Analytical Manual-BAM (MEHLMAN et al, 1984) fazia-se o cálculo do NMP de *Escherichia coli*.

### **3.2. Testes antimicrobianos das cepas classificadas como *Escherichia coli***

Culturas de *E. coli*, já identificadas, crescidas em TSA inclinado a 35°C/24h, foram selecionadas e emulsionadas em solução salina estéril 0,85% e com o auxílio de um espectrofotômetro (Micronal B542), obteve-se uma turvação equivalente à turbidez do tubo 0,5 na escala de MacFarland. Destes tubos turvos, foi retirado com o auxílio de um swab estéril aliquotas que foram semeadas em placas contendo Ágar Mueller-Hinton-Difco (MH). Em seguida os discos de antimicrobianos foram depositados, com o auxílio de uma pinça estéril na superfície do ágar. As placas foram então incubadas em estufa por 35°C/24h e logo após esse período, foram realizadas as medições dos halos utilizando-se um paquímetro (KOLETAR, 1995).

Vinte e nove cepas de *E. coli* isoladas das amostras das ostras e da água do cultivo, escolhidas ao acaso, foram semeadas em TSA e testadas quanto à sensibilidade aos seguintes antibióticos: ácido-nalidíxico (NAL), ampicilina (AMP), ciprofloxacim (CIP), imipenem (IMP), nitrofurantoína (NIT), sulfazotrim (SUT) e tetraciclina (TET).



**FIGURA 3-** Fluxograma do antibiograma.

### 3.3 Análise estatística

Os valores encontrados foram submetidos à análises estatísticas utilizadas para comparação do grau de contaminação por coliformes totais e coliformes termotolerantes (tratamentos) e em água e ostra (blocos) foi o teste t, através do enfoque *stepwise*, tendo-se transformado valores das variáveis NMP/100 mL (água) e NMP/g (ostra) por logaritimização neperiana, para miminizar a falta de homogeneidade da variância entre as observações dentro dos tratamentos e blocos.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O NMP de Ct encontrado nas amostras de água e das ostras variou de < 1,8 a 18.000/100 mL e de <1,8 a 3.500/g, respectivamente, enquanto que os valores para CT nas amostras de água apresentaram variação de < 1,8 a 2.000/100 mL e nas amostras de ostras de < 1,8 a 2.800/g (Tabela 1).

**TABELA 1.** Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e termotolerantes (CT) das amostras de água e ostra coletadas no Estuário do Rio Pacoti, Eusébio-Ce.

Coleta	Ct		(CT)		Pluviometria (milímetro)
	Água (NMP/100mL)	Ostra (NMP/g)	Água (NMP/100mL)	Ostra (NMP/g)	
1	340	3.500	110	2.800	00
2	2.800	49	470	33	00
3	3.500	22	210	22	00
4	40	210	40	33	00
5	40	4,5	40	< 1,8	00
6	45	79	< 1,8	< 1,8	00
7	20	< 1,8	20	< 1,8	00
8	40	2	40	< 1,8	00
9	18.000	33	2.000	17	12
10	130	< 1,8	130	< 1,8	00
11	45	< 1,8	< 1,8	< 1,8	00
12	20	7,8	< 1,8	< 1,8	00
13	< 1,8	4	< 1,8	4	00
14	45	< 1,8	45	< 1,8	00
15	< 1,8	17	< 1,8	< 1,8	00

A Resolução vigente nº 12 da ANVISA, não contempla o grupo dos coliformes totais, assim como não oferece critérios para a avaliação de moluscos consumidos *in natura*. Esta Resolução limita-se ao grupo dos coliformes termotolerantes, estabelecendo uma tolerância de 5X10



coliformes a 45°C/g para moluscos bivalves cozidos, industrializados resfriados ou congelados. Ostras são moluscos que geralmente são consumidos crus, então pode-se valer do artigo 22, alínea b, da mesma resolução, que estabelece uma tolerância de  $10^2$  /g para pratos prontos para o consumo. Anterior a esta Resolução, a Portaria nº 451 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997), especificava limites de NMP para coliformes termotolerantes de  $10^2$  /g para pescados consumidos crus (item IV, alínea a), tornando-se incompreensível a revogação desta, uma vez que a Resolução nº 12 da ANVISA dificulta a avaliação da qualidade microbiológica do alimento em questão.

Como a Legislação Brasileira não é satisfatória para que se obtenha uma efetiva avaliação microbiológica de moluscos bivalves, pode-se submeter os valores encontrados neste estudo à padrões internacionais, como o The European Union Shellfish Quality Assurance Programme (EUSQAP), este programa classifica os moluscos bivalves em três classes: A, B e C. Para cada classe é permitido uma quantidade de coliformes termotolerantes por 100g de massa visceral e líquido intervalvar. Para a classe A, a tolerância é de < 300 CT/100g, na classe B 90% das amostras não podem exceder a 6.000 CT/100g e na classe C, não podem exceder a 60.000 CT/100g. Baseado nas normas deste Programa, nove das amostras de ostra estariam classificadas na classe A, cinco na classe B e uma na classe C.

Se o número de CT obtido nas amostras de ostra for comparado com o padrão brasileiro (artigo 22, item IV, alínea a) somente a 1ª amostra estaria além dos limites permitidos.

As análises microbiológicas da água seguiram a Resolução nº 357 de 2005 do CONAMA, que determina que para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não devesse exceder 43/100mL. De acordo com essa Resolução, a média geométrica apresentou-se satisfatória com um valor de 27,02, condizentes para águas Classe 1 (águas salobras destinadas à proteção das comunidades aquáticas, à aquicultura e à atividade de pesca).

Os testes revelaram que a água e as ostras são igualmente contaminadas por coliformes totais e termotolerantes, não havendo significância estatística entre tratamentos ao nível de 5%, para GL= 58.

O meio urbano dá origem a várias impurezas, tais como, poluentes atmosféricos carregados pela chuva, poeira e lixo, erosão do solo, uso de defensivos e fertilizantes em jardins, além de ligações clandestinas de esgotos às galerias pluviais, que favorecem a presença de microrganismos patogênicos (MOTA,1988), portanto, a microbiota da carne da ostra está diretamente relacionada ao ambiente do qual ela se origina, pois esses moluscos são filtradores e bioacumuladores de microrganismos, sendo dessa forma muito utilizados como bioindicadores (ZAMARIOLI et al, 1997).

Entretanto, a comparação entre blocos, mostrou que a água se apresenta mais contaminada do que a ostra, independente do fator de contaminação (Ct ou CT), com significância estatística ao nível de 5%, para GL= 58.

As medidas de salinidade, temperatura, pH estão dispostas na tabela 2. A salinidade observada variou entre 10 (mínimo) e 40 (máximo). Os valores observados da temperatura variaram entre 25°C e 30,5°C e os valores de pH ficaram entre 7,2 e 8,2.

**TABELA 2-** Parâmetros físico-químicos da água coletada no Estuário do Rio Pacoti, referentes a salinidade, temperatura e pH.

Coletas	Salinidade ppm	Temperatura °C	pH
1	10	28,0	7,65
2	10	27,0	7,40
3	11	26,5	7,76
4	13	26,0	7,88
5	17	25,0	7,74
6	35	27,0	8,24
7	32	25,0	7,76
8	35	28,0	7,55
9	37	30,5	7,76
10	37	27,0	7,20
11	38	28,0	7,98
12	38	28,5	7,74
13	38	29,0	7,51
14	39	29,5	7,30
15	40	28,0	7,80

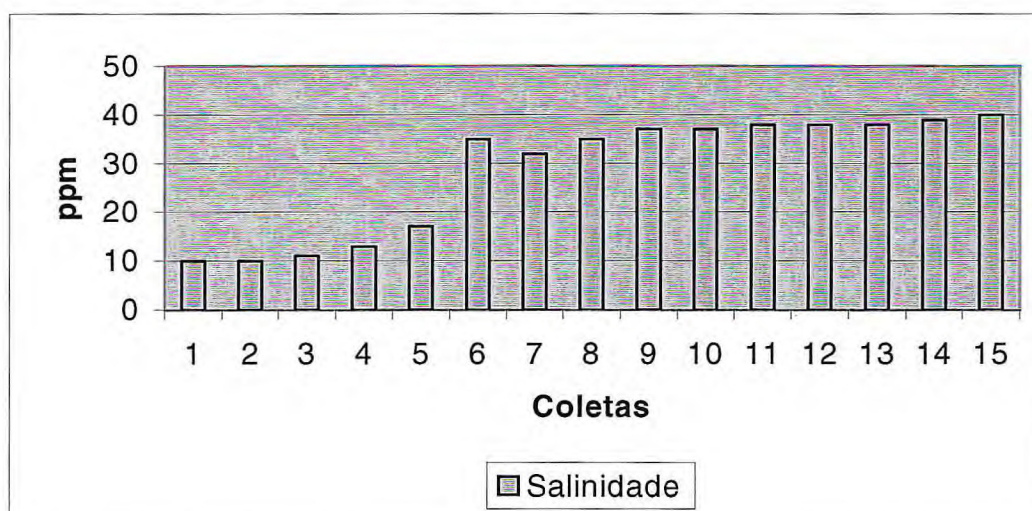
*Escherichia coli* é um dos patógenos de maior importância quando se deseja constatar contaminação por esgotos. Todavia, à semelhança das demais bactérias, ela necessita de condições favoráveis para se desenvolver. A água do mar, devido a grandes concentrações de sais, pode funcionar como fator limitante para multiplicação de *E. coli* (VIEIRA et al, 2001), fato que pôde ser comprovado nessa pesquisa, uma vez que, foi observado a partir da 6ª coleta um acréscimo considerável nos valores de salinidade. De acordo com a Resolução nº 357 de 2005 do CONAMA, que classifica as águas em salobras (0,5 a 30 ‰) e salinas (> 30‰), para os valores encontrados neste estudo, as amostras de água em sua maioria, são classificadas como águas salinas.



Os coliformes têm pouca tolerância à salinidade das águas do mar, portanto sua detecção nesse ambiente denota uma descarga recente e constante de matéria fecal, o que vem ocorrendo nessa área, sendo importante se constatar a relação inversamente proporcional entre salinidade e numero de coliformes (HAGLER; HAGLER, 1988).

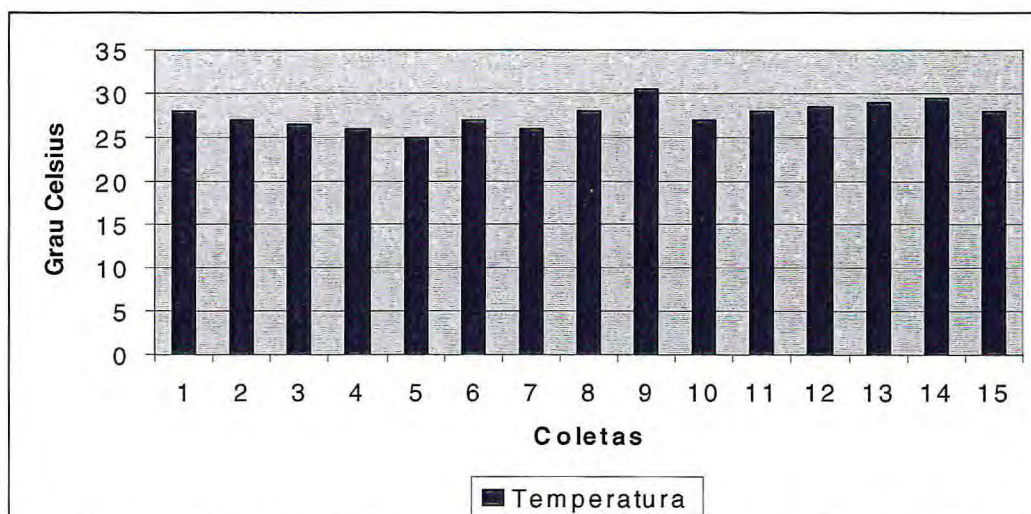
Sendo o sal tóxico para os coliformes existe a eliminação de 90% da população de *E. coli* em poucas horas ou em minutos, quando essa bactéria entra em contato com águas marinhas (HAGLER; HAGLER, 1988).

O maior valor encontrado para Ct e CT na água do cultivo (Tabela 1), coincidiu com o dia em que ocorreu precipitação comprovando que as chuvas interferem no índice de qualidade microbiológica da água, pois estas tem a capacidade de arrastar esgotos e resíduos sólidos para os cursos d' água que, por sua vez, afluem para o mar (SALATI FILHO, 2001; LIZÁRRAGA-PARTIDA; CÁRDENAS, 1996).



**FIGURA 4-** Valores de salinidade da água do cultivo das ostras *Crassostrea rhizophorae* durante o experimento.

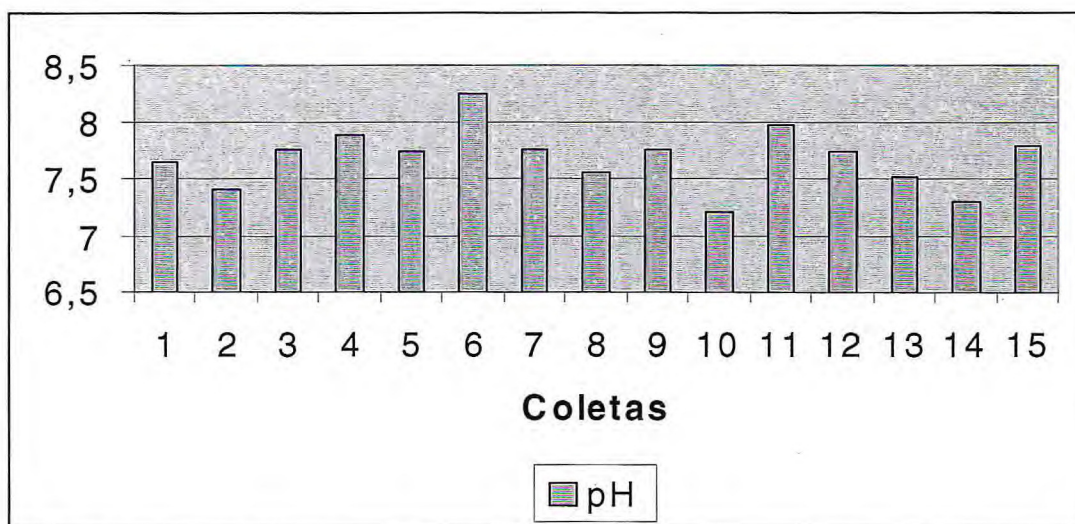
A temperatura da água do cultivo durante todo o experimento encontrou-se favorável ao crescimento das bactérias mesófilas e de acordo com GAUTHIER et al. (1993), o risco de poluição de águas marinhas por *E. coli* e por extensão, pelas enterobactérias patogênicas para o homem, é muito mais acentuado em águas quentes e ricas em matéria orgânica.



**FIGURA 5-** Medições da temperatura da água do cultivo das ostras *Crassostrea rhizophorae*, de junho a novembro de 2006.

De acordo com Rozen e Belkin (2001), o pH da água do mar se situa normalmente entre 7,5 e 8,5 e é influenciado pela temperatura, pressão e atividades fotossintéticas e respiratórias dos microrganismos. Segundo os autores, um pH ácido, em torno de 5,0 favorece à sobrevivência da *E. coli*, ao passo que o pH da água do mar, em torno de 8,0, contribui para um efeito deletério na sobrevivência da bactéria. Os dados de pH encontrados nesta pesquisa estão todos de acordo com a legislação nº 357 (CONAMA, 2005), tanto para águas salobras como salinas (Figura 6).





**FIGURA 6-** pHs observados durante o experimento nas amostras de água e de ostras *Crassostrea rhizophorae* no estuário do Rio Pacoti, Eusébio-CE.

Os resultados referentes aos testes de susceptibilidade a antimicrobianos de 25 cepas de *E. coli* isoladas da água do cultivo encontram-se na tabela 3 e figura 7.

**TABELA 3-** Susceptibilidade a antimicrobianos das cepas de *Escherichia coli* isoladas das amostras de água, coletadas no Estuário do Rio Pacoti, Eusébio-CE.

Cepa	AMP	NIT	TET	SUT	NAL	CIP	IMP
01	S	I	I	S	S	S	R
02	R	S	S	S	S	S	R
03	I	S	I	S	S	S	R
04	S	S	I	S	S	S	R
05	R	S	I	S	S	S	R
06	R	I	I	S	S	S	R
07	I	S	I	S	S	S	R
08	R	I	I	S	S	S	R
09	S	S	S	S	R	S	R
10	S	S	S	S	I	S	R
11	R	S	R	R	R	R	R
12	R	S	R	R	R	R	R
13	S	S	I	S	S	S	R
14	S	S	I	S	S	S	R
15	I	S	S	S	S	S	R
16	S	S	S	S	S	S	R
17	S	S	S	S	S	S	R
18	I	R	R	I	R	S	R
19	I	S	R	R	S	S	I
20	R	S	R	R	S	S	I
21	R	S	R	R	S	S	S
22	R	S	S	S	S	S	R
23	R	S	S	S	S	S	S
24	R	S	S	S	S	S	S
25	R	S	S	S	S	S	R

AMP- ampicilina, NIT- nitrofurantoína, TET- tetraciclina, SUT- sulfazotrin, NAL- ácido nalidíxico, CIP- ciprofloxacim, IMP- imipenem.

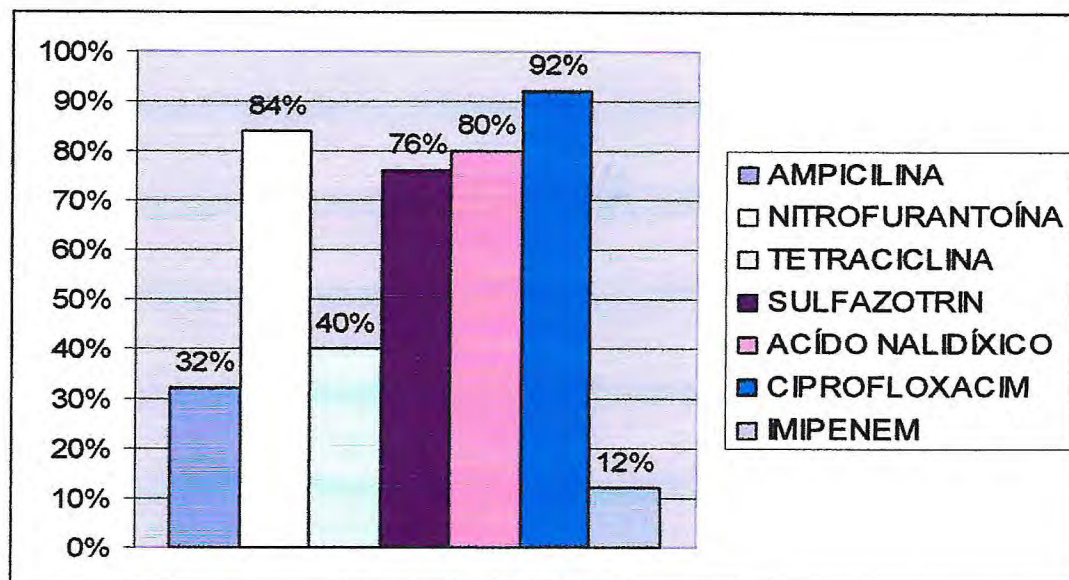
R - Resistente; S - Sensível; I - Intermediário

As cepas isoladas a partir da água do cultivo apresentaram um percentual maior de resistência aos antimicrobianos imipenem (80%) e ampicilina (48%), enquanto que as demais cepas apresentaram um percentual de resistência menor aos antimicrobianos: tetraciclina (24%), sulfaxotrim (20%), ácido nalidíxico (16%), ciprofloxacim (8%) e nitrofurantoína (4%).

Uma pesquisa realizada por Cardonha et al. (2004) em três praias de Natal confirmaram cepas de *E. coli*, isoladas da água do mar, resistentes a tetraciclina, ampicilina e nitrofurantoína, corroborando com os dados desta pesquisa, uma vez que, foi apresentada cepas resistentes a esses antimicrobianos, mesmo em menor percentual. Na mesma pesquisa, Cardonha obteve sensibilidade nas cepas de *E. coli*, isoladas de águas do mar, de 100% ao imipenem e ciprofloxacim. Vasconcelos em 2005, ao estudar duas praias de Fortaleza, isolou cepas de *E. coli* que também foram 100% sensíveis aos mesmos antimicrobianos, ao passo que, na presente pesquisa verificou-se uma alta resistência ao imipenem e uma discreta resistência ao ciprofloxacim, porém a constatação deste fato é preocupante pois denota o uso indiscriminado de antibióticos.

Existe grande preocupação da comunidade médica relacionada a automedicação, pois as pessoas usam os antibióticos de forma indiscriminada. Para cada infecção é necessário um determinado antibiótico e o uso incorreto desses medicamentos, acarreta a seleção de bactérias resistentes (LEÃO, 1999).





**FIGURA 7-** Percentual de susceptibilidades a antimicrobianos de cepas oriundas da água do cultivo.

Os resultados obtidos a partir dos testes de susceptibilidade de quatro cepas de *E. coli*, isoladas do músculo e líquido intervalvar da ostra encontram-se na Tabela 4 e Figura 8.

**TABELA 4-** Susceptibilidade a antimicrobianos das cepas de *Escherichia coli* isoladas das amostras de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas no Estuário do Rio Pacoti, Eusébio- CE.

Cepa	AMP	NIT	TET	SUT	NAL	CIP	IMP
1	S	S	I	S	S	S	R
2	S	S	R	S	S	S	R
3	I	S	S	S	S	S	R
4	I	S	S	S	S	S	R

AMP- ampicilina, NIT- nitrofurantoína, TET- tetraciclina, SUT- sulfazotrin, NAL- ácido nalidíxico, CIP- ciprofloxacim, IMP- imipenem.

R - Resistente; S - Sensível; I - Intermediário

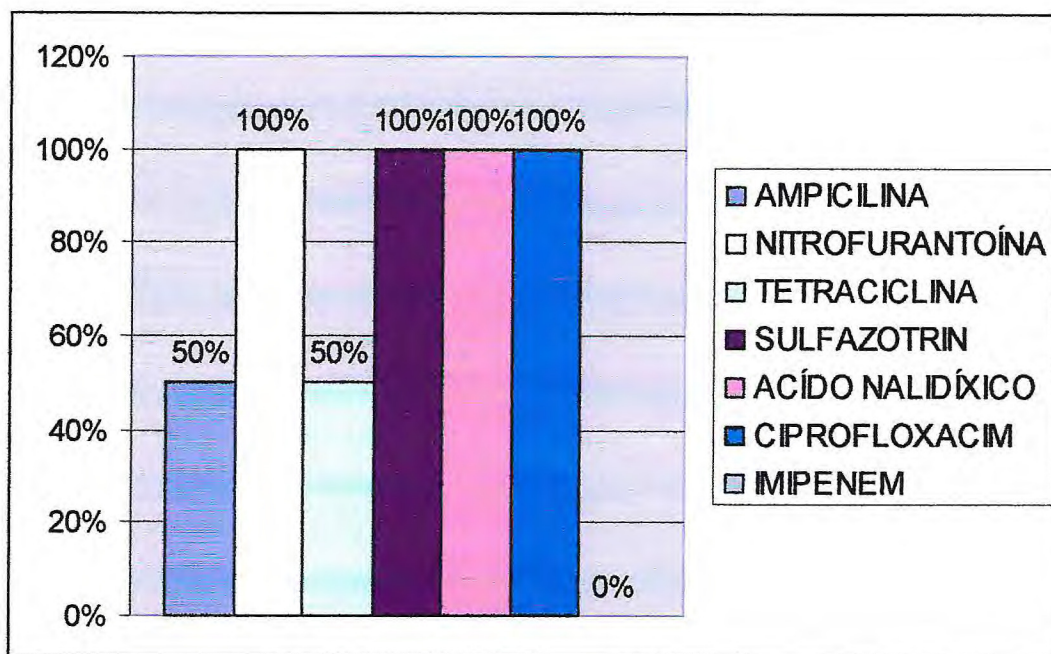
As cepas de *E. coli* isoladas a partir das amostras do músculo (com líquido intervalvar) das ostras apresentaram um percentual de resistência de 100% ao imipenem, 25% a tetraciclina e nenhuma resistência a

ampicilina, enquanto que 100% das amostras se mostraram sensíveis aos antimicrobianos, nitrofurantoína, sulfazotrim, ácido nalidíxico e ciprofloxacim.

Morelli (2003) isolou *E.coli* de ostras comercializadas em duas barracas, na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará, e as cepas apresentaram resistência a ampicilina, discordando dos dados observados nesta pesquisa. Outra discordância é o fato das cepas de *E. coli* isoladas no presente trabalho se mostrarem 100% resistentes ao imipenem, contrastando com Morelli que obteve 100% de susceptibilidade ao mesmo antimicrobiano.

A resistência crescente das bactérias patogênicas aos antimicrobianos tem causado preocupação ao mundo científico. É dito que o uso generalizado de agentes antimicrobianos na produção animal pode promover o desenvolvimento de bactérias resistentes ou de genes resistentes que possam ser transferidos para bactérias causadoras de doenças ao homem (WEGENER et al.,1997). A maioria das cepas de *E. coli* não causa doenças ao homem, mas algumas possuem fatores de virulência e podem ser uma ameaça à vida (TÔRRES, 2004; GRANT et al.,1996).

Os dados relativos à sensibilidade das cepas de *E. coli*, isoladas do músculo da ostra (Figura 8) aos antimicrobianos, ácido nalidíxico, ciprofloxacim e nitrofurantoína são semelhantes aos encontrados por Morelli (2003).



**FIGURA 8-** Percentual de susceptibilidades a antimicrobianos de cepas oriundas do músculo e líquido intervalvar da ostra.

## 5- CONCLUSÕES

- Se tomarmos os padrões da Comunidade Européia para coliformes termotolerantes em ostras, as amostras desse molusco capturado no Estuário do Rio Pacoti estariam em boas condições para o consumo.
- As águas do Rio Pacoti estão em boas condições segundo a legislação nacional.
- A maioria das cepas de *E. coli* (59,43%), isoladas da água do Rio Pacoti foi sensível aos antimicrobianos empregados, com exceção do imipenem para o qual as cepas de *E.coli* apresentaram alto percentual de resistência (80%).
- A sensibilidade das cepas de *E.coli* isoladas das amostras de ostras apresentou-se alta à maioria dos antibióticos testados, todavia o fato de nenhuma das cepas testadas ter apresentado susceptibilidade ao imipenem reforça ainda mais a preocupação com o uso indiscriminado de antibióticos, uma vez que, dificulta a profilaxia, no caso de ingestão deste alimento *in natura*, quando contaminado.
- É necessário uma Legislação mais clara, que possibilite a avaliação da qualidade microbiológica de moluscos consumidos *in natura*.



## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, R. K. S., BEVILAQUA, P. D., NASCIMENTO, L. D., CARVALHO, F. R. M., SILBA, C.B., **Coliformes como indicadores da qualidade da água: alcance e limitações**. XXBII Congresso Interamericano da Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto Alegre, 2000.

BLACK, J.G. **Microbiology; principles and applications**. Ed. 2 New Jersey; Prentice Hall, 1990.

BOFFI, A.V. **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. São Paulo: Ed. Hucitec, 1979. p.182.

BRASIL. **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA – ANVISA**. Resolução nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em: 06 de janeiro de 2007.

BRASIL (MINISTÉRIO DA SAÚDE). **Portaria MS nº 451**, de 19 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 set. 1997. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/451\\_97.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/451_97.htm)>. Acesso em: 10 jun. 2002.

CARDONHA, A. M. S., VIEIRA, R. H. S. F., RODRIGUES, D. P., MACRAL, A., PURANO, G., THEOPHILO. G. N. D., **International Microbiology**, v. 7, n. 3, setembro 2004, Vigueira Editores, p.213-218.

CERUTTI, R.L., BARBOSA, T.C.P. Flora Bacteriana Heterotrófica em Ostras (*Crassostrea rizophorae*) e Águas da Baía Norte, Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, p.330-334, 1991.



CETESB. **Relatório da balneabilidade das praias paulistas** 2002. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), p.208, São Paulo, 2003.

**CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA.** Resolução nº 274 de 29 de novembro de 2000. Sobre as águas doces, salobras e salinas destinadas à balneabilidade (recreação de contato primário). D.O.U., Brasília, DF, 8 jan. 2001. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.htm>. Acesso em: 17 de maio de 2002.

**CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA.** Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a qualidade dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes e dá outras providências. D.O.U., Brasília, DF. Disponível em <http://www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em 06 de janeiro 2007.

COSTA, F.N.; LIMA, R.M.S.; RABELO, R.N. Comportamento frente à ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isolados de derivados lácteos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n 92/93, p. 80-83, jan/fev, 2002.

DAME, R. F. Organismic level processes. In: **Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach**. c. 3, p. 35-74. New York: CRC Press, 1996.

DIAS, A. M. G., KANO, E., NAKAHARA, L. D., et. al. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from blood and cerebrospinal fluid. **Reviews Microbiology**. São Paulo, v. 25, n. 2, p. 77-82, 1994.

ESPINULA, O.; DIAS, R.R.C. O Mexilhão como matéria-prima alimentar. **ABIA/SAPRO**, n. 47, p. 10-30, abr. 1980.

GALTSOFF, P.S. The American oyster *Crassostrea virginica*. **Fish. Bull.**, v.64, p.1-480, 1964.

GAUTHIER, M. J. BREITTMAYER, V. A., BRAUX, A. S., Expression génique chez les bactéries entériques dans les conditions marines. In: PUNE/OMS-Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K): Survie des pathogènes. Rapports finaux sur les projets de recherche (1992-1993). MAP **Technical Reports series** n° 76. UNEP, Athens, 1993.

GRANT, S.J., PENDROY, C.P., MAYER, C.L., BELLIN, J.K., PALMER, C.J.P.; Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw and treated municipal sewage. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 62, n° 9, p.3466-3469, 1996.

GUILHERME, E.F.M.; SILVA, J.A.M. da; OTTO, S.S. *Pseudomona aureginosa*, como indicador de contaminação hídrica. **Higiene Alimentar**, v.14, n.76, p.43-47, set. 2000.

HAGLER, A.N., HAGLER, L.C.S.M., Indicadores Microbiológicos de qualidade sanitária, p. 88-96, in Roitman, I., TRAVASSOS, L.R., AZEVEDO, J.L. (eds.), **Tratado de Microbiologia**, v. 1, São Paulo, 1988.

JOSÉ, V.F. **Bivalves e a segurança do consumidor**. 1996. 182 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

KOLETAR, S. L., *Escherichia coli*. In: MAHON, C. R., MANUSELIS, G. JR. (Ed).Textbook **Diagnostic Microbiology**. Editora Saunders Company, Philadelphia, 1995. Cap. 3, 50-96.

KONEMAM, E. W., ALLEN, S. D., DOWELL, JR. V.R., et al. **Diagnóstico Microbiológico**-Texto e Atlas Colorido. Panamerican, 2° . ed., São Paulo, 1993.

LAMPARELLI, C.C. **O bivalve *Perna perna* (Linnaeus, 1758) como amostrador biológico das condições ecológico-sanitárias de águas costeiras**. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.124, 1987.

LEÃO, A.H.Y. **Resistência à  $\beta$ - Lactamase por presença de ESBL**. São Paulo, 1999. Disponível em <http://www.fleury.com.br/htmls/mednws/301/mdcontfcb0302.htm>. Acesso em: 20 de julho de 2005.

LECLERC, H., MOSSEL, D.A., EDBERG, S.C., STRUIJK, C.B., Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. **Annu. Reviews Microbiology**. 55, p. 201-234, 2001.

LEITÃO, M. F. F. Microrganismos patogênicos em alimentos. In: ROITMAN, I.; TRAVESSO, L. R.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole. P.30-31, 1988.

LIRA, A.A., et al. Aspectos sanitários do ambiente aquático onde são capturados moluscos bivalves para consumo no Grande Recife, PE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 77, p. 53-57, out., 2000.

LIZÁRRAGA-PARTIGA, M.L., CÁRDENAS, G.V. Influence of water circulation on marine and faecal bacteria in a mussel growing area. **Marine Pollution Bulletin**, v.32, n.2, p. 196-201, 1996.

MACHADO, I. C., et al. Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário da Cananéia, como subsidio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliiana*). 2 – Análise da ostra (tecidos moles e líquido intravalvar). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 83, p. 44-48, 2001.

MEHLMAN, I.J., ANDERWS, W.II., WENTZ, V.A. Coliform Bacteria, p.5.01-5.07, in **Bacteriological Analytical Manual**. Association of Official Analytical Chemists, 6<sup>th</sup> ed., Arlington, 1984.

MENDONÇA-HAGLER, L. C.; VIEIRA, R. H. S. F.; HAGLER, A. N. In: FARIA, B. M.; FARJALLA, V. F.; ESTEVES, F. A. (Ed.). Microbial Quality of water, sediment, fish and shellfish in some brazilian coastal regions. **Aquatics Microbial Ecology in Brazil**. Series Oecologia Brasilliensis, Rio de Janeiro, v.9, 2001, p.197-216.

MORELLI, A.M.F. **Isolamento de Enterococos e Coliformes fecais em ostras (*Crassostrea rhizophrae*) comercializadas na Praia do Futuro, Ceará**. Dissertação de mestrado em Tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Ceará, 2003.

MOTA, S., **Preservação dos recursos hídricos**. ABES (Associação Brasileira Dos Engenheiros Sanitaristas). 222p., Rio de Janeiro, 1988.

MURRAY, P.R. **Microbiologia Médica**. 3 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 73, 2000.

NATARO, J.P., KAPER, J.B., Diarrheagenic Escherichia coli. American Society for Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 11-12, p. 147-150, 1998.

NOVAES, A.L.T. **Desenvolvimento de um sistema para lavagem e classificação de ostras**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

NUNES, A.J.P.; PARSONS, G.J. Dynamics of tropical coastal aquaculture systems and the consequences to waste probulation. **Word Aquaculture**, Los Angeles, v. 29, n. 2, p. 27-37, 1998.

PANORAMA DA AQUICULTURA. Santa Catarina tem produção recorde de mexilhões em 2005. **Panorama da aquicultura**. Vol.16, nº 94, p. 30-31, 2006.

PELCZAR, M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R.; **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, 2ª edição, v. 1, São Paulo, Makron Books, 1996.

PITT, R. E. Effects of urban runoff on aquatic biota. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JÚNIOR, G. A.; CAIRNS JÚNIOR, J. (Eds). **Handbook of ecotoxicology**. cap. 28, p. 609-630. New York: Lewis Publishers, 1995. 755 p.

PROENÇA, C.E.M.; AVELAR, J.C.; NETO, F.M.O. **Plataforma do Agronegócio da Malacocultura**. Brasília: CNPq. MAPA, DPA, p.12, 2001.

**Programa Nacional de Desenvolvimento da Maricultura**. Disponível em <http://200.198.202.145/seap/html/programaMaricultura.htm> 2003. Acesso em 06 de janeiro de 2007.

RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. Rio Grande: Fundação do Rio Grande – FURG, p. 368, 1994.

ROZEN, Y., BELKIN, S., Survival of enteric bacteria in seawater. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.725, p. 1-17, 2001.

SALATI FILHO, E. **Condicionantes do desenvolvimento sustentável do litoral norte Paulista: o exemplo da bacia do córrego de Lagoinha Ubatuba- SP**. Tese de Doutorado- Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio claro, p.148, 2001.

SANCHEZ, S.P. et al. Caracterização da Qualidade Microbiológica de Águas Marinhas e Moluscos Bivalves do Litoral Norte do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 16, 1991. **Anais...** 1991.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 295, 1997.

SILVA, N. da, CANTUSIO NETO, R., JUNQUEIRA, V.C.A. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica da Água**. Campinas, ITAL, p. 99, 2000.

SILVA. A. I. M. **Bactérias de origem fecal, contaminantes de ostras "Crassostrea rhizophorae", oriundas de criadouro natural no estuário do Rio Cocó, Fortaleza-Ceará**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Pesca – Universidade Federal do Ceará, 56 p., 2003.

TÔRRES, R.C.O. *Escherichia coli*, p. 184-138, in Vieira, R. H. S. F., **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado**. Editora Varela, 380 p., São Paulo, 2004.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**. 6 Ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, p.729, 2000.

VALENTI, W.C. **AQUICULTURA NO BRASIL: bases para o desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq [s.n.], p. 25-32, 2000.

VASCONCELOS, R.H. **Balneabilidade das praias de Iracema e Náutico (Fortaleza – Ceará) e pesquisa de cepas de *Escherichia coli* patogênicas em suas águas**. Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca – Universidade Federal do Ceará, p.31, 2005.



VIEIRA, R. H. S. F.; SILVA, A. I. M.; SOUSA, O. V.; HOFER, E.; VIEIRA, G. H. F.; SAKER-SAMPAIO, S.; LIMA, E. A. Análise experimental sobre a viabilidade de *Escherichia coli* em água do mar. **Arquivo de Ciências do Mar**, Fortaleza. v. 34, p. 43-48, 2001.

WEGWNER, H.C., BAGER, F., ARESTRUP, F. M., **Vigilância da resistência aos antimicrobianos no homem, nos produtos alimentares e no gado da Dinamarca**. Surveillance report. Dinamarca, v. 2, nº 3, p. 17-19, 1997. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/em/v02n03/0203-421.asp>. Acesso em: 13 de março de 2005.

ZAMARIOLI, L.A., et al. Estudo microbiológico do tecido mole de bivalves *Crassostrea brasiliiana*, *Perna perna* e *Mytella Falcada* recém coletados nos bancos naturais do litoral da baixada santista. São Paulo. Secretaria. de Estado da Saúde. **Relatório Apresentado ao Grupo de Vigilância Sanitária DIR XIX**. São Paulo, 1997.