



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

**QUANTIFICAÇÃO DE VÍBRIOS E DE COLIFORMES TOTAIS E FECALIS NA
OSTRA NATIVA *Crassostrea rhizophorae* E NA ÁGUA DO ESTUÁRIO DO
RIO JAGUARIBE, FORTIM-CE.**

RÉGIS FERNANDES VASCONCELOS

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
JULHO/2006**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, D.Sc.
Orientador/Presidente

Prof.^a Silvana Saker Sampaio, Ph.D.
Membro

Oscarina Viana de Sousa, D.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)

V451q Vasconcelos, Régis Fernandes.

Quantificação de vibrios e de coliformes totais e fecais na ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* e na água do estuário do Rio Jaguaribe, Fortim-Ce / Régis Fernandes Vasconcelos. – 2006.

32 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2006.

Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

1. Ostra nativa. 2. Água - Qualidade. 3. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

SÚPLICA DA OSTRÁ

Regine Limaverde

Sou ostra e vivo
perdida nos mangues.

A luz dos raios de sol
douram a minha vida
mas nunca o suficiente
para matar as bactérias
que habitam em mim.

Delas tento me afastar
pois podem contaminar
crianças que se alimentam
do meu corpo,
mas o homem cultiva-as
nos dejetos que joga
na minha casa,
no lixo que insiste
em contaminar minhas águas.

Preciso ensinar, pedir,
rogar a ele
que cuide
da minha casa,
dos meus rios,
do meu mundo.
Tento dizer-lhe que
as maldições voltam.
Quem polui meu *habitat*
um dia adoecerá.
Aviso a todos
antes que seja tarde.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador de todas as coisas, Jeová Deus, por ter permitido a realização deste trabalho.

À Prof.^a Regine, pela orientação, acessibilidade, paciência e tempo dedicados a mim.

À Prof.^a Tereza Cristina, por quem tenho muito respeito e admiração, pela experiência, ética profissional e valores que me repassou.

Às pessoas que mais contribuíram para minha formação profissional, Max e Rachel, pelos anos de orientação, conselhos e companheirismo.

À Prof.^a Silvana, pela disponibilidade, paciência e ajuda com a análise dos dados.

Aos meus pais, Wilson e Ivoneide, pelos anos de ajuda, apoio e educação dedicados à minha pessoa.

Aos meus tios, Cleide e Ferreirinha, pelo apoio e pelos momentos agradáveis que me proporcionaram.

Aos meus irmãos, Victor e Thiago, pelo companheirismo e compreensão.

Ao meu amor, Lívia, que me acompanhou e me incentivou durante toda a trajetória deste curso.

Aos estagiários e bolsistas do GEMB, Caroline, Fernando, Igor e Tiago, pela força e amizade.

Às “reginetes”, Anahy, Camila, Cláudia, Cristiane, Dannielle, Gardenny, Gleire, Karla, Norma, Oscarina, Rakel, Rosa e em especial à Edirsana, que me ajudaram e muito contribuíram para a realização desta pesquisa.

A todos os meus amigos e colegas de graduação que certamente contribuíram de alguma forma para minha vida pessoal e formação profissional.

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tabelas.....	iii
1. Introdução.....	1
2. Material e Métodos.....	5
2.1. Procedimentos de Campo.....	5
2.2. Procedimentos de Laboratório.....	6
2.2.1. Preparo das amostras.....	6
2.2.2. Inoculação dos meios e consulta à tabela do NMP.....	7
2.3. Variáveis Físico-Químicas.....	14
2.4. Análise Estatística.....	14
3. Resultados e Discussão.....	15
4. Conclusões e Recomendações.....	21
5. Referências Bibliográficas.....	22

RESUMO

A ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* é bastante consumida no Nordeste, principalmente na forma *in natura*, o que representa um risco para a população, pois são bioacumuladoras e podem ser veiculadoras de patógenos. Este trabalho objetivou a quantificação de *Vibrio* e de coliformes totais (CT) e fecais (CF) através do Número Mais Provável (NMP) em amostras de água e ostra. As amostras foram coletadas no estuário do Rio Jaguaribe e transportadas em caixas isotérmicas ao laboratório, onde foram realizados os testes microbiológicos. Para CT o NMP variou de <1,8 a 3.500/100mL na água, e de <1,8 a >16.000/g nas ostras, enquanto que para CF, variou de <1,8 a 490/100mL e <1,8 a >16.000/g para água e ostra, respectivamente. A análise estatística revelou concentrações significativamente maiores nas ostras para *Vibrio* e Coliformes, confirmando o potencial bioacumulador destes organismos. As amostras de água mantiveram-se dentro dos limites para CF estabelecidos pela Resolução N°357/2005 do CONAMA, indicando uma boa qualidade. Já as ostras foram avaliadas segundo *The European Union Shellfish Quality Assurance Programme-EUSQAP*, tendo em vista a inexistência no Brasil de padrões regulamentadores de CF em ostras *in natura* consumidas cruas. De acordo com este Programa, 92,86% das amostras mantiveram-se dentro dos padrões aceitáveis. Para *Vibrio*, não existe legislação no Brasil que regule seus níveis aceitáveis. Tendo em vista a patogenicidade dos víbrios e coliformes, é de grande importância a implementação de uma legislação adequada que regule estas bactérias nos casos acima citados.

(Palavras-chave: Ostra, *Vibrio*, Coliformes, NMP).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de satélite do Estuário do Rio Jaguaribe mostrando o local das coletas (Lansat – 7).....	6
Figura 2. Desenho esquemático das etapas para quantificação de CT e CF em ostras.....	9
Figura 3. Desenho esquemático das etapas para quantificação de CT e CF nas amostras de água.....	10
Figura 4. Desenho esquemático das etapas para quantificação de <i>Vibrio</i> em ostras.....	12
Figura 5. Desenho esquemático das etapas para quantificação de <i>Vibrio</i> nas amostras de água.....	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Fecais e de *Vibrio* spp. em amostras de água e de ostra coletadas no Estuário do Rio Jaguaribe, Fortim- CE.....15

Tabela 2. Variáveis físico-químicas durante o período amostral.....18

QUANTIFICAÇÃO DE VÍBRIOS E DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM OSTRA NATIVA *Crassostrea rhizophorae* E NA ÁGUA DO ESTUÁRIO DO RIO JAGUARIBE, FORTIM-CE.

RÉGIS FERNANDES VASCONCELOS

1. INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos por bactérias patogênicas é de grande interesse para a saúde pública. De acordo com GERMANO et al. (1993), são confirmados apenas 1 a 10% do número real de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos – DTA's. Embora as estatísticas brasileiras sejam precárias, acredita-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar seja bastante elevada (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Uma grande quantidade de microrganismos patogênicos para o homem pode ser veiculada através do pescado. A descarga de esgotos nas águas de reservatório, nos rios e no mar são as causas poluidoras mais comuns de ambientes aquáticos registradas no mundo inteiro (CONSTANTINIDO, 1994). De acordo com COOK et al. (2001), a maior epidemia associada ao consumo de moluscos ocorreu em 1988 em Shanghai, China, com mais de 300.000 casos de hepatite A reportados. A causa da epidemia foi o consumo de moluscos crus capturados em um porto que recebia despejos de esgotos domésticos sem tratamento.

Moluscos bivalves são organismos filtradores que possuem a capacidade de acumular, principalmente em suas brânquias e intestino, substâncias e microrganismos presentes na água. Uma única ostra, por exemplo, possui a capacidade de filtrar aproximadamente quatro litros de água por hora, de maneira que a quantidade de bactérias em seu intestino é superior à encontrada na água circundante (WOOD, 1979). 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 ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae*, apresenta uma distribuição geográfica que abrange a região Sul do Caribe, Venezuela, Suriname e Brasil até o Uruguai (RIOS, 1994), sendo uma das principais espécies de bivalves consumidas no Nordeste brasileiro. Em diversos estados brasileiros, inclusive no Ceará, tem-se por hábito o consumo desse molusco na forma *in natura*, o que representa um risco para a população, uma vez que estes organismos são bioacumuladores e veiculadores de bactérias patogênicas que eventualmente estejam presentes no ambiente em que vivem.

A microbiota presente na carne desses organismos está diretamente relacionada ao ambiente do qual eles se originam (ZAMARIOLI et al., 1997) sendo o seu consumo freqüentemente relacionado com doenças infecciosas de origem alimentar (COOK et al., 2001; JOSE, 1996).

A maioria dos padrões que normatizam a qualidade microbiológica da água de cultivos utilizam a quantificação de coliformes, pois este grupo é indicador de contaminação fecal (MACHADO 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 fecais (CF) é o indicador microbiológico de contaminação fecal mais utilizado, abrangendo espécies de enterobactérias, incluídas nos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. Segundo SILVA et al. (1997), *Escherichia coli* é a espécie mais conhecida e mais facilmente diferenciada dos membros não fecais. O *habitat* natural e principal reservatório de *E. coli* é o trato intestinal de homens e de outros animais de sangue quente (LEITÃO, 1988). Uma característica importante dos CF na sua classificação é o possível crescimento em temperaturas de até 44,5°C, letal para muitos outros microrganismos (MENDONÇA-HAGLER et al., 2001).

NASCIMENTO et al. (2001), estudando a colimetria das águas do Rio Bacanga (São Luís, Maranhão), e de peixes e sururus coletados em suas águas, detectaram quantidades de CF muito maiores do que as permitidas pela atual Legislação (ANVISA, 2001), que é no máximo de 10²/g para pescados,

ovas de peixes, crustáceos e moluscos *in natura*, resfriados ou congelados, não consumidos crus.

Considerando-se a existência de contaminação fecal em águas onde ocorre despejo de esgoto, a biota do ecossistema também apresenta algum grau de contaminação. Neste caso, sob o aspecto da saúde pública, deve ser dada importância à pesquisa de coliformes na água e na carne de animais cultivados ou oriundos do extrativismo que se destinam ao consumo humano (WEST et al., 1985).

As contagens de bactérias em moluscos são determinadas no músculo do animal e apresentam um número semelhante àquele encontrado nos peixes (VIEIRA, 2004). A decomposição do pescado depende do número e da espécie das bactérias infectantes, uma vez que há grande variação no comportamento destas no que diz respeito à capacidade de causar deterioração (ROSINVALLI e CHARM, 1975).

Alguns autores citam que os gêneros predominantes nos peixes e moluscos de águas temperadas são: *Acinetobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Shewanella* e *Vibrio* (SCHERECKENBERGER e GRAEVENITZ, 1999), enquanto espécies de *Bacillus*, *Micrococcus* e grupos bacterianos corineformes freqüentemente estão presentes em pescados capturados em águas subtropicais e tropicais (SHEWAN, 1962).

MENDES (2001), ao analisar ostras comercializadas na grande Recife – PE durante três meses do período chuvoso e três do período de estiagem, verificou contaminação por *Vibrio* spp., *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. carchariae*, *V. cincinnatiensis*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* não O1, *V. damsela*, *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *Salmonella enterica* sorovar Infantis e Albany, *Escherichia coli*, EPEC e EIEC, não apresentando *Shigella* ou *Staphylococcus aureus* e, verificando ainda, que a sazonalidade influenciou no Número Mais Provável (NMP) de víbrios e de coliformes totais e fecais.

O gênero *Vibrio* é composto de muitas espécies de bacilos curvos, sendo doze espécies implicadas em infecções humanas. De acordo com *List of bacterial names with standing in nomenclature* (LBNSN, 2005), são descritas atualmente 75 espécies pertencentes a este gênero. THOMPSON et al. (2004)

afirma que nos últimos anos foram descritas vinte novas espécies (*Enterovibrio coralli*, *Photobacterium euosenbergii*, *Vibrio brasiliensis*, *V. chagasii*, *V. coralliilyticus*, *V. crassostreae*, *V. fortis*, *V. gallicus*, *V. hepatarius*, *V. hispanicus*, *V. kanaloaei*, *V. neonatus*, *V. neptunius*, *V. pomeroyi*, *V. pacinii*, *V. rotiferianus*, *V. superstes*, *V. tasmaniensis*, *V. ezurae* e *V. xuii*). Segundo MURRAY et al. (2004), o *Vibrio cholerae*, o *V. parahaemolyticus* e o *V. vulnificus* são os mais proeminentes.

Os vibrios são capazes de se multiplicar sem hospedeiro em águas marinhas e possuem nutrição saprófita, dependendo diretamente da temperatura do meio (LIMA, 1997). Segundo WONG et al. (1992), a presença de vibrios halófilos é elevada em amostras de água e sedimento marinho.

Bactérias do gênero *Vibrio*, assim como os coliformes, podem causar diversos transtornos à população como febre, diarreia, vômito e desidratação, além de outras enfermidades de maior gravidade.

Dentre os diversos substratos existentes, os vibrios podem ser encontrados em ostras, camarões, mexilhões, algas marinhas e peixes, assim como em água, sedimento e plâncton, sendo muitas vezes classificados como patógenos oportunistas (GOMEZ-GIL et al., 1998; CAVALLO; STABILI, 2004).

As ostras, por serem organismos filtradores, apresentam-se como ótimos indicadores de poluição ambiental e, desta maneira, estudos envolvendo a qualidade microbiológica destes organismos, assim como do ambiente em que se encontram, são de grande importância para a preservação da saúde e bem-estar da população.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo quantificar coliformes totais e fecais (termotolerantes) e *Vibrio*, através do Número Mais Provável (NMP), em amostras de ostras e de água provenientes do estuário do Rio Jaguaribe, Fortim – CE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos de campo

Exemplares da ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* foram coletados no estuário do Rio Jaguaribe, no Município de Fortim – CE, durante o período compreendido entre 09/09/2005 e 28/04/2006. As amostragens foram realizadas com periodicidade quinzenal, perfazendo um total de quatorze amostras. Em cada amostra foram coletadas, durante a maré vazante, aproximadamente trinta ostras adultas, totalizando 420 indivíduos analisados. Simultaneamente, também foram coletadas para análises amostras de água em frasco âmbar de 1 litro.

Após as coletas, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Pescado e Ambiental, do Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR/UFC, onde foram realizadas as análises microbiológicas.

A área de coleta está localizada entre as coordenadas 04°27'39,3"S e 37°47'31,8"W, conforme mostrado na figura 1.



Figura 1. Imagem de satélite do Estuário do Rio Jaguaribe mostrando o local das coletas (Lansat – 7).

2.2. Procedimentos de Laboratório

2.2.1. Preparo das amostras

- Para a determinação do NMP de Coliformes Totais e Fecais

Para a contagem de Coliformes Totais (CT) e Fecais (CF) nas ostras, após a lavagem, secagem e abertura asséptica das conchas, foram retirados 25g de carne da ostra juntamente com o líquido intervalvar que, em seguida, foram homogeneizados com 225mL de solução salina 0,85% obtendo-se, desta forma, a diluição 10^{-1} , a partir da qual foram preparadas as demais diluições, de 10^{-2} a 10^{-4} .

Para as amostras de água os inóculos utilizados foram de 10, 1, 10^{-1} e 10^{-2} mL, sendo o primeiro inóculo (10mL) realizado diretamente em Caldo Lauril duplamente concentrado e o segundo (1mL) inoculado diretamente em Caldo Lauril simples. Para o preparo da diluição 10^{-1} retirou-se uma alíquota de 1mL da amostra bruta que em seguida foi inoculada e homogeneizada em 9mL de solução salina 0,85% sendo, a partir desta, inoculada a diluição seguinte (10^{-2}).

- **Para a determinação do NMP de *Vibrio***

Para a contagem de *Vibrio* foram adotados os mesmos procedimentos empregados para contagem de coliformes, entretanto fez-se uso de salina 1% esterilizada, e as diluições utilizadas nessas contagens foram de 10^{-1} a 10^{-4} para as amostras de água e de ostras.

2.2.2. Inoculação dos meios e consulta à tabela do NMP

- **Coliformes Totais e Fecais**

Para a determinação do NMP de CT e de CF foi utilizada a técnica de fermentação em tubos múltiplos, segundo FENG et al. (2002). A análise do material foi dividida em duas etapas: prova presuntiva e prova confirmatória.

Os inóculos utilizados para a análise das ostras foram de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} mL, enquanto que para as amostras de água os inóculos foram de 10, 1, 10^{-1} e 10^{-2} mL.

Para o teste presuntivo foi utilizada para cada diluição, uma seqüência de 5 tubos com tubos de Durhan invertidos, fazendo-se uso de Caldo Lauril Triptose - CLT (Difco).

Após o processo de inoculação, todos os tubos foram incubados em estufa a 35°C por 48 horas. Depois deste período os tubos que apresentaram reação positiva (turvação do meio de cultura e produção de gás com formação de bolha nos tubos de Durhan) foram submetidos aos testes confirmatórios de CT e de CF.

Para o teste confirmatório de CT, dos tubos considerados positivos no teste presuntivo foram retiradas alíquotas que foram posteriormente inoculadas

em novos tubos (com tubos de Durhan invertidos) contendo Caldo Bile Verde Brilhante - CBVB (Difco), os quais foram incubados em estufa a 35°C por 48 horas. A consulta à tabela do NMP se deu através da contagem dos tubos positivos e da escolha da série crítica. As estimativas do NMP das amostras de ostras foram expressas em NMP/g, e em NMP/100mL para as amostras de água (GARTHRIGHT, 2001).

No teste confirmatório de CF, foi utilizado o mesmo procedimento adotado para CT, entretanto, utilizou-se Caldo EC (Difco) como meio de cultura, e incubando-se os tubos em banho-maria a 44,5°C por 48 horas. Novamente, de acordo com o número de tubos positivos e dependendo da escolha da série crítica, a tabela foi consultada para se obter o NMP de CF (NMP/g e/ou NMP/100mL).

Todos os procedimentos acima citados podem ser evidenciados nas figuras 2 e 3.

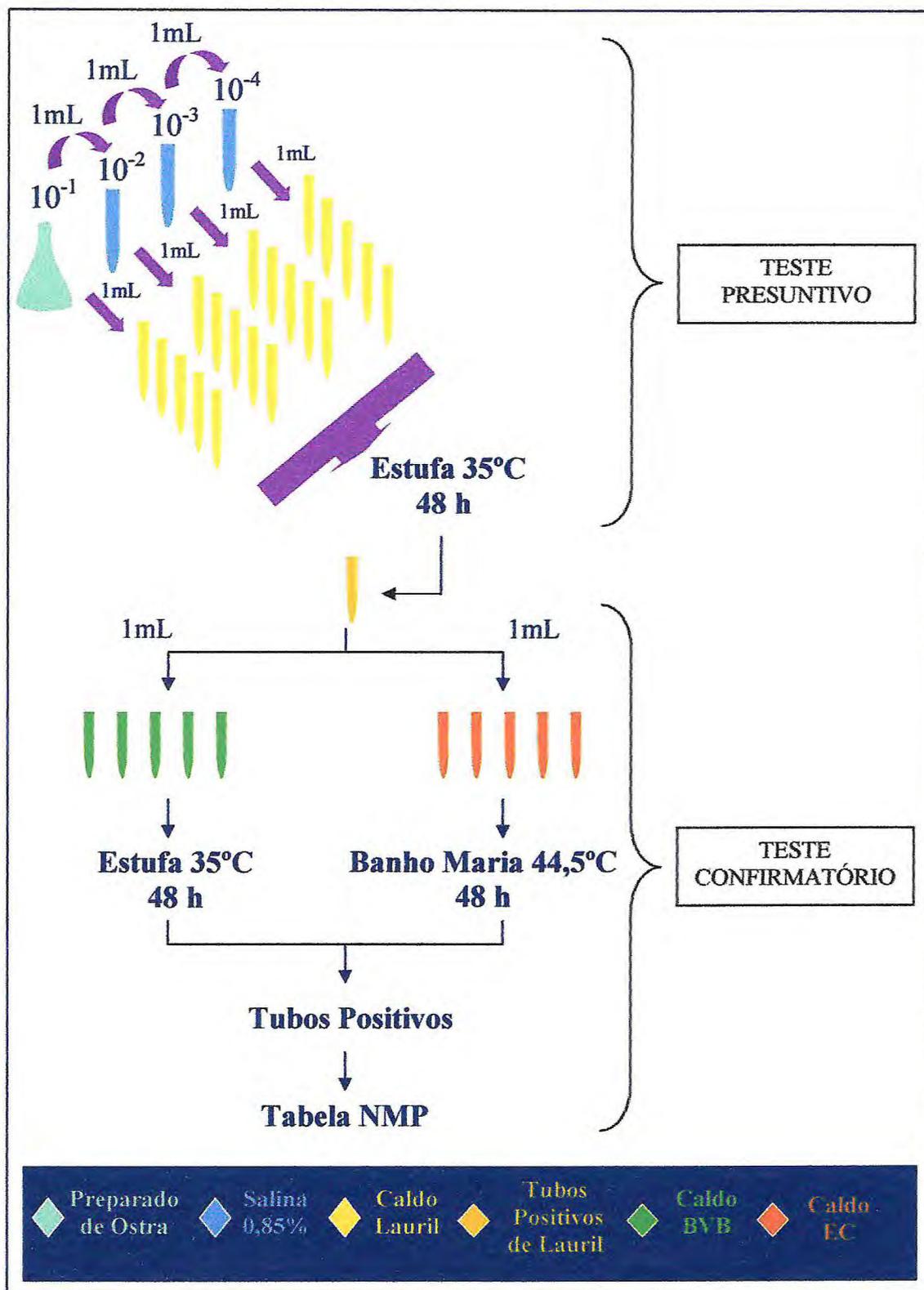


Figura 2. Desenho esquemático das etapas para quantificação de CT e CF em Ostras.

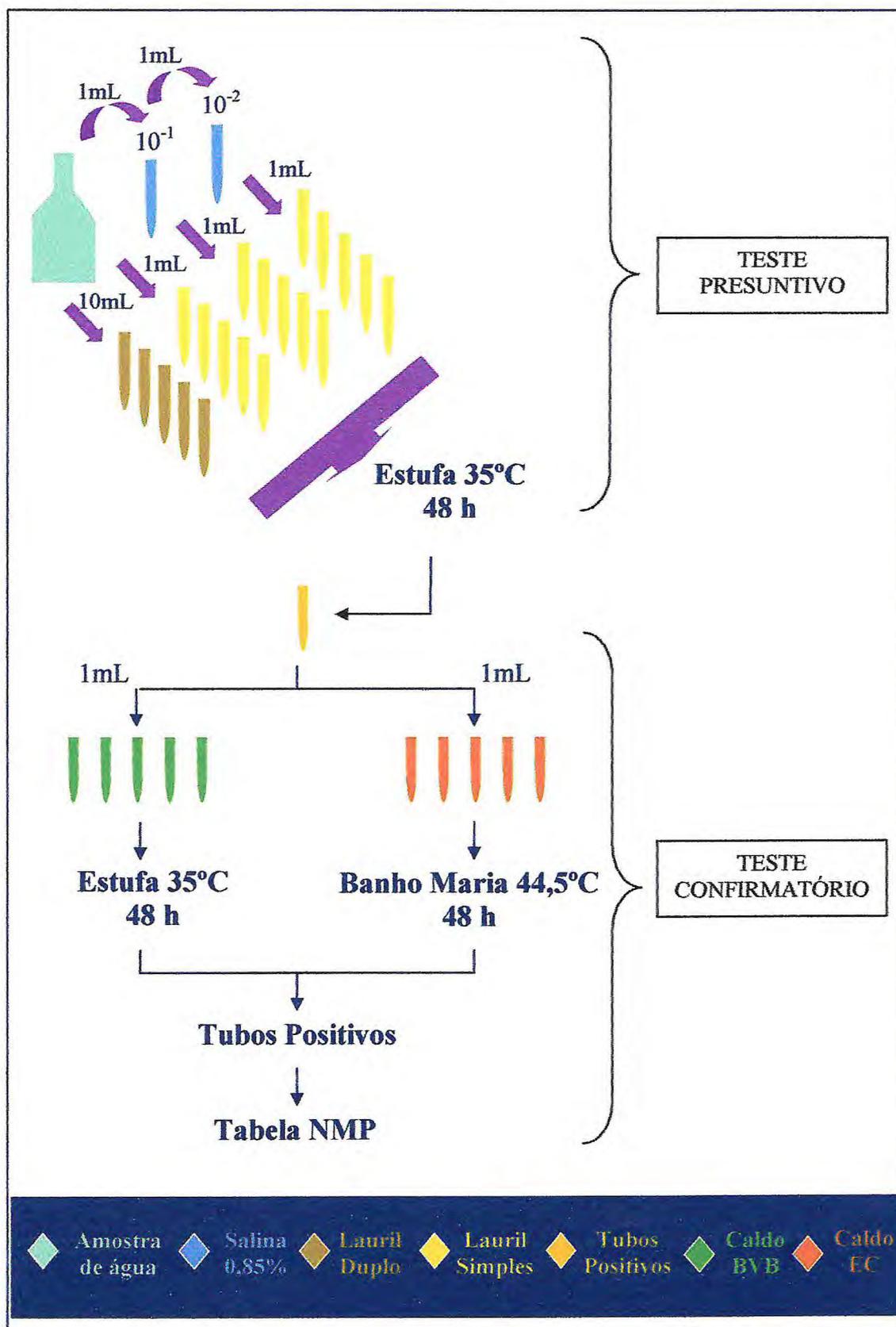


Figura 3. Desenho esquemático das etapas para quantificação de CT e CF nas amostras de água.

- *Vibrio*

Para quantificação de *Vibrio* spp. foram utilizados os mesmos procedimentos de preparo das diluições usados para coliformes, entretanto foi utilizado como diluente salina 1%, segundo KAYSNER e DEPAOLA Jr. (2004).

No teste presuntivo a partir das diluições 10^{-1} a 10^{-4} , previamente preparadas, foram inoculadas porções de 1mL em tubos (5 tubos por diluição) contendo Água Peptonada Alcalina (APA/pH 8,5) que foram, em seguida, incubados em estufa a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16 a 18 horas. Após este período os tubos positivos (meio de cultura turvo) foram submetidos ao teste confirmatório.

O teste confirmatório consistiu na inoculação (técnica de estriamento) dos tubos positivos em placas contendo meio TCBS que, em seguida, foram incubadas em estufa a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Depois da incubação as placas consideradas positivas (crescimento de colônias sacarose positiva ou negativa) foram utilizadas para consulta à tabela e determinação do NMP de *Vibrio* nas amostras de ostra e água. O NMP de todos os resultados cuja série crítica não se encontrava na tabela do NMP, foi estimado segundo GREENBERG et al. (1992) através das seguintes fórmulas:

$$\text{NMP/g} = \frac{\text{número de tubos positivos}}{\sqrt{\text{mL da amostra nos tubos negativos}} \times \sqrt{\text{mL da amostra em todos os tubos}}}$$

$$\text{NMP/100mL} = \text{NMP/g} \times 100$$

As etapas utilizadas para determinação do NMP de *Vibrio* são mostradas nas figuras 4 e 5.

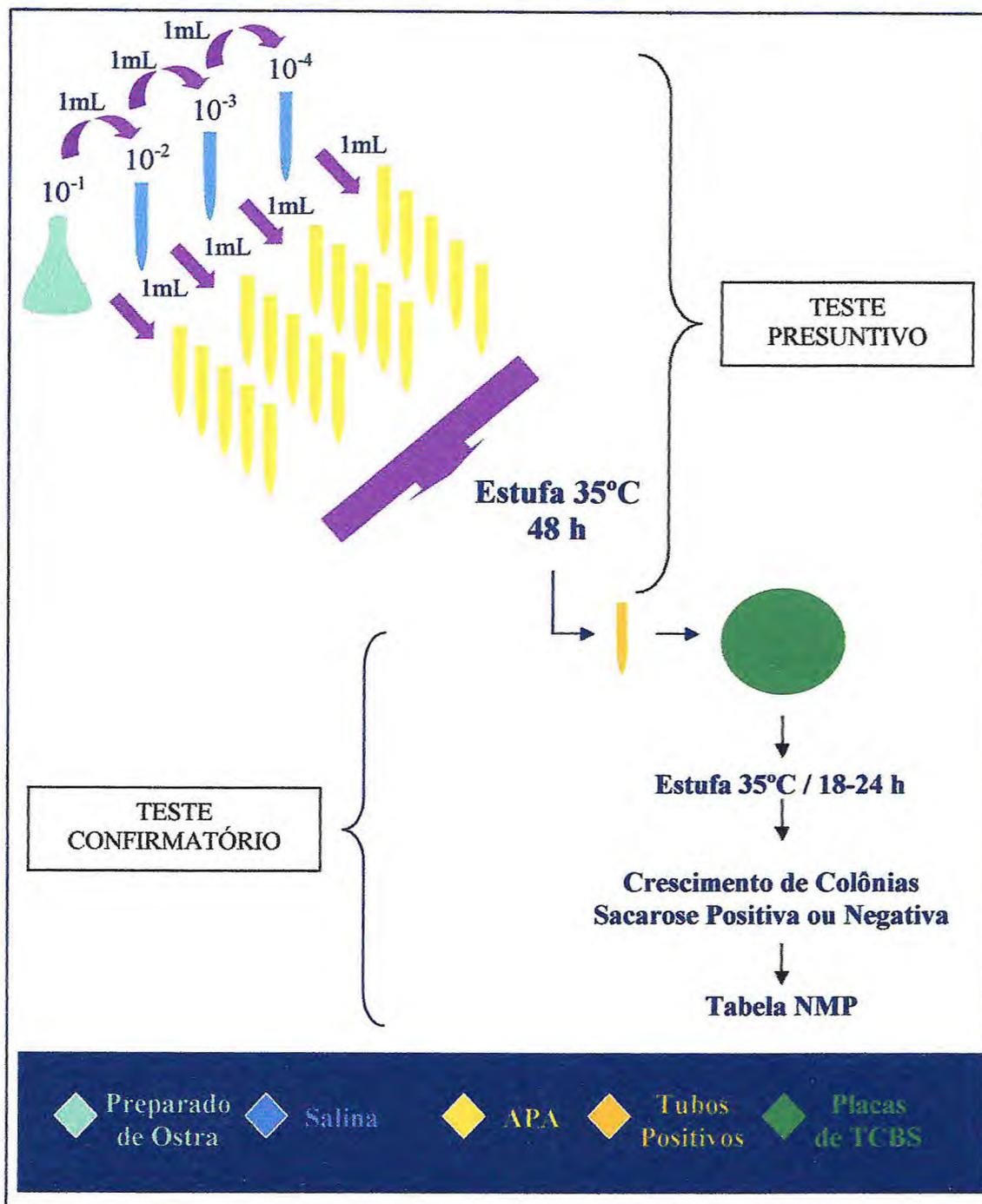


Figura 4. Desenho esquemático das etapas para quantificação de *Vibrio* em ostras.

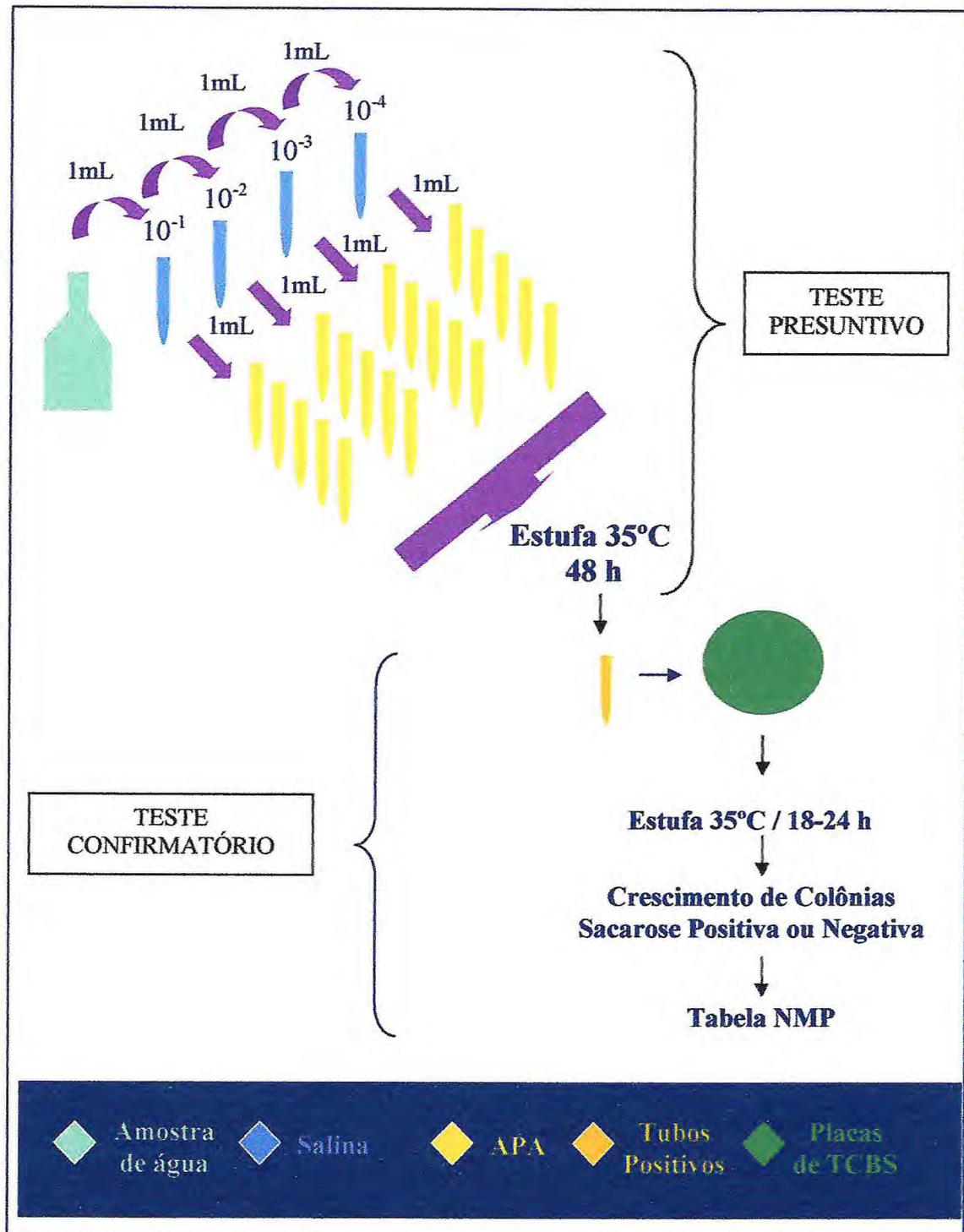


Figura 5. Desenho esquemático das etapas para quantificação de *Vibrio* nas amostras de água.

2.3. Variáveis Físico-químicas

As variáveis físico-químicas, salinidade (S), oxigênio dissolvido (OD) e temperatura (T) foram determinadas *in locu* durante cada amostragem, enquanto o pH foi medido no laboratório. As sondas utilizadas foram as seguintes: refratômetro Biobrix 211 BP (salinidade), oxímetro Lutron DO-5510 (OD e T) e pHmetro Marconi PA200P (pH).

2.4. Análise Estatística

Todos os resultados de NMP foram submetidos ao teste de Shapiro - Wilk para verificação de normalidade. Nos casos em que a homocedasticidade não foi constatada, os dados foram logaritmizados. Em seguida, os resultados de NMP de CF, CT e *Vibrio* encontrados nas amostras de água (NMP/mL) e de ostra (NMP/g) foram comparados pelo teste *t* de Student não-pareado unilateral, para um nível de significância de 5%, usando o BioEstat 4.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de NMP para CT encontrados nas amostras de água e ostra variaram de <1,8 a 3.500 /100mL e de <1,8 a >16.000/g, respectivamente, enquanto que, para CF ou termotolerantes nas amostras de água variaram de <1,8 a 490/100mL e nas de ostras de <1,8 a >16.000/g (Tabela 1).

Tabela 1. Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Fecais e de *Vibrio* spp. em amostras de água e de ostra coletadas no Estuário do Rio Jaguaribe, Fortim- CE.

Coleta	Coliformes Totais		Coliformes Fecais		<i>Vibrio</i>	
	Água (NMP/100mL)	Ostra (NMP/g)	Água (NMP/100mL)	Ostra (NMP/g)	Água (NMP/100mL)	Ostra (NMP/g)
1	<1,8	20	<1,8	<1,8	6.450	9.200
2	<1,8	110	<1,8	110	7.000	330
3	2	170	2	2	35.000	9.200
4	29,9	<1,8	27,6	<1,8	24.000	9.200
5	<1,8	2	<1,8	2	14.000	9.200
6	33,4	9.200	31,4	27,86	>1.600.000	4.300
7	4,5	<1,8	4,5	<1,8	>1.600.000	> 16.000
8	2	<1,8	2	<1,8	13.000	>16.000
9	7,8	<1,8	2	<1,8	>1.600.000	>16.000
10	<1,8	2	<1,8	<1,8	24.000	>16.000
11	50	2	20,6	2	21.000	>16.000
12	170	>16.000	170	>16.000	1.600.000	>16.000
13	93	34,2	68	12,2	920.000	9.200
14	3.500	430	490	430	920.000	16.000

Os atuais padrões microbiológicos para alimentos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001), Resolução N° 12, não limitam CT ou CF em moluscos bivalves *in natura* consumidos crus, o que dificulta uma avaliação da qualidade microbiológica deste alimento. Na Portaria anterior N° 451 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997), havia limites máximos de NMP de $10^2/g$ para CF nesse tipo de alimento. Entretanto, uma vez que esta Portaria está revogada, foi utilizado *The European Union Shellfish Quality Assurance Programme – EUSQAP* (RODGERS, 2001) para classificar a qualidade microbiológica das ostras analisadas. Segundo esse Programa, os moluscos são classificados em três categorias: **A**, **B** e **C**. O que difere uma da outra é a quantidade permitida de CF por 100g de massa visceral juntamente como o líquido intervalvar. Na categoria **A**, a permissão é de < 300 CF /100g; na categoria **B** 90% das amostras não podem exceder a 6.000 CF/100g e na **C** não podem exceder a 60.000 CF/100g. Neste caso, de acordo com esse Programa, as amostras seriam assim classificadas: nove (64,3%) estariam na categoria **A**; duas estariam na categoria **B** (14,3%); duas na categoria **C** (14,3%) e uma estaria fora de qualquer categoria e, portanto, seria rejeitada.

Com relação às análises de água, seguiu-se os padrões para corpos d'água estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA em sua Resolução 357/2005 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 deverá exceder 43/100mL. Embora o número de amostras tenha sido apenas 14, e não 15, como determina esta Resolução, pode-se afirmar que ao se calcular a média geométrica, encontra-se um valor de 9,3, o que significa que as amostras de água estariam dentro do padrão exigido pelo CONAMA (2005) para cultivo de bivalves destinados à alimentação humana.

Os testes estatísticos revelaram que houve diferença estatística ($\alpha=5\%$) entre as amostras de água e ostras tanto para CT ($p<0,0001$) como para CF ($p<0,0001$). É interessante frisar que os resultados de CF das amostras de água, para uma melhor comparação com a legislação do CONAMA (2005), estão grafados na tabela em NMP/100mL, e os de ostra sempre em NMP/g, entretanto, para a aplicação dos testes estatísticos os dados foram

transformados em unidades semelhantes a fim de possibilitar a comparação dos resultados. As amostras de ostras apresentaram números de CT e CF estatisticamente maiores que as amostras de água.

MACHADO et al. (2001) sugerem que a determinação de CF em tecidos moles e líquido intervalvar para avaliar a qualidade dos moluscos, apresenta maiores possibilidades como padrão de normatização no cultivo do que a análise em água das áreas produtivas, uma vez que as ostras seriam concentradoras dos resíduos e conseqüentemente dos CF existentes na água onde ela estivesse inserida.

Nas contagens de *Vibrio* o NMP das amostras de água variou de 6.450 a >1.600.000/100mL e nas ostras de 330 a >16.000/g. Não existe legislação no Brasil que regulamente os níveis toleráveis de *Vibrio* em moluscos bivalves, nem em águas destinadas à aqüicultura.

As concentrações de *Vibrio* nas amostras de ostra foram estatisticamente maiores ($p = 0,0130$) que nas amostras de água, confirmando que as ostras, sendo animais filtradores, possuem a capacidade de concentrar em seu intestino, bactérias presentes na água (WOOD, 1979; NUNES; PARSONS, 1998).

Outra hipótese, que pode explicar as maiores concentrações de *Vibrio* observadas nas ostras, seria a descarga de efluentes contaminados e o carreamento de matéria orgânica para o estuário. Em estudo realizado nesse mesmo estuário, foi observada durante os testes microbiológicos, uma alta positividade para CF em alguns pontos do rio possivelmente devido o lançamento de águas residuais (VIEIRA et al., *in press*). Ainda, segundo estes autores, a poluição orgânica de natureza fecal pode favorecer a multiplicação dos víbrios.

Os parâmetros físico-químicos, durante o período amostrado, apresentaram as seguintes variações: Temperatura (T) de 28,8 a 31,5°C; Salinidade (S) de 6 a 45‰; Oxigênio Dissolvido (OD) de 3,8 a 7,0mg/L; e pH de 6,90 a 8,23 (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis físico-químicas durante o período amostrado.

Coleta	Hora	T (°C)	S (‰)	OD (mg/L)	pH
01	12:10	29,6	37	4,60	8,06
02	11:45	29,6	40	6,00	8,10
03	11:35	29,6	40	6,80	8,23
04	11:15	29,5	41	7,00	7,65
05	10:20	29,6	40	4,90	7,60
06	10:00	29,7	40	5,00	8,02
07	11:35	31,5	40	5,70	7,69
08	07:05	28,8	44	4,60	8,23
09	09:30	29,5	45	4,70	8,16
10	10:40	30,7	42	4,70	8,02
11	07:00	30,4	16	3,80	7,65
12	06:00	30,2	16	4,00	6,90
13	07:50	29,2	25	4,08	7,97
14	11:30	31,0	6	5,60	7,60

As elevadas temperaturas e a pequena amplitude térmica apresentada durante o período amostrado podem ser consideradas normais para os trópicos e, nestas condições, o desenvolvimento de bactérias mesófilas é favorecido.

De acordo com GAUTHIER et al. (1993), o risco de poluição em águas marinhas por *Escherichia coli* e por enterobactérias patogênicas para o homem, é muito mais acentuado em águas quentes e ricas em matéria orgânica. Vale salientar que o crescimento de coliformes termotolerantes pode ocorrer em temperaturas de até 44,5°C (MENDONÇA-HAGLER et al., 2001).

De acordo com WEST (1989), os vibrios podem aparecer em grandes concentrações quando as temperaturas das águas aumentam e, em regiões temperadas, eles estão presentes na água do mar durante todo o ano, porém, sua concentração é exacerbada nos meses quentes, aumentando sua acumulação nos moluscos filtradores e em outros animais marinhos. LIMA (1997) também afirma que os vibrios dependem diretamente da temperatura do meio para seu desenvolvimento.

A salinidade se manteve em níveis elevados durante as dez primeiras amostragens, regredindo bruscamente nas últimas coletas em decorrência do período chuvoso, variando de 6 a 45‰ durante o período amostrado. De acordo com a Resolução N° 274 (CONAMA, 2000), para estes valores de salinidade as águas são classificadas em salobras (0,5 a 30‰) e salinas (>30‰).

Os três pontos onde foram detectados maiores quantidades de *Vibrio na* água, inclusive com valores indefinidos para NMP de > 1.600.000 / 100mL coincidiu com as mais altas medidas de salinidade (até a 10ª amostra), confirmando que *Vibrio* depende de NaCl para se reproduzir (WONG et al., 1992). De acordo com MURRAY et al. (2004), as espécies de *Vibrio* crescem naturalmente em estuários e ambientes marinhos no mundo inteiro, sendo todas as espécies capazes de sobreviver e se multiplicar em águas contaminadas com elevada salinidade e temperatura variando de 10 a 30°C.

Segundo ROZEN e BELKIN (2001), o pH da água do mar se situa normalmente entre 7,5 e 8,5 e sofre influência da temperatura, pressão e atividades fotossintética e respiratória dos microrganismos. Estes autores afirmam que um pH em torno de 8,0 contribui para um efeito deletério na sobrevivência de *E. coli*, enquanto que um pH mais ácido, de aproximadamente 5,0, favorece o desenvolvimento da bactéria. As águas examinadas variaram o pH de 6,9 a 8,23 (Tabela 2) sendo que as águas consideradas salinas, até a 10ª amostra, estiveram dentro do intervalo de normalidade no pH. O mesmo não se pode dizer da medida de Oxigênio Dissolvido (OD), pois cinco medidas de OD, das amostras consideradas salinas, estavam abaixo do preconizado pela Resolução 357 (CONAMA, 2005) (Tabela 2). Segundo esta Resolução, águas salinas onde haja pesca ou cultivos de organismos para fins de consumo intensivo devem apresentar uma medida de OD nunca inferior a 5,0 mg/L. Águas salobras devem, segundo a mesma Resolução, apresentar medidas de OD não inferior a 4mg/L. Somente a medida da 11ª amostragem não estava dentro desses limites. Assim, um total de seis medidas (43%) de OD estaria fora do limite recomendado pela Resolução supracitada. É importante considerar, entretanto, o horário das medições uma vez que nas primeiras horas do dia os níveis de OD são geralmente reduzidos (Tabela 2).

Águas que abrigam moluscos quitinosos possibilitam o desenvolvimento de vibriões patogênicos, sendo o consumo destes moluscos freqüentemente associado às infecções causadas por *Vibrio* (WEST, 1989).

Nos Estados Unidos, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) de Atlanta estimou que, entre 8.028 infecções causadas por *Vibrio* registradas, foram observadas 57 mortes (MEAD et al., 1999).

Tendo em vista o potencial patogênico apresentado pelos víbrios à saúde humana, é de extrema importância a elaboração de uma legislação clara e específica que regulamente os níveis destas bactérias em moluscos e em águas destinadas ao cultivo de organismos aquáticos. Muito embora exista legislação para CF em águas de cultivo de bivalves (Resolução 357, CONAMA, 2005), não existe nenhum limite desses microrganismos na RDC 12 (ANVISA, 2001) que regulamente os níveis de CF em moluscos *in natura* que serão consumidos crus, fato já comentado anteriormente.

4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- Embora as ostras tenham apresentado uma maior concentração de coliformes fecais em relação às amostras de água, estas se mantiveram dentro dos limites máximos permitidos em 92,86% das amostras analisadas, de acordo com *The European Union Shellfish Quality Assurance Programme* – EUSQAP.
- Pelo fato dos moluscos bivalves, especificamente as ostras, serem freqüentemente consumidos na sua forma *in natura*, seria de grande importância a implementação de uma legislação adequada que regulamentasse a concentração das bactérias avaliadas neste estudo.
- As amostras de água mantiveram-se dentro dos limites para CF determinados pela Resolução 357/2005 (CONAMA, 2005) para águas de cultivos de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, indicando uma boa qualidade da água no local de estudo (Estuário do Rio Jaguaribe, Fortim - CE).
- Os níveis de coliformes totais e fecais e de *Vibrio* observados nas amostras de ostra e água podem estar relacionados à poluição orgânica em decorrência de despejos de efluentes contaminados e do processo de lixiviação ocasionado pelas chuvas.
- Recomenda-se o desenvolvimento de campanhas e políticas de saneamento básico às prefeituras das cidades onde exista a prática das atividades de cultivo (caso do Jaguaribe) e extração de moluscos bivalves.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução – RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 18 de julho de 2006.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução Nº 274, de 29 de novembro de 2000. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_274_00.pdf>. Acesso em: 20 de julho de 2006.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.crq4.org.br/downloads/resolucao357.pdf>>. Acesso em: 20 de julho de 2006.

CAVALLO, R.A.; STABILI, L. Culturable vibrios biodiversity in the Northern Ionian Sea (Italian coasts). **Scientia Marina**, Barcelona, v.68, p.23-29, 2004.

CONSTANTINIDO, G. A saúde do pescado depende diretamente da saúde do ambiente. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.8, n.32, p.5-6, julho de 1994.

COOK, D.W.; BURKHARDT III, W.; DEPAOLA, A.; MCCARTHY, S.A.; CALCI, K.R. Molluscan shellfish: oyster, mussels and clams. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: APHA, p.507-514, 2001.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A. Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 4 – Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Revised: 2002 - September. In: Food and Drug Administration – FDA / Center for Food Safety and Applied Nutrition - CFSAN. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>>. Acesso em: 19 de maio de 2006.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 182 p., 1996.

GARTHRIGHT, W.E. Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998. Appendix 2: most probable number from serial dilutions. In: Food and Drug Administration – FDA / Center for Food Safety and Applied Nutrition - CFSAN. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>>. Acesso: 05 de maio de 2006.

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

GERMANO, P.M.L.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O.; GERMANO, M.I.S. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, n.27, p.6-11, agosto 1993.

GOMEZ-GIL, B.; TRON-MAYÉN, L.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F.; INGLIS, V.; GUERRA-FLORES, A.L. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, Asheville, v.163, n.1, p.1-9, April 1998.

GREENBERG, A.E.; CLESCERI, L.S.; EATON, A.D. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Edition. American Public Health Association, Washington. p.9-49/9-50, 1992.

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

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA JR., A. Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 9 – *Vibrio*. Substantially rewritten and revised May 2004. In: Food and Drug Administration – FDA / Center for Food Safety and Applied Nutrition - CFSAN. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>>. Acesso em: 19 de maio de 2006.

LBNSN. **List of bacterial names with standing in nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/>>. Acesso em: 04 de agosto de 2006.

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

LIMA, F.C. Víbrios marinhos. II. Víbrios não coléricos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n.49, p.8-13, maio/junho 1997.

MACHADO, I.C.; PAULA, A.M.R.; BUZZO, A.; JAKABI, M.; RISTORI, C.; SAKUMA, H. Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário de Cananéia, como subsídio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliana*). 2. Análise da ostra (tecidos moles e líquido intervalvar). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.83, p.44-48, abril 2001.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V. McCAIG L.F.; BRESEE J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, n.5, p.607-25, September-October 1999.

MENDES, E.S. Avaliação microbiológica de ostras consumidas na Grande Recife – PE. 2001. 102 f. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botuscatu, 2001. Disponível em: <<http://www.biblioteca.unesp.br/bibliotecadigital/document/?did=443&print=y>>. Acesso em: 21 de julho de 2006.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria Nº 451, de 19 de setembro de 1997. Disponível em: <http://www.pqsys.com.br/links/p_451_1.htm>. Acesso em: 20 de julho de 2006.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 4. ed., Rio de Janeiro. Editora Guanabara, 2004.

NASCIMENTO, A.R.; MOUCHREK FILHO, J.E.; CAVALCANTE, P.R.S.; VIEIRA, R.H.S.F. Colimetria das águas do Rio Bacanga (São Luís, Maranhão) de peixes e sururus capturados em suas águas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.84, p.59-66, maio 2001.

NUNES, A.J.P.; PARSONS G.J. Dynamics of tropical coastal aquaculture systems and the consequences to waste production. **World Aquaculture**, Baton Rouge, Louisiana-USA, v.29, n.2, p. 27-37, June 1998.

RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. 2 ed. Rio Grande: Editora da FURG, 492 p., 1994.

RODGERS, C.J. The NSW Shellfish Quality Assurance Program: an operational review. **Final Report**, 123 p., Jan. 2001.

ROSINVALLI, L.J.; CHARM, S.E. Spoilage and shelf life prediction of refrigerated fish. **Marine Fisheries Review**, Washington, v.37, n.4, p.32-34, 1975.

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

SCHRECKENBERGER, P.C.; GRAEVENITZ, A. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium* and other non fermentative Gram negative rod. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington, DC: ASM. P.539-560, 1999.

SHEWAN, J.M. The microbiology of sea-water fish. In: BORGSTRON, G. (ed.). **Fish as Food: production, biochemistry and microbiology**. New York: Academic Press, v.1, p.487-560, 1962.

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

THOMPSON, F.L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.68, n.3, p.403-431, Sep. 2004.

VIEIRA, R.H.S.F. Microbiota natural do pescado. In: VIEIRA, R.H.S.F. (Ed) **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado**. São Paulo: Ed. VARELA, 2004. p. 46.

VIEIRA, R.H.S.F.; CASTRO, H.M.P.; REIS, E.M.F.; REIS, C.M.F.; MADRID, R.M.; HOFER, E. Aspectos Microbiológicos de Águas Estuarinas no Nordeste Brasileiro (Rio Grande do Norte e Ceará) (aceito para publicação nos **Arquivos de Ciências do Mar**).

WEST, P.A. The human pathogenic vibrios. A public health update with environment perspectives. **Epidemiology and Infection**, v.103, n.1, p.1-34, August 1989.

WEST, P.A.; WOOD, P.C.; JACOB, M. Control of food poisoning risks associated with shellfish. **Journal of The Royal Society for the Promotion of Health**, v.105, p.15-21, 1985.

WONG, H-C.; TING, S.H.; SHIEH, W.R. Incidence of toxigenic Vibrios in foods available in Taiwan. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.73, n.3, p.197-202, Sep. 1992.

WOOD, P.C. **Manual de higiene de los mariscos**. Zaragoza, España. Editorial Acribia. 83 p., 1979.

ZAMARIOLI, L.A.; PEREIRA, O.M.; FAUSTINO, J.S.; HENRIQUES, M.B.; VASQUES, R.O.; ANDRADE, T.C.; SANTOS, M.A. Estudo microbiológico do tecido mole de bivalves *Crassostrea brasiliiana*, *Perna perna* e *Mytella falcata* recém-coletados nos bancos naturais do litoral da baixada santista. São Paulo. Secretaria da Saúde do Estado. **Relatório Apresentado ao Grupo de Vigilância Sanitária DIR XIX**. São Paulo, 1997.