

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**ESTUDO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E DAS
OSTRAS *Crassostrea sp.* NAS ÁREAS AQUÍCOLAS DO
MUNICÍPIO DE CANANÉIA, SP.**

Sonia Assami Doi

Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Setembro - 2012

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**ESTUDO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E DAS
OSTRAS *Crassostrea sp.* NAS ÁREAS AQUÍCOLAS DO
MUNICÍPIO DE CANANÉIA, SP.**

Sonia Assami Doi

Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Setembro - 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

D657e

Doi, Sonia Assami

Estudo da qualidade microbiológica da água e das ostras *Crassostrea sp*
nas áreas aquícolas do município de Cananéia, SP / Sonia Assami Doi.
-- São Paulo, 2012.

vii, 67f. ; il. ; graf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e
Abastecimento.

Orientador: Edison Barbieri.

1. Coliforme total e termotolerante. 2. Pluviosidade. 3. Salinidade.
4. Maré. 5. *Crassostrea sp*. I. Barbieri, Edison. II. Título.

CDD 639.8

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**“ESTUDO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E DAS OSTRAS
Crassostrea sp. NAS ÁREAS AQUÍCOLAS DO MUNICÍPIO DE
CANANÉIA, SP.”**

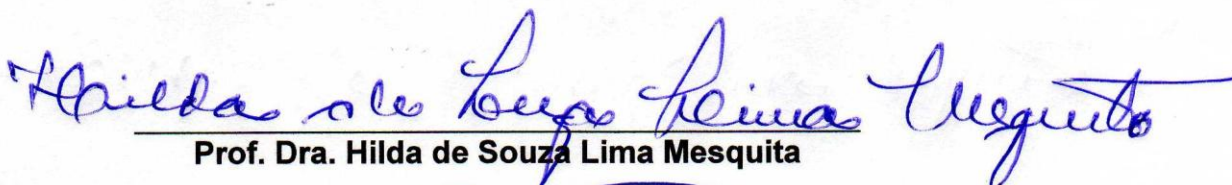
AUTOR: Sonia Assami Doi

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edison Barbieri

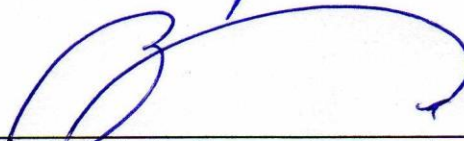
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Edison Barbieri




Prof. Dra. Hilda de Souza Lima Mesquita



Prof. Dra. Ana Julia Fernandes Cardoso

Data da realização: 24 de Setembro de 2012



Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. Edison Barbieri

Agradecimentos

O meu agradecimento a todas as pessoas que participaram e contribuíram na elaboração deste trabalho, compartilhando conhecimentos, experiências e pela companhia.

Ao pesquisador Dr. Edison Barbieri pela orientação, oportunidades, estímulo e ensinamentos transmitidos ao longo deste trabalho. Agradeço a paciência e confiança que permitiram um crescimento profissional e pessoal nestes anos de convívio.

Ao professor Dr. Helcio L. de A. Marques pelo apoio e participação nas coletas dos dados.

Ao Instituto de Pesca pela oportunidade concedida para o aprimoramento da minha formação acadêmica. Tanto nos momentos difíceis como nos bons, estavam sempre presentes, prontos para auxiliar. Agradeço pelo exemplo profissional, mas também pela amizade e carinho de cada um, principalmente pela paciência e ajuda do Sr Ocimar.

Ao Laboratório Regional (CONSAÚDE), pela execução das análises microbiológicas e pelo treinamento oferecido. Agradecimento ao biólogo Ernani Woiciechowski pelas sugestões e experiência compartilhada.

Aos professores e funcionários do Programa de pós-graduação do Instituto de Pesca pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade, pelas informações prestadas, permitindo a realização desta pesquisa. Foi parte fundamental na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Andre Vaz e professora Dra. Ana Julia pela paciência e ensinamentos nos estágios realizados.

À minha família e minhas amigas Li, Lu, Mila que me incentivou, apoiou e me confortou esses dois anos. E aos amigos que mesmo distantes, se fizeram presentes em todos os momentos.

Aos meus amigos do Programa de pós-graduação do Instituto de Pesca pelo carinho e companheirismo em todas as horas. Nossos encontros e saídas foram inesquecíveis, sendo possível superar os desafios e dificuldades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e para CNPq pela bolsa de produtividade do dr. Edison Barbieri.

Sumário

Agradecimentos	i
Sumário	ii
Índice de Tabelas e Figuras	iv
Resumo geral	vi
General Abstract	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Objetivos gerais	7
Área de estudo	8
Apresentação da Dissertação	10
Referências Bibliográficas.....	11
CAPÍTULO 1: Densidade colimétrica das áreas de extrativismo de ostras em relação aos fatores ambientais em Cananéia	15
Resumo	16
Abstract	17
Introdução	18
Materiais e Métodos	20
Resultados e Discussão	22
Conclusões	28
Agradecimentos	28
Referências	29
CAPÍTULO 2: Determinação colimétrica na água e no tecido mole das ostras extraídas em Cananéia, SP.....	32
Resumo	33
Abstract	34
Introdução	35
Materiais e Métodos	36
Resultados e Discussão	39
Conclusões	47
Agradecimentos	47
Referências	47

CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
Referências Bibliográficas.....	52
APÊNDICE	53
ANEXO 1 – ANVISA	54
ANEXO 2 – PNCMB	61
ANEXO 3 – CONAMA 357/2005	64

Índice de Tabelas e Figuras

Tabela 1. Média geométrica (desvio padrão geométrico) dos coliformes totais e termotolerantes em relação à sazonalidade em NMP 100mL ⁻¹ . Média das variações ambientais: salinidade, temperatura (°C), pluviosidade (mm/dia) e pH e seus respectivos desvios padrões entre parênteses.	23
Tabela 2: Teste não paramétrico de Friedman comparando as densidades de coliformes totais e termotolerantes entre os estofos de preamar e baixa-mar, e os estofos de sizígia e quadratura (graus de liberdade 3, $\alpha < 0,05$). Em negrito os valores que apresentaram diferença significativa. ...	27
Tabela 3: Média geométrica em NMP 100mL ⁻¹ dos coliformes totais (Ct) e termotolerantes (CT) das localidades analisadas, seu desvio padrão geométrica (DP) e percentagem abaixo de 88 NMP 100mL ⁻¹ . * Estão acima dos limites permitidos pela legislação CONAMA 357/2005. ** Percentual dentro do limite da legislação vigente.	40
Figura 1: (a) Localização da área de estudo no Estado de São Paulo, município de Cananéia. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Cananeia , acesso em julho de 2012. (b) Mapa do Complexo Estuarino Cananéia-Iguape.	9
Figura 2: Localizações dos pontos de coleta da água para análise colimétrica e mensuração dos dados ambientais “in situ” (6 pontos de coleta).	20
Figura 3: Correlação entre as médias pluviométricas e os valores de coliformes totais (n=24). O resultado apresentou uma correlação positiva muito forte, indicando que a densidade de coliformes na água foi alta com o alto índice de pluviosidade.	25
Figura 4: Correlação entre as médias pluviométricas e os valores de coliformes termotolerantes (n=24). O resultado apresentou uma correlação positiva muito forte, indicando que a densidade de coliformes na água foi alta com o alto índice de pluviosidade.	25
Figura 5: Médias das densidades de coliformes totais e termotolerantes na água em relação ao estofos das marés de sizígia e quadratura. As barras representam os respectivos desvios padrões.	26
Figura 6: Localidades onde foram coletadas as águas para análise microbiológica em Cananéia, SP (10 pontos de coleta).	37
Figura 7: Médias dos coliformes totais e termotolerantes (NMP 100mL ⁻¹) em suas respectivas localidades. As barras apresentam os seus respectivos desvios padrões.	41

Figura 8: Médias dos coliformes totais e termotolerantes nos tecidos das ostras (NMP g ⁻¹) analisados mensalmente. As barras apresentam os seus respectivos desvios padrões.	43
Figura 9: Valores médios dos coliformes totais e termotolerantes no tecido da ostra (NMP g ⁻¹) por estação do ano. As barras apresentam os seus respectivos desvios padrões.	44
Figura 10: Regressão linear entre os NMP de coliforme totais na água e no tecido da ostra (n=24).	45
Figura 11: Regressão linear entre os NMP de coliforme termotolerantes na água e no tecido da ostra (n=24).	46

Resumo geral

O estuário de Cananéia apresenta condições propícias para o cultivo de ostra nativa *Crassostrea sp.*, entretanto por estar sujeito a diversos tipos de contaminação por agentes patogênicos, faz-se necessário analisar estes microrganismos tanto na água como no tecido da ostra. Análise de coliformes é um importante parâmetro da contaminação microbiológica de origem fecal e sua densidade pode variar conforme diferenças sazonais e ambientais. Assim, este estudo objetivou avaliar a qualidade microbiológica dos tecidos moles dos bivalves e da água de várias localidades onde se produzem ostras *Crassostrea sp.*. Durante os anos de 2005 a 2011, mensuraram-se os fatores ambientais e as densidades de coliformes na água e das ostras. As amostras coletadas foram submetidas à análise no laboratório através da Técnica dos Tubos Múltiplos para determinar contaminação por material fecal. Os resultados da água foram comparados com a Resolução 357/2005 e apresentou média dentro do limite permitido, entretanto a percentagem dos dados coletados foi menor que 80%, não atendendo o critério descrito. Os tecidos das ostras foram comparados com legislações nacionais e internacionais, como o PNCMB e FAO. Verificou-se que a densidade de coliformes foi relativamente baixa em relação aos padrões estipulados nas legislações vigentes, mas para ser liberado é necessário passar pelo processo de depuração. As flutuações das densidades dos coliformes podem ter sido influenciadas pelas variações ambientais, pois estatisticamente houve correlação positiva com a pluviosidade e negativa com a salinidade. Análise dos estofos da maré apresentou variações nas densidades colimétricas, no qual a preamar de sizígia foi significativamente diferente dos outros estofos, mas o mesmo não foi observado no tecido das ostras em relação à sazonalidade. Verificou-se correlação positiva entre coliformes analisados na água e no tecido da ostra, confirmando a influência da qualidade microbiológica fecal do ambiente nos moluscos bivalves, enfatizando a importância de um programa de monitoramento contínuo da qualidade bacteriológica da região onde são produzidos e dos organismos ali presentes.

Palavra-chave: Coliforme total e termotolerante, pluviosidade, salinidade, maré, *Crassostrea sp.*

General Abstract

The Cananeia's estuary shows favorable conditions for the cultivation of native oyster *Crassostrea sp.*, in the mean time by being subjected to various types of contamination by pathogens, it was needed to analyze these contaminants in water and oyster tissue. The colimetric analyse is an important parameter of microbiological fecal contamination and its density may alters with seasonal and environmental variation. This study aimed to evaluate the microbiological quality of soft tissues of bivalves and the water from various locations where the oysters *Crassostrea sp.* are produced. During 2005 to 2011, it was measured environmental variables and densities of coliforms in the water and the oyster. The samples collected were submitted to a laboratory analysis through the Multiple Tube Technique to determine contamination by coliforms. The results of the water were compared with the Resolution 357/2005 and presented mean within the allowable limit, however the percentage of the collected data was less than 80%, not meeting the criteria outlined in the legislation. The tissue of the oyster was compared with national and international laws, such as PNCMB and FAO. It was found that density was relatively low in relation to the standards stipulated in the current legislation, but it is necessary to go through the process of depuration before release. The fluctuations of the densities of coliforms might have been influenced by environmental variations, because statistically it has obtained positive correlation with rainfall and negative with salinity. Analysis of the upholstery of the tidal showed variations in colimetric densities, in which the syzygy of high tide was significantly different from the other upholstery. The health of oysters analyzed reflected the quality of water, emphasizing the importance of a program of continuous monitoring of the bacteriological quality of the region where they are produced and the organisms present there.

Keyword: total and thermotolerant coliform, rainfall, salinity, tide, *Crassostrea sp.*

INTRODUÇÃO GERAL

Segundo dados da FAO (2012), a produção aquícola atingiu outro recorde histórico em 2010, em 60 milhões de toneladas (excluindo plantas aquáticas e produtos não alimentares). Um terço dos peixes do mundo produzidos em viveiros, colhidas em 2010, foram conseguidos sem a utilização de alimentos artificiais. A composição mundial da aquicultura foi 56,4 % de peixes de água doce (33,7 milhões de ton), 23,6 % de moluscos (14,2 milhões de ton), 9,6 % de crustáceos (5,7 milhões de ton) entre outros. Empregos relacionados com a pesca e aquicultura têm continuado a crescer mais rapidamente do que na agricultura, de modo que até 2010 representava 4,2% dos 1,3 bilhões de pessoas economicamente ativas em comparação aos 2,7% em 1990 (FAO 2012).

Nas Américas, a produção total da aquicultura de água doce diminuiu de 54,8% em 1990 para 37,9% em 2010. Mas a América do Sul tem se mostrado forte e com crescimento contínuo, principalmente Brasil e Peru. Em relação ao volume, a aquicultura na América do Norte e Sul são dominados por peixes de barbatanas (57,9%), crustáceos (21,7%) e moluscos (20,4%) (FAO, 2012). O Brasil possui mais de 2,5 milhões de hectares de áreas estuarinas, apresentando excepcionais condições para a expansão da maricultura (ROUBACH, *et al.*, 2003).

Avanços significativos vêm sendo observados em relação à maricultura no Brasil, principalmente com o cultivo de moluscos no sul do país e de camarões na região Nordeste, sendo que cerca de 10% da produção nacional anual provem da região Sudeste do país (CAVALLI e FERREIRA, 2010).

Os estuários são ambientes de transição entre o continente e o oceano, sujeitos a impactos ambientais mais freqüentes do que no oceano aberto, por estarem sujeitos às contaminações dos dejetos trazidos pelos rios, principalmente os que não possuem o tratamento adequado (KRESS e HERUT, 1998). São influenciados pelas forças ambientais (movimentos das marés, descargas fluviais e dos ventos) como também pelas ações antrópicas (lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados) que afetam diretamente a qualidade da água e a distribuição dos organismos aquáticos (KOLM e ANDRETTA, 2003; CETESB, 2004). O índice pluviométrico é um dos

fatores que pode interferir nas características microbiológicas da água da localidade, visto que as chuvas arrastam o lixo depositado ao longo das margens dos rios em direção ao mar, deteriorando a qualidade das águas (CETESB, 2004).

As regiões estuarinas são biologicamente importantes, pois são habitats de uma grande diversidade de organismos aquáticos, considerado como área de criação, de refúgio permanente ou temporário de inúmeras espécies de peixes, crustáceos e moluscos (ODUM, 1983).

A ostra é um molusco bivalve com grande valor econômico e muito apreciado por turistas no litoral e em restaurantes de todo o mundo. Por ser um organismo filtrador, possui a capacidade de reter substâncias e patógenos potencialmente nocivos à saúde do consumidor. O consumo destes organismos crus ou levemente cozidos aumenta ainda mais o risco de intoxicação por doenças transmitidas por alimentos (KNAP *et al.*, 2002; LEAL *et al.*, 2008). Quando estes bivalves são coletados ou cultivados em regiões que recebem efluentes, podem acumular contaminantes em seu interior quantidade muito superior à água em que se encontram (CORREA *et al.*, 2007).

Para que um microrganismo seja considerado um indicador de poluição fecal no ambiente, esse deve ser facilmente enumerado por técnicas precisas e apresentar densidade diretamente correlacionada com o grau de contaminação fecal (APHA, 2005). Deve apresentar uma maior resistência à desinfecção do que os patógenos, estar exclusivamente associados ao esgoto e presente em águas contaminadas por material fecal em densidades mais elevadas que os patógenos. Bons indicadores são incapazes de se reproduzir em ambientes aquáticos, ser aplicável a todos os tipos de águas recreacionais. Outra característica a ser observada é se esses patógenos estão ausentes em águas não poluídas e associadas exclusivamente a despejos de fezes de animais e humanas (APHA, 2005).

A estimativa do número de bactérias nos produtos alimentares é usada freqüentemente na avaliação da qualidade microbiológica ou para avaliar a “segurança” presumível dos alimentos. Este procedimento solicita que as amostras sejam recolhidas, realizados testes microbiológicos e os resultados comparados com critérios estabelecidos no país (FAO, 2010).

Em termos de Saúde Pública, os aspectos sanitários devem ser enfocados, estudando-se o comportamento dos indicadores de poluição de origem fecal, sendo mais comumente utilizados os coliformes totais e os termotolerantes (ALMEIDA *et al.*, 2004; APHA, 2005).

O "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" define o grupo coliforme como todas as bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, gram-negativas, não esporuladas, em formato de bastonete, as quais fermentam a lactose com formação de gás dentro de 48 h a 35°C. Neste grupo incluem-se organismos que diferem nas características bioquímicas, sorológicas e no seu habitat. Podem ser classificadas em: *Escherichia*, *Aerobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e outros gêneros que quase nunca aparecem em fezes como a *Serratia*. A bactéria *Escherichia coli* é a única espécie do grupo dos coliformes termotolerantes cujo habitat exclusivo são os intestinos dos animais de sangue quente (CONAMA 357/2005).

Aspectos gerais da sobrevivência de bactérias fecais em ambientes aquáticos foram discutidas por HUGHES (2003) e CRAIG *et al.* (2004). Estes autores relataram que os microrganismos, uma vez liberados na água, tem sua sobrevivência determinada por combinações de fatores físicos e biológicos, como a ação da radiação ultravioleta, predação, falta de nutrientes, temperatura, salinidade e níveis de oxigênio. Segundo CETESB (2004), a presença de coliformes na água sofre influencia das condições da maré, ocorrência de chuvas e afluência turística durante os períodos de temporada.

De acordo com Gauthier apud VIEIRA (2008), o risco da poluição de águas marinhas por material fecal e por extensão, pelos microrganismos patogênicos ao ser humano, é muito mais acentuado em águas quentes e ricas em matéria orgânica. Em trabalhos como KOLM e ANDRETTA (2003), BARBIERI e MACHADO (2006), MOREIRA *et al.* (2011) foram analisadas correlações de fatores físicos, químicos e biológicos com as densidades das bactérias no ambiente aquático, verificando as suas interações. ROZEN e BELKIN (2001) e BORDALO *et al.* (2002) estudaram os efeitos da salinidade na sobrevivência de bactérias coliformes, verificando que a diminuição de salinidade na água é acompanhada por um aumento na sobrevivência destas bactérias.

BARBIERI e MACHADO (2006) realizaram estudos para avaliar a qualidade da água como subsídio para extração, manejo e cultivo de ostras, no Mar de Cubatão (local próximo dos locais de despejos de esgoto) e observaram níveis significativos de contaminação nesta área. Fatores ambientais como clima, pluviosidade, temperatura sofrem alteração temporal e espacial influenciando nas características dos canais de drenagem e escoamento, os quais têm um papel maior sobre a dispersão, diluição ou autodepuração dos corpos de água, variando desta maneira na densidade de coliformes (CUNHA *et al.*, 2004).

As variações de densidade de *E. coli* observadas nas ostras de cultivo indicam o nível de contaminação da água dos locais onde foram coletados e esta flutuação pode ser influenciada por várias forçantes ambientais como marés e pluviosidade (KOLM e ANDRETA, 2003; MILL *et al.*, 2006). Segundo KOLM e ANDRETA (2003), VIEIRA *et al.* (2008) e MIQUELANTE e KOLM (2011), altos índices de pluviosidade contribuem para o aumento da contagem bacteriana de águas de cultivo, pois esta forçante tem capacidade de arrastar esgotos e resíduos para o curso d'água.

Em estudos realizados em Recife (PE), MENDES *et al.* (2002) relataram que a densidade de contaminação microbiológica da água de cultivo é dependente de alterações sazonais, em que o Número Mais Provável (NMP) de coliformes foi menor nos meses de verão.

As variáveis ambientais podem influenciar na presença dos microrganismos nos ecossistemas aquáticos, dentre as quais as marés e a pluviosidade. Além destas forçantes os fatores físico-químicos podem afetar na sobrevivência destes organismos, como por exemplo, a temperatura, pH, oxigênio dissolvido (REGAN *et al.*, 1993; CETESB, 2004). Para averiguar a qualidade da água e dos organismos aquáticos, comparam-se os valores mensurados com os critérios das resoluções vigentes, com o objetivo de garantir a qualidade dos moluscos em relação à contaminação microbiológica fecal, através do monitoramento da água e da conseqüente classificação das áreas de produção e de extração.

A Resolução CONAMA 357 de 2005 estabelece critérios para águas classificando-os conforme o seu destino. A água do estuário de Cananéia classifica-se como salobra por apresentar salinidade entre 0,5 a 30 e enquadra-

se na Classe 1, pois destina-se à aquicultura e à atividade de pesca. As condições de qualidade de água estabelecem que as densidades de coliformes termotolerantes (CT) em locais de cultivo de moluscos destinados à alimentação humana, no qual o valor não exceda 43 NMP 100mL⁻¹ em no mínimo de 15 amostras.

Segundo os critérios descritos no Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB, 2011), os requisitos mínimos necessários para garantir a inocuidade e qualidade dos moluscos bivalves produzidos no Brasil destinados ao consumo humano, foi definido por meio da estimativa da densidade média de coliformes termotolerantes em 100 gramas da parte comestível dos organismos (NMP 100g⁻¹). O critério utilizado para retirada do molusco bivalve considera os seguintes valores de coliformes termotolerantes: liberada para consumo <300 NMP 100g⁻¹, liberada sob condição (submeter ao processo de depuração) ≥300 e ≤6.000 NMP 100g⁻¹ e suspensão quando verificada >6.000 NMP 100g⁻¹. Este processo tem a finalidade de redução dos contaminantes microbianas aos níveis aceitáveis de consumo.

A Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2001), aborda o pescado e os produtos derivados da pesca, bem como os limites bacteriológicos permitidos para sua comercialização. A presente legislação estabelece valores limites específicos para moluscos bivalves "in natura", resfriados ou congelados, não consumidos crus, para estafilococos coagulante positiva e *Salmonella sp.*, mas não especifica o limite para densidade de coliformes.

Existem padrões internacionais que determinam limites de contaminações microbiológicas pelos valores de coliformes termotolerantes em tecidos moles das ostras cruas. CODEX (2008) é um sistema americano que analisa a qualidade da água e dos moluscos. Determina que nos bivalves crus destinados ao consumo humano apresentem menos de 230 NMP g⁻¹ de *Escherichia coli* (*E. coli*). Food and Agriculture Organization (FAO, 2010) determina que os moluscos bivalves vivos destinados ao consumo humano imediato devem ter menos de 300 NMP de coliformes termotolerantes ou menos de 230 *E. coli* por 100g de tecido e líquido intravalvar baseado em teste de procedimento bacteriológico.

The European Union Shellfish Quality Assurance Programme - EUSQAP determina quando a produção de moluscos pode ser dirigida diretamente para os mercados consumidores ou, contrariamente, quando deve passar por um processo de depuração ou descanso antes da comercialização. Prioriza ainda a pesquisa da presença de coliformes fecais e de *E. coli* diretamente na carne e no líquido intervalvar dos moluscos, no qual 90% das amostras não podem exceder 6.000 NMP 100g⁻¹ de coliformes termotolerantes (RODGERS, 2001).

Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF (1986) tem por objetivo prover informações científicas básicas para governos e indústrias em temas relacionados à segurança microbiológica de alimentos. Tem um padrão mais rigoroso, no qual limita 16 NMP g⁻¹ de coliformes termotolerantes em bivalves frescos e congelados.

Apesar de este trabalho analisar somente a densidade dos coliformes, sabendo que os bivalves acumulam microrganismos em seu interior, outros parâmetros legais devem ser considerados para análise da água, pois além do uso da água para recreação, o consumo destes organismos aquáticos contendo material de origem fecal pode provocar doenças de veiculação hídrica. A principal doença relacionada à ingestão de água ou alimento contaminado é a gastroenterite, geralmente causado pela infecção por bactérias como o *Vibrio cholerae*, *Shigella sp.*, *Salmonella typhi* e *Escherichia coli* (FAO, 2010; WHO, 2011).

Outro grupo utilizado como indicador de contaminação fecal são os enterococos (CETESB, 2012). Possuem características mais resistentes ao ambiente marinho tornam-se mais adequadas para o monitoramento da qualidade das águas marinhas. Geralmente não crescem no ambiente, têm demonstrado maior tempo de sobrevivência na água, e apresentam melhor correlação com doenças gastrointestinais do que os termotolerantes (KINZELMAN *et al.*, 2003; HAACK *et al.*, 2003). Altas densidades de coliformes, *E. coli* ou enterococos em águas marinhas indicam um elevado nível de contaminação por esgotos, o que poderá colocar em risco a saúde dos banhistas (CETESB, 2012).

Trabalhos como de Galvão *et al.* (2006) e Pereira *et al.* (2006) detectaram a presença de enterococos tanto na água e como nos bivalves. Martinez e Oliveira (2010) descrevem a importância da análise dos enterococos

como parâmetro de indicador fecal, pois foram detectados em densidades mais elevadas deste organismo do que os termotolerantes, tanto na água como nos moluscos. Quando a análise deste organismo combinada com os coliformes, o resultado apresenta maior confiabilidade em relação à contaminação fecal (Martinez e Oliveira, 2010).

Devido à grande importância da qualidade microbiológica da água onde são extraídos os bivalves e as ostras em Cananéia, SP, elaboraram-se dois artigos, no qual o primeiro intitula-se “Densidade colimétrica das áreas de extrativismo de ostras em relação aos fatores ambientais em Cananéia” e o segundo “Determinação de coliformes na água e no tecido mole das ostras extraídas em Cananéia, SP”.

Objetivos Gerais

Avaliar a contaminação por material de origem fecal dos tecidos das ostras e da água onde estes organismos são extraídos. Realizaram-se análises microbiológicas nas águas do estuário de Cananéia, durante os anos de 2005 a 2011, verificando a densidade de coliformes em vários pontos onde se extraem e produzem este bivalve.

Analisar e comparar os níveis de contaminação colimétrica através do estudo da sua sazonalidade, variação ambiental e da comparação dos resultados obtidos com os limites estabelecidos na resolução vigente.

Realizar estudos microbiológicos de organismos bivalves provenientes das áreas em estudo, visando estabelecer correlações entre a densidade destes microrganismos no ambiente e a sua presença nos tecidos das ostras, com vistas a comparar aos limites estabelecidos pelas legislações nacionais e internacionais.

Área de estudo

O município de Cananéia possui uma área de 1.340 Km², associada a uma pequena bacia hidrográfica, fornecendo um aporte limitado de água doce, sedimentos e nutrientes (BARCELLOS *et al.*, 2005). É uma das mais importantes áreas úmidas da costa brasileira em termos de biodiversidade e produtividade natural, reconhecido nacional e internacionalmente como terceiro ecossistema mais produtivo do Atlântico Sul, devido às suas características ambientais estarem muito bem preservadas (UNESCO, 2005).

A interligação do sistema Cananéia-Iguape com o oceano é realizada através de três desembocaduras: Icapara (ao norte), Cananéia (porção central) e Ararapira (ao sul) (BARCELLOS *et al.*, 2005). A ilha de Cananéia é separada do oceano por uma ilha de barreira a leste denominada Ilha Comprida, ao sul pela Ilha do Cardoso, ao norte pela Ilha de Iguape e ao norte e oeste pelo continente. A Ilha Comprida separa-se do continente pelo Mar Pequeno que rumo ao sul, divide-se formando dois mares, o de Cananéia e o de Cubatão (figura 1). Estes dois mares intercomunicam-se na baía de Trapandé, ao sul da Ilha de Cananéia (BARCELLOS *et al.*, 2005). Mar de Cananéia caracteriza-se por sofrer uma maior influência da baía devido a proximidade com a barra de Cananéia. O mar de Cubatão localiza-se na porção mais abrigada do estuário, junto ao continente e a Baía de Trapandé é a região que sofre a maior influência marinha, apresentando elevados valores de salinidade (AZEVEDO e BRAGA, 2011).

O sistema possui ao longo de seus canais principais, um padrão hidrodinâmico influenciado pelas correntes de maré, assim como pela descarga de água doce que flui para o sistema (TESSER e SOUZA, 1998). Apresenta temperatura média anual de 23,8° C e precipitação média anual de 2300mm (SILVA, 1989).

No estuário de Cananéia há um dos maiores bancos naturais do Brasil da ostra de mangue *Crassostrea brasiliiana* (sin. *C. rhizophorae*), situados nos manguezais que circundam a zona entremarés e também os bancos de fundo, na zona infralitoral (PEREIRA *et al.*, 2001). A exploração deste bivalve é de grande importância para a região por ser a principal fonte de renda para diversas comunidades (PEREIRA, *op cit.*).

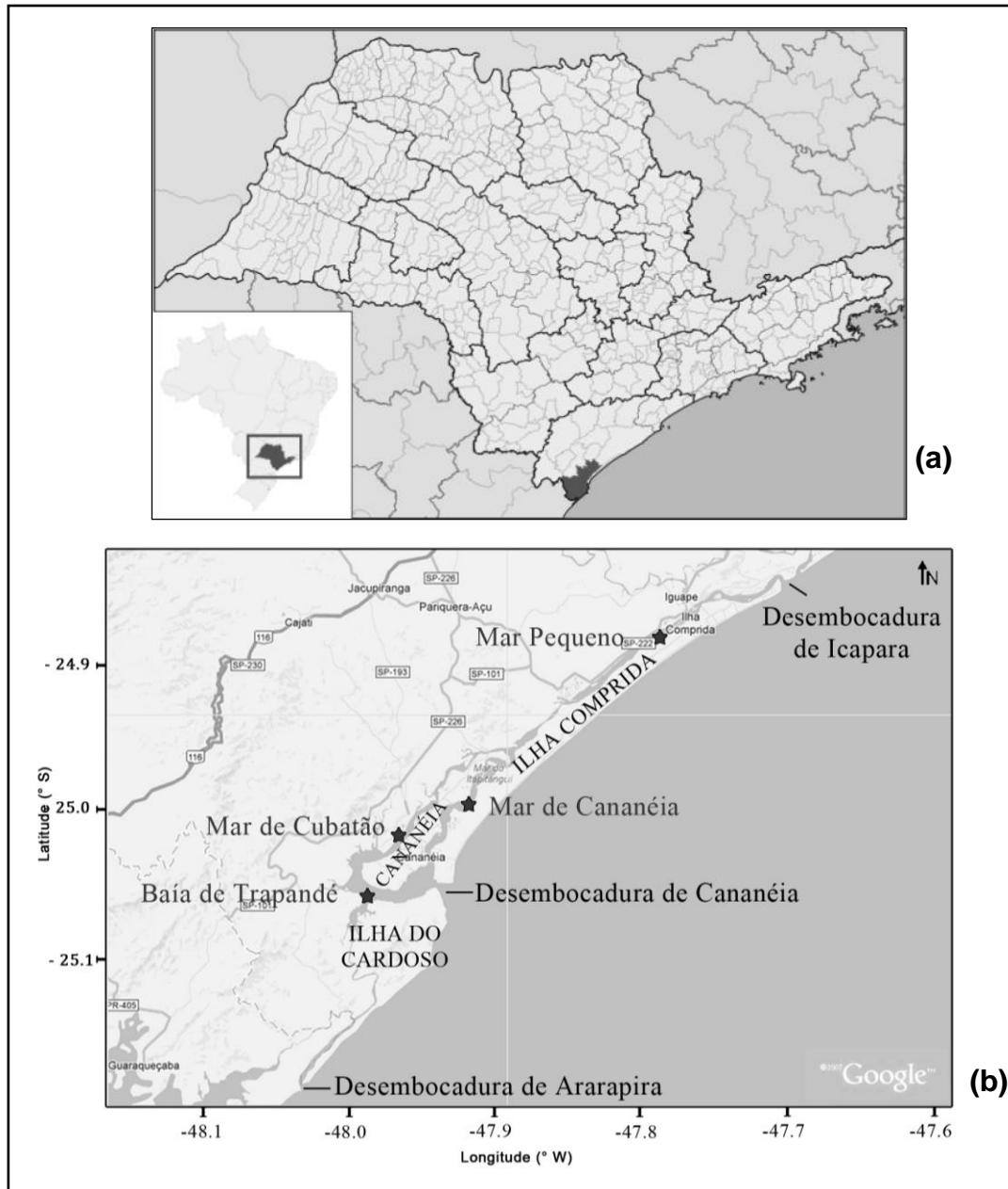


Figura 1: (a) Localização da área de estudo no Estado de São Paulo, município de Cananéia. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Cananeia>, acesso em julho de 2012. (b) Mapa do Complexo Estuarino Cananéia-Iguape.

Apresentação da Dissertação

Os resultados da presente dissertação são apresentados sob a forma de dois artigos científicos. Entre os anos de 2005 a 2011, mensurou-se valores de coliforme totais e termotolerantes nas áreas de extrativismo da ostra *Crassostrea sp.* no município de Cananéia, SP. Devido à importância microbiológica das ostras em relação com o ambiente onde são extraídos, verificou-se o nível de contaminação por coliformes nas áreas de produção, comparando os resultados com a legislação vigente.

Capítulo 1: Densidade colimétrica das áreas de extrativismo de ostras em relação aos fatores ambientais em Cananéia.

O objetivo deste trabalho foi verificar a densidade de coliformes na água, correlacionando os resultados com as variações ambientais. Este artigo seguiu as normas da revista “Pesquisa Agropecuária Brasileira”.

Capítulo 2: Determinação colimétrica na água e no tecido mole das ostras extraídas em Cananéia, SP.

Neste trabalho, determinou-se a densidade de coliformes totais e termotolerantes do tecido das ostras e sua relação com o nível de coliformes na água onde foram extraídos. Este artigo seguiu as normas da revista “Pesquisa Agropecuária Brasileira”.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, R.M.A.; HUSSAR, G.J.; PERES, M.R.; FERRIANI JR., A.L. 2004 Qualidade microbiológica do Córrego “Ribeirão dos Porcos” no município de Espírito Santo do Pinhal – São Paulo. *Revista Engenharia Ambiental*, Espírito Santo do Pinhal, 1(1): 51-56.

ANVISA - AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. 2001 Resolução – RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. *Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos*. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. 68p. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rdc.htm>>. Acesso em: jan. 2010.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2005 *Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group*. In: Standard Methods for the examination of water and wastewater, New York, 20 ed.

AZEVEDO, J.S. e BRAGA, E.S. 2011 Caracterização hidroquímica para qualificação ambiental dos estuários de Santos - São Vicente e Cananéia. *Arquivo Ciência do Mar*, Fortaleza, 44(2): 52-61.

BARBIERI, E. e MACHADO, I.C. 2006 Qualidade microbiológica da água de cultivo de Ostra (*Crassostrea brasiliensis*) comercializada em Cananéia (SP), Brasil. Comunicação Científica. In: *IV CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA*. CIVA: 1-8. Disponível em: <http://www.civa2006.org>. Acesso em: 01 fev. 2010.

BARCELLOS, R.L.; BERBEL, G.B.B.; BRAGA, E.S.; FURTADO, V.V. 2005 Distribuição e características do Fósforo sedimentar no Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape, Estado de São Paulo, Brasil. *Geochimica Brasiliensis*, 19(1): 22-36.

BORDALO, A.A.; ONRASSAMI, R.; DECHSAKULWATANA, C. 2002 Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand). *Journal of Applied Microbiology*, 93: 864-871.

CAVALLI, R.O. e FERREIRA, J.F. 2010 O Futuro da Pesca e da Aquicultura Marinha no Brasil: A Maricultura. *Ciência e Cultura*. São Paulo, 62(3): 38-39.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. 2004 *Relatório de qualidade das águas litorâneas do estado de São Paulo: balneabilidade das praias 2003*. São Paulo. 226p.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. 2012 *Qualidade das praias litorâneas no estado de São Paulo 2011*. São Paulo. 193p.

CODEX - CODEX ALIMENTARIUS. 2008 *Standard for live and raw bivalve molluscus*. Codex Standard 292-2008: 1-7.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. 2005 Resolução nº357, do dia 17 de março de 2005. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.* Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília.

CORREA, A.A; ALBARNAZ, J.D.; MORESCO, V.; POLI, C.R.; TEIXEIRA, A.L.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. 2007 Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Marine Environmental Research*, Santa Catarina, 63(5): 479-489.

CRAIG, D.L.; FALLOWFIELD, H.J.; CROMAR, N.J. 2004 Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *Jornal & Applied Microbiology*, Austrália, 96(5): 922-930.

CUNHA A.C.; CUNHA H.F.A.; JÚNIOR A.C.P.B.; DANIEL L.A.; SCHULZ H.E. 2004 Qualidade microbiológica da água em rios de áreas urbanas e periurbanas no baixo Amazonas: o caso do Amapá. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, 9(4): 234-240.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (sem data, on line). *Garantia da qualidade dos produtos da pesca.* Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/T1768P/T1768P05.htm>>. Acesso em: 27 de dezembro de 2010.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2012 *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*. Rome. 209p.

GALVÃO, J.A.; FURLANI, E.F.; SÁLAN, E.O; PORTO, E.; OETTERER, M. 2006 Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados em Ubatuba, SP. *Ciências Agrotécnicas*, Lavras, 30(6): 1124-1129.

HAACK, S.K.; FOGARTY, L.R.; WRIGHT, C. 2003 *Escherichia coli* and *Enterococci* at beach in the grand traverse bay, Lake Michigan: sources, characteristics, and environmental pathways. *Environmental Science Technology*, USA, 37(15): 3275 – 3282.

HUGHES, K.A. 2003 Influence of seasonal environmental variables on the distribution of presumptive fecal coliforms around a research station in Antarctica. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 4884-4891.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1986 *Microorganismos in foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. 2.ed. Blackwell Scientific Publications, Toronto. 278p.

KNAP, A.; DEWAILLY, E.; FURGAL, C.; GALVIN, J.; BADEN, D.; BOWEN, R.E.; DEPLEDGE, M.; DUGUAY, L.; FLEMING, L.E.; FORD, T.; MOSER, F.; OWEN, R.; SUK, W.A.; UNLUATA, U. 2002 Indicators of Ocean Health and Human Health: Developing a research and Monitoring Framework. *Environmental Health Perspectives*, United States, 110(9): 839-845.

KINZELMAN, J.; NG, C.; JACKSON, E.; GRADUS, S.; BAGLEY, R. 2003 *Enterococci* as indicators of Lake Michigan recreational water quality: comparison of two methodologies and their impacts on public health regulatory events. *Applied and Environmental Microbiology*, California, 69(1): 92-96.

KOLM, H. E. e ANDRETTA, L. 2003 Bacterioplankton in different tides of the Perequê tidal creek, Pontal so Sul, Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 34: 97-103.

KRESS, N. e HERUT, B. 1998 Hypertrophication in the oligotrophic eastern Mediterranean: a study in Haifa Bay (Israel). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, Israel, 46(5): 645-656.

LEAL, D. A. G. e FRANCO, R. M. B. 2008 Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: metodologias de detecção e normas de controle. *Revista Panamericana de Infectologia*, Brasil, 10(4): 48-57.

MARTINEZ, D.I. e OLIVEIRA, A.J.F.C.de 2010 Faecal bacteria in *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) for biomonitoring coastal Waters and seafood quality. *Brazilian Journal of Oceanography*, São Paulo, 58: 29-35.

MENDES, E.S.; LOPES, C.A. de M.; MENDES, P. de P.; COELHO, M.I. de S.; CARVALHO, E. 2002 Avaliação microbiológica de ostras consumidas na grande Recife – PE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Porto Alegre, *Anais*, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA), p.430-434.

MILL, A.; SCHLACHER, T.; KAOULI, M. 2006 Tidal and longitudinal variation of faecal indicator bacteria in an estuarine creek in south-east Queensland, Austrália. *Marine Pollution Bulletin*, Austrália, 52(8): 881-891.

MIQUELANTE, F.A. e KOLM, H.E. 2011 Indicadores microbiológicos de poluição fecal na desembocadura da Gamboa Olho d'Água, Paraná: subsídio para o monitoramento da balneabilidade do Brasil. *Biology Health Science*, Ponta Grossa, 17(1): 21-35.

MOREIRA, A.S.; LEO, M.V.P.; SANTOS, S.S.F.; JORGE, A.O.C.; SILVA, C.R.G. 2011 Qualidade sanitária da água e de bivalves *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818) na praia do Jabaquara, Paraty, RJ. *Revista Biociências*, Rio de Janeiro, 17(1): 66-71.

ODUM, E.P. 1983 *Ecologia*. Ed. Guanabara, 434p.

PEREIRA, O.M.; MACHADO, I.C.; HENRIQUES, M.B.; GALVÃO, M.S.N.; YAMANAKA, N. 2001 Avaliação do estoque da ostra *Crassostrea brasiliana* em rios e gamboas da região estuarino-lagunar de Cananéia (São Paulo, Brasil). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 27(1): 85-95.

PEREIRA, M.A.; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D. e BATISTA, C.R.V. 2006 Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianopolis – Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, Santa Catarina, 37(2): 159-163.

PNCMB - PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE HIGIÊNICO SANITÁRIO DE MOLUSCOS BIVALVES. 2011 *Estabelecem os requisitos mínimos necessários para inocuidade e qualidade dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano, bem como monitorar e fiscalizar*. Instrução Normativa Interministerial, portaria 122, seção 1 do Diário Oficial da União. Brasil.

REGAN, P.M.; MARGOLIN, A.B.; WATKINS, W.D. 1993 Evaluation of microbial indicators for the determination of the sanitary quality and safety of shellfish. *Journal of Shellfish Research*, Connecticut, 12(1): 95-100.

RODGERS, C. J. 2001. The NSW Shellfish Quality Assurance Program: an operational review. Sydney. *Safe Food Production NSW*. 123p.

ROUBACH, R.; CORREIA, E.S.; ZAIDEN, S.; MARTINO, R.C.; CAVALLI, R.O. 2003 Aquaculture in Brazil. *World Aquaculture*, 34(1): 28-35.

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

SILVA, J.F. 1989 Dados climatológicos de Cananéia e Ubatuba (Estado de São Paulo). *Bolm. Climatológico. Instituto oceanográfico*, São Paulo, (6): 1-21.

TESSER, M.G. e SOUZA, L.A.P. 1998 Dinâmica sedimentar e feições sedimentares indicadas na superfície de fundo do sistema Cananéia-Iguape, SP. *Revista brasileira de Oceanografia*, 46(1): 69-83.

UNESCO - UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION. 2005 *World Network of Biosphere Reserves – SC/EES – June 2005*. The MAB Program. 19p.

VIEIRA, R.H.S.F.; ATAYDE, M.A.; CARVALHO, E.M.R.; CARVALHO, F.C.T.; FONTELES FILHO, A.A. 2008 Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do rio Pacoti (Eusebio, Estado de Ceara): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, 45(3): 180-189.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2011 Guidelines for drinking-water quality. Switzerland, 4th ed, 541p.

CAPÍTULO 1

Densidade colimétrica das áreas de extrativismo de ostras em relação aos fatores ambientais em Cananéia.

Densidade colimétrica das áreas de extrativismo de ostras em relação aos fatores ambientais em Cananéia.

Sonia Assami Doi ⁽¹⁾, Edison Barbieri ⁽²⁾ e Hécio Luis de Almeida Marques ⁽³⁾

⁽¹⁾ Programa de Pós-Graduação do Instituto de Pesca-SP. E-mail: soniasdoi@gmail.com

⁽²⁾ Instituto de Pesca-APTA-SAA/SP, Caixa Postal 61, Cananéia, SP, 11990-000, Brasil. E-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br

⁽³⁾ Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Peixes Ornamentais, Instituto de Pesca, APTA, SAA, SP Av. Francisco Matarazzo, 455, Água Branca, São Paulo, SP, CEP: 05001-900. E-mail: helcio@pesca.sp.gov.br

Resumo - O estuário de Cananéia apresenta condições propícias para a produção e extração da ostra nativa *Crassostrea sp.*, entretanto está sujeito a diversos tipos de contaminação por agentes patogênicos. A presença de coliformes na água é um importante parâmetro da contaminação microbiológica e sua densidade varia conforme diferenças sazonais e ambientais. Para avaliar a qualidade microbiológica da água no estuário de Cananéia, realizou-se análise colimétrica durante o período de 2005 a 2011, verificando a variação dos coliformes em relação aos fatores ambientais. No laboratório, as amostras foram submetidas à análise para a determinação do Número Mais Provável de Coliformes Totais e Termotolerantes, utilizando a Técnica de Tubos Múltiplos. A média geométrica verificada neste trabalho foi de 37,56 NMP 100mL⁻¹ de coliformes totais e 17,98 de coliformes termotolerantes, apresentando-se dentro do limite permitido pela resolução CONAMA 357/05, mas o percentil dentro do estabelecido foi de 80%. Análise dos estofos de maré apresentou variações nas densidades colimétricas ao longo do estudo. As flutuações das densidades podem ser explicadas pela variação ambiental, na qual se verificou que a densidade de

coliforme teve uma correlação negativa em relação à salinidade e positiva em relação à pluviosidade.

Termos para indexação: Coliformes totais e termotolerantes, qualidade da água, *Crassostrea sp.*

Colimetric density assay of oyster harvesting areas in relation to environmental factors in Cananeia.

Abstract – The Cananeia's estuary shows favorable conditions for the production and extraction of the native oyster *Crassostrea sp.*, however is subject to various types of contamination by pathogens. The presence of coliforms in water is an important parameter for microbiological contamination and its concentration varies with environmental and seasonal factors. To assess the microbiological quality of the water in the Cananeia's estuary, were submitted to colimetric analysis, were done during the years 2005 to 2011, and the coliform bacteria variation in relation to environmental condition were observed. In the laboratory, samples were analyzed to determine the Most Probable Number of total and thermotolerant coliforms, based on the Multiple Tube Technique. The geometric mean observed in this work was 37,56 NMP 100mL⁻¹ of total coliforms, and 17,98 for thermotolerant coliforms, these values were within the limit permitted by CONAMA Resolution 357/05, but within the established percentil was 80%. Rates fluctuations can be explained by environmental variation: coliform concentration has a negative correlation with respect to salinity and positive with in relation to rainfall. The analysis showed the upholstery tidal variations in concentrations throughout in this study.

Index terms: Total and thermotolerant coliform, water quality, *Crassostrea sp.*

Introdução

O complexo estuarino-lagunar de Cananéia, Iguape e Paranaguá situa-se ao sul do estado de São Paulo (Brasil) e é uma das mais importantes áreas úmidas da costa brasileira em termos de biodiversidade e produtividade natural (UNESCO, 2005). Foi reconhecida nacional e internacionalmente como o terceiro ecossistema mais produtivo do Atlântico Sul pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) em 1992, devido às suas principais características ambientais estar ainda muito bem preservadas (UNESCO, 2005).

O estuário é influenciado pelas forçantes ambientais (movimentos das marés, de descargas fluviais e dos ventos) como também pelas ações antrópicas (lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados) que afetam diretamente a qualidade da água e a distribuição dos organismos aquáticos (MIRANDA *et al.*, 2002). O complexo estuarino-lagunar de Cananéia é considerado maior produtor de ostras em bancos naturais da Região Sudeste-Sul do Brasil e apresenta condições ambientais propícias, representando um dos principais recursos naturais explorados, tanto para o comércio como para o consumo local (PEREIRA *et al.*, 2003).

Assim sendo, torna-se de fundamental importância a verificação periódica da qualidade da água das áreas de cultivo, para avaliar a qualidade microbiológica dos moluscos bivalves. Entretanto, 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 (BARBIERI e DOI, 2012).

As águas do estuário de Cananéia podem ser enquadradas na Resolução CONAMA nº 357 (2005) como águas salobras por apresentar salinidade entre 0,5 e 30 e na Classe 1, as quais são destinadas à proteção das comunidades aquáticas e à criação natural e/ou intensiva (aqüicultura) de espécies destinadas à alimentação humana. Segundo a Resolução CONAMA “Para o cultivo de moluscos bivalves destinados a alimentação humana, a média geométrica

da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não devesse exceder 43 NMP/100 mL, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mL”.

A sobrevivência de bactérias fecais no ambiente aquático é determinada por vários fatores ambientais, tais como variações de temperatura, salinidade, níveis de oxigênio, irradiação ultravioleta e pluviosidade (BORDALO *et al.*, 2002; HUGHES, 2003; CRAIG *et al.*, 2004). Além destas variáveis ambientais, a maré também tem grande influência da hidrodinâmica local (MILL *et al.*, 2006), provocando a dispersão desses microrganismos e conseqüentemente variando a sua densidade no ambiente. Trabalhos como de KOLM e ANDRETTA (2003) e de BARBIERI e MACHADO (2006) analisaram a correlação de fatores físicos, químicos e biológicos no ambiente aquático, verificando que houve interação entre os dados analisados.

Os coliformes termotolerantes apresentam-se em grandes densidades nas fezes de animais de sangue quente e são utilizados como indicadores de poluição fecal recente das águas destinadas à potabilidade e balneabilidade (ALM *et al.*, 2003; POPE *et al.*, 2003; CETESB, 2004; LEBARON *et al.*, 2005). Estes organismos não encontram condições ideais para multiplicar-se na água e morrem em um curto período de tempo. São facilmente isolados e identificados na água por meio de técnicas simples e rápidas (CETESB, 2004).

Diante da importância da qualidade da água onde ocorre a extração e manejo das ostras *Crassostrea sp.*, o presente trabalho teve como objetivo averiguar o nível de contaminação por coliformes nas áreas de produção desses organismos. A hipótese deste trabalho é de que com as variações ambientais físicos-químicas (pH, pluviosidade, temperatura e salinidade) haverá alteração das densidades dos coliformes. Os resultados obtidos foram comparados com a legislação vigente, para verificação da qualidade da água em relação à contaminação microbiológica para a produção de moluscos bivalves.

Materiais e Métodos

No período de janeiro de 2005 a dezembro de 2011, foram coletadas, quinzenalmente, amostras de águas estuarinas nos locais de produção de ostra em Cananéia (Figura 2), em ambas as fases de maré (sizígia e quadratura). Os locais analisados foram Mandira, Itapitangui, Cooperostra, Taquari, Ilha da Casca e Retiro. As variáveis ambientais (temperatura, pH e salinidade) foram obtidas no próprio local da coleta com o auxílio do equipamento de medição Multiparâmetro YSI-63. Os dados pluviométricos foram obtidos da estação meteorológica do Instituto oceanográfico da USP em Cananéia, quinzenalmente do ano de 2011, sendo adotado como parâmetro o valor médio dos 5 dias que antecederam a coleta de água.

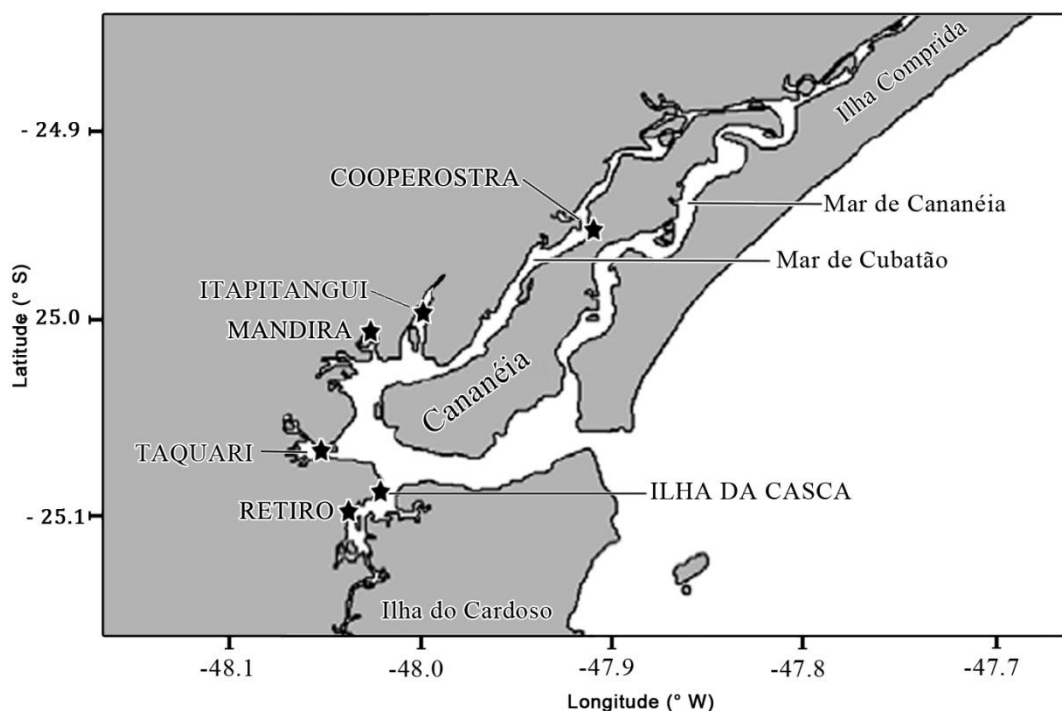


Figura 2: Localizações dos pontos de coleta da água para análise colimétrica e mensuração dos dados ambientais “in situ” (6 pontos de coleta).

As amostras de água foram coletadas em profundidade de 15 a 30 cm, abaixo da superfície, com frasco voltado contra o sentido da correnteza (APHA, 2005). Utilizaram-se frascos de vidro neutro de borossilicato previamente autoclavados e em seguida, as amostras foram armazenadas em caixa isotérmica refrigerada e transportado ao laboratório. A metodologia utilizada para amostragem obedeceu às normas descritas pelo Standard Methods for the examination of water and wastewater e o método analítico utilizado para determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes foi a Técnica de Tubos Múltiplos (APHA, 2005).

As amostras foram diluídas conforme APHA (2005) em três séries com cinco tubos cada contendo Caldo Lauryl Sulfato de Sódio. Os tubos foram incubados em estufa a 35°C por 24 – 48 h. Os tubos que apresentaram produção de gás nos tubos de Durham e acidificados (coloração amarelada) foram considerados positivos.

Para confirmação de coliformes totais, os tubos que foram considerados positivos foram repicados em Caldo Verde Bile Brilhante (2%) incubadas a 35°C ± 1°C por 48h. Para coliformes termotolerantes, as amostras foram repicadas e incubadas em EC (meio específico para *Escherichia coli*, utilizado como indicador de bactéria entérica patogênica) por um intervalo de 18 a 24h a 44,5°C ± 0,2°C. Após este período, foram considerados positivos os tubos que apresentaram produção de gás. O resultado das densidades de coliformes totais e termotolerantes foram expressos em Número Mais Provável por 100 mL (NMP 100mL⁻¹).

Utilizou-se o teste estatístico Shapiro-Wilk para verificar a normalidade. Como não apresentou distribuição normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW-H) para comparação do nível de contaminação dos coliformes nos diferentes pontos de coleta, tanto nos estofos de maré quanto na sazonalidade. Utilizou-se a Correlação Linear de Spearman para verificar se houve correlação entre a densidade de coliformes e os dados

ambientais coletados neste trabalho. Utilizou-se teste estatístico de Friedman para comparar as densidades de coliformes totais e termotolerantes entre os estofos das marés (ZAR, 1999).

Coefficientes de correlação foram determinados entre o NMP de coliformes e a salinidade, temperatura e pluviosidade. Considerou-se Muito Fraca Correlação (MFC) para valores inferiores a 0,50; Fraca Correlação (FRC) com valores obtidos entre 0,50 e 0,70; Forte Correlação (FC) entre 0,70 e 0,89 e Correlação Muito Forte (CMF) para valores entre 0,90 e 1,00 (adaptado de CABRAL *et al.*, 2006).

Resultados e Discussão

Os resultados do presente estudo demonstraram a variabilidade temporal da densidade de coliformes na área analisada. O NMP de coliformes totais (CT) das amostras variou de 2,0 a 1.600 NMP 100mL⁻¹, com média geométrica de 38,46 NMP. Coliformes termotolerantes (Ct) apresentaram variação de 2,0 a 300 NMP 100mL⁻¹, com média geométrica de 18,80 NMP. Verificou-se que os valores estão dentro dos limites permitidos pelo CONAMA 357/2005.

Entretanto, analisando o percentil das amostras pela legislação verificou-se que somente 80% dos dados estavam abaixo do limite estabelecido, indicando que apesar da média geométrica estar dentro do estipulado, a quantidade de valores acima do valor determinado mostrou que a água estava insatisfatória no período estudado. Portanto se faz necessário um acompanhamento contínuo dos contaminantes fecais das áreas com produção aquícola.

Monitorar a contaminação da água através da colimetria no estuário de Cananéia justifica-se pelo fato desta região ser considerada um importante produtor de moluscos bivalves. BARBIERI e MACHADO (2006) e RISTORI *et al.* (2007) utilizaram a enumeração de coliformes a fim de averiguar o nível de contaminação fecal nas águas de extração de

ostras em Cananéia, objetivando possibilidade de riscos que estes microrganismos podem causar quando destinados ao consumo humano. No presente trabalho, altas densidades de coliformes podem ter sido influenciadas pelo lançamento de efluente de esgoto próximo aos pontos de coleta.

Verificou-se que os dados colimétricos aumentaram conforme aumentou o nível pluviométrico. No inverno constatou a menor média de coliformes (CT = 24,29 NMP e Ct = 11,19 NMP) e a menor média pluviométrica (0,54 mm/dia). No verão, ao contrário, mensurou-se a maior média pluviométrica (2,54 mm/dia) com elevada densidade de coliformes (CT = 110,23 NMP e Ct = 41,69 NMP) (tabela 1).

Tabela 1. Média geométrica (desvio padrão geométrico) dos coliformes totais e termotolerantes em relação à sazonalidade em NMP 100mL⁻¹. Média das variações ambientais: salinidade, temperatura (°C), pluviosidade (mm/dia) e pH e seus respectivos desvios padrões entre parênteses.

	Colif. Totais	Col. Termot.	Salinidade	Temperatura	Pluviosidade	pH
Outono	32,89 (2,95)	17,10 (2,95)	18,50 (4,27)	22,90 (2,84)	1,60 (1,50)	7,36 (0,56)
Inverno	24,29 (4,58)	11,19 (3,31)	20,62 (4,43)	19,62 (2,12)	0,54 (0,64)	7,20 (0,61)
Primavera	25,71 (4,22)	16,46 (5,45)	16,60 (5,37)	23,58 (1,59)	1,44 (1,70)	7,09 (0,62)
Verão	110,23 (4,68)	41,69 (4,00)	12,30 (6,59)	26,33 (1,64)	2,54 (2,00)	6,98 (0,58)

RISTORI *et al.* (2007) realizaram estudos na costa sul do Brasil, no qual obtiveram tendências de contaminação relacionados às variações sazonais, detectando um nível elevado de coliformes fecais no verão, provavelmente devido a pluviosidade e aumento típico da população turística na época. Neste trabalho, altas densidades de coliformes no verão indicam um elevado nível de contaminação por efluentes lançados na água sem tratamento, ocasionado pelo afluxo de turistas e grandes volumes pluviométrico que aumenta a vazão de esgotos gerados nessa época. Houve diferença significativa entre as sazonalidades nas densidades de coliformes totais (KW-H = 13,71 e p = 0,0033) e termotolerantes (KW-H = 13,59 e p = 0,0035).

Através da correlação de Spearman, observou-se que houve uma correlação muito forte positiva entre a pluviosidade e coliformes totais ($r=0,95$, $p< 0,0001$) e termotolerantes ($r=0,94$, $p< 0,0001$) (figuras 3 e 4, respectivamente), concordando com estudos de BARBIERI e MACHADO (2006), VIEIRA *et al.* (2008) e MIQUELANTE e KOLM (2011). Estes trabalhos descreveram que a pluviosidade interfere nas densidades de coliformes na água, pois esta forte tem a capacidade de arrastar esgotos e resíduos sólidos para os cursos d'água que, por sua vez, afluem para o estuário.

Observou-se que no inverno a média da salinidade foi mais elevada (20,62) comparada com as outras estações do ano, mas a temperatura e a pluviosidade apresentaram as menores médias, característica de regiões subtropicais. No verão constatou-se o inverso, com maior média colimétrica e menor média de salinidade. Estatisticamente, não apresentou correlação significativa concordando com trabalho de SILVA *et al.* (2003). BORDALO *et al.* (2002) relataram que os coliformes têm pouca tolerância à altas salinidades das águas marinhas, sendo assim sua detecção nesse ambiente denota uma descarga recente e constante de matéria fecal.

De acordo com KOLM e ANDRETTA (2003), a amplitude da variação da salinidade em estuários é muito alta, podendo ser encontradas neste ecossistema tanto bactérias que possuem adaptações para tolerar elevadas salinidades (halofílicas) como bactérias que vivem em águas com baixo teor de sal (halofóbicas).

A temperatura da água apresentou uma variação sazonal bem regular. No período amostral a temperatura variou entre 17,4 °C à 28,4 °C, sendo a mínima registrada no mês de agosto (inverno) e a máxima no mês de fevereiro (verão). Verificou-se correlação muito fraca entre a temperatura da água e a colimetria (CT: $r= 0,16$, $p= 0,34$ e Ct: $r= 0,062$, $p= 0,73$), concordando com trabalhos de RISTORI *et al.* (2007) e RAMOS *et al.* (2010).

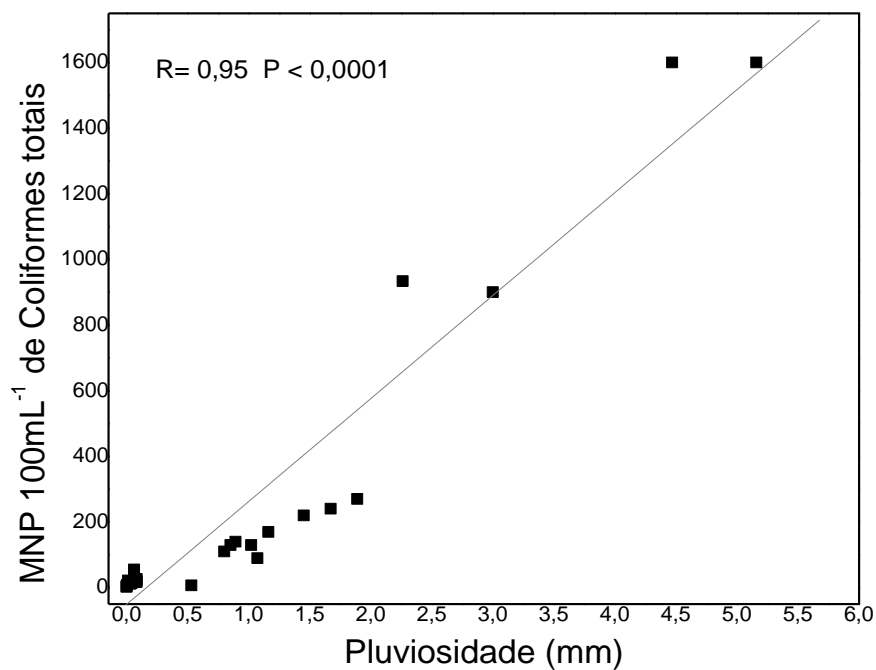


Figura 3: Correlação entre as médias pluviométricas e os valores de coliformes totais (n=24). O resultado apresentou uma correlação positiva muito forte, indicando que a densidade de coliformes na água foi alta com o alto índice de pluviosidade.

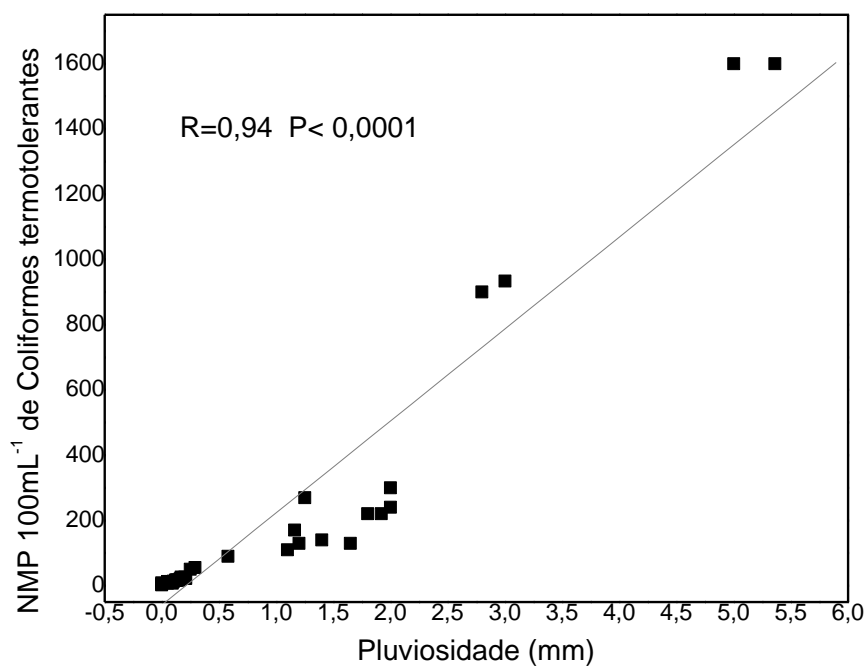


Figura 4: Correlação entre as médias pluviométricas e os valores de coliformes termotolerantes (n=24). O resultado apresentou uma correlação positiva muito forte, indicando que a densidade de coliformes na água foi alta com o alto índice de pluviosidade.

O valor médio do pH foi de 7,16, sendo o mínimo de 5,89, observado no verão de 2007 e o máximo de 8,26, no inverno de 2008. O ambiente com 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 (ROZEN e BELKIN, 2001). GALVÃO *et al.* (2006) analisaram a contaminação microbiológica nas águas de cultivo de mexilhões em Ubatuba (SP) juntamente com valores de pH, porém, constataram que não estavam relacionados entre si.

Durante o estofio de preamar e baixa-mar da quadratura, as densidades de coliformes totais foram bem maiores em relação à maré de sizígia. Entretanto, em relação aos coliformes termotolerantes (figura 5), verificou-se que as densidades foram maiores no estofio de baixa-mar de sizígia seguido pelo estofio de baixa-mar de quadratura. Este período de coleta foi

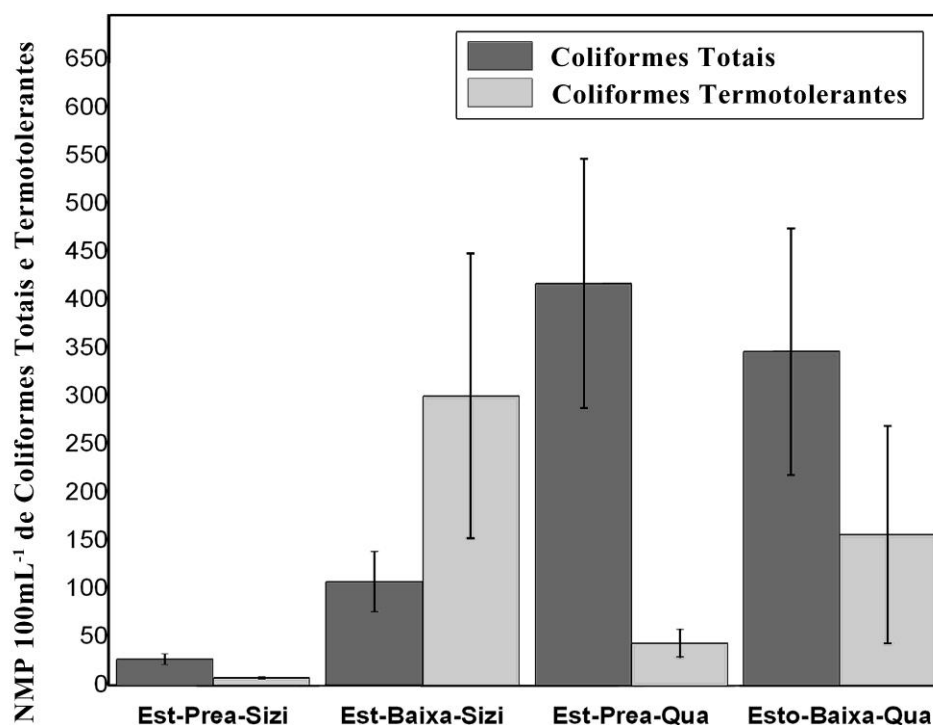


Figura 5: Médias das densidades de coliformes totais e termotolerantes na água em relação ao estofio das marés de sizígia e quadratura. As barras representam os respectivos desvios padrões.

caracterizado por maior pluviosidade, podendo ter influenciado nos valores coletados. Resultado similar foi observado no trabalho de MIQUELANTE e KOLM (2011) na desembocadura da Gamboa Olho d'água (PR), onde valores elevados de coliformes termotolerantes foram observados nos períodos de chuva durante a baixa-mar.

Segundo KOLM e ANDRETTA (2003) os maiores valores de coliformes totais registrados ocorreram durante a maré baixa no estudo realizado no córrego do Perequê, Pontal do Sul (PR), evidenciando uma relação direta entre as marés e a densidade de coliformes. Ainda segundo o autor, esse período foi caracterizado por altas pluviosidades, o que também pode ter influenciado a alta densidade registrada.

Através do teste estatístico de Friedman, compararam-se os valores de coliformes no estofa de preamar e baixa-mar da sizígia e quadratura foram comparados e encontrou-se diferença significativa entre preamar sizígia e baixa-mar sizígia, preamar quadratura e baixa-mar quadratura (tabela 2). Na comparação entre baixa-mar de sizígia com preamar de quadratura somente coliforme termotolerante apresentou diferença significativa ($p=0,006$).

Tabela 2: Teste não paramétrico de Friedman comparando as densidades de coliformes totais e termotolerantes entre os estofos de preamar e baixa-mar, e os estofos de sizígia e quadratura (graus de liberdade 3, $\alpha < 0,05$). Em negrito os valores que apresentaram diferença significativa.

Estofos	Coliforme total	Coliforme termotolerante
Preamar Sizígia x Baixa-mar Sizígia	0,02664	0,001831
Preamar Sizígia x Preamar Quadratura	0,000885	0,02124
Preamar Sizígia x Baixa-mar Quadratura	0,0003357	0,01062
Baixa-mar Sizígia x Preamar Quadratura	0,1598	0,006225
Baixa-mar Sizígia x Baixa-mar Quadratura	0,9875	0,05145
Preamar Quadratura x Baixa-mar Quadratura.	0,6698	0,9032

A ocupação desordenada do solo, os loteamentos irregulares, o avanço imobiliário sobre as regiões de mangues e restingas e a falta de saneamento básico constituem fonte permanente de poluição do estuário por resíduos orgânicos e esgotos domésticos, tornando

alguns locais sujeitos à contaminação, principalmente em determinadas épocas do ano (BARBIERI e MACHADO, 2006; BARBIERI e DOI, 2012).

O acompanhamento das densidades de coliformes, em vários pontos do estuário se faz necessário, com o objetivo de averiguar as suas densidades durante as variações das marés e principalmente a eficiência da estação de tratamento de esgoto de Cananéia. Além disso, faz-se necessária a determinação microbiológica nas águas das várias localidades onde se estão cultivando ostras, para se evitar risco à saúde do consumidor.

Conclusões

1. Percentis dos dados de coliformes apresentaram fora do limite, mas as médias geométricas dos microrganismos analisados estavam dentro do padrão estipulado pela legislação vigente.

2. Houve correlação positiva entre coliformes totais e termotolerantes em relação à pluviosidade e negativa em relação à salinidade.

3. Preamar de sizígia apresentou menor densidade de coliformes e diferiu significativamente dos outros estofos analisados em relação à densidade de coliformes, confirmando a hipótese descrita neste trabalho.

Agradecimentos

Agradecimento à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida para realização do programa de pós-graduação no Instituto de Pesca do Estado de São Paulo.

Ao CNPq pela bolsa de Produtividade de Edison Barbieri.

Referências

- ALM, E. W., BURKE, J., SPAIN, A. 2003 Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. *Water Research*, USA, 37(16): 3978-3982.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2005 *Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group*. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC. 20 th.
- BARBIERI, E. e DOI, S.A. 2012 Acute toxicity of ammonia on juvenile Cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) according to the salinity. *Aquaculture International*, São Paulo, 20: 373-382.
- BARBIERI, E. e MACHADO, I.C. 2006 *Qualidade microbiológica da água de cultivo de Ostra (Crassostrea brasiliensis) comercializada em Cananéia (SP), Brasil*. Comunicação Científica. In: IV CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA (CIVA). p.1-8. Disponível em: <http://www.civa2006.org>. Acesso em: 01 fev. 2010.
- BORDALO, A.A.; ONRASSAMI, R.; DECHSAKULWATANA, C. 2002 Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine Waters (Bangpakong River, Thailand). *Journal Applied Microbiology*, Portugal, 93(5): 864-871.
- CABRAL, S.A.S.; AZEVEDO JUNIOR, S.M. de; LARRAZABAL, M.E. de. 2006 Abundância sazonal de aves migratórias na Área de Proteção Ambiental de Piaçabuçu, Alagoas, Brasil. *Revista Brasileira Zoologia*, Pernambuco, 23(3): 865-869.
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. 2004 *Relatório de qualidade das águas litorâneas do estado de São Paulo: balneabilidade das praias 2003*. São Paulo, 226p.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. 2005 Resolução nº357, do dia 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília.
- CRAIG, D.L.; FALLOWFIELD, H.J.; CROMAR, N.J. 2004 Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *Journal & Applied Microbiology*, Austrália, 96(5): 922-930.
- GALVÃO, J.A.; FURLANI, E.F.; SÁLAN, E.O; PORTO, E.; OETTERER, M. 2006 Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados em Ubatuba, SP. *Ciências Agrotécnicas*, Lavras, 30(6): 1124-1129.
- HUGHES, K.A. 2003 Influence of seasonal environmental variables on the distribution of presumptive fecal coliforms around a research station in Antarctica. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 4884-4891.

- KOLM, H.E. e ANDRETTA, L. 2003 Bacterioplankton in different tides of the Perequê tidal creek, Pontal do Sul, Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 34: 97-103.
- LEBARON, P.; HENRY, A.; LEPEUPLE, A.S.; PENA, G.; SERVAIS, P. 2005 An operational method for the real-time monitoring of *E. coli* numbers in bathing waters. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 652-659.
- MILL, A.; SCHLACHER, T.; KAOULI, M. 2006 Tidal and longitudinal variation of faecal indicator bacteria in an estuarine creek in south-east Queensland, Austrália. *Marine Pollution Bulletin*, Austrália, 52(8): 881-891.
- MIQUELANTE, F.A. e KOLM, H.E. 2011 Indicadores microbiológicos de poluição fecal na desembocadura da Gamboa Olho d'Água, Paraná: subsídio para o monitoramento da balneabilidade do Brasil. *UEPG Biology Health Science*, Ponta Grossa, 17(1): 21-35.
- MIRANDA, L. B.; CASTRO, B. M.; KJERFVE, B. 2002 *Principios de Oceanografia Física de Estuários*. São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo. 411p.
- PEREIRA, O.M.; HENRIQUES, M.B.; MACHADO, I.C. 2003 Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliana* em bosques de mangue e proposta para a sua extração ordenada no estuário de Cananéia, SP, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 29(1): 19-28.
- POPE, M.L.; BUSSEN, M.; FEIGE, M.A.; SHADIX, L.; GONDER, S.; RODGERS, C.; CHAMBERS, Y.; PULZ, J.; MILLER, K.; CONNELL, K.; STANDRIDGE, J. 2003 Assessment of the effects of holding time and temperature on *Escherichia coli* densities in Surface Water Samples. *Applied Environmental Microbiology*, USA, 69(10): 6201–6207.
- RAMOS, R.J.; PEREIRA, M.A.; MIOTTO, L.A.; FARIA, L.F.B.; SILVERIRA JUNIOR, N.; VIEIRA, C.R.W. 2010 Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* (Impr.), São Paulo, 69(1).
- RISTORI, C.A.; IARIA, S.T.; GELLI, D.S.; RIVERA, I.N.G. 2007 Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. *International Journal of Environmental Health Research*, São Paulo, 17: 259–269.
- ROZEN, Y.; BELKIN, S. 2001 Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiology Reviews*, 725: 1-17.
- SILVA, A.I.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENEZES, F.G.R.; FONTELES-FILHO, A.A.; TORRES, R.C.O.; SANT'ANNA, E. 2003 Bacteria of fecal origin in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Cocó river estuary, Ceará state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 34: 126-130.
- UNESCO - UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION. 2005 *World Network of Biosphere Reserves – SC/EES –*. The MAB Program. 19p.

VIEIRA, R.H.S. dos F; ATAYDE, M.A.; CARVALHO, E.M.R.C.; CARVALHO, F.C.T.C.; FONTELES FILHO, A.A. 2008 Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, 45(38): 180-189.

ZAR, J.H. 1999 *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice-Hall. 4 ed.

CAPÍTULO 2

**Determinação colimétrica na água e no tecido mole das ostras extraídas em
Cananéia, SP**

**Determinação de coliformes na água e no tecido mole das ostras extraídas
em Cananéia, SP**

Sonia Assami Doi ⁽¹⁾, Edison Barbieri ⁽²⁾ e Hécio Luis de Almeida Marques ⁽³⁾

⁽¹⁾ Programa de Pós-Graduação do Instituto de Pesca-SP. E-mail: soniasdoi@gmail.com

⁽²⁾ Instituto de Pesca-APTA-SAA/SP, Caixa Postal 61, Cananéia, SP, 11990-000, Brasil. E-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br

⁽³⁾ Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Peixes Ornamentais, Instituto de Pesca, APTA, SAA, SP Av. Francisco Matarazzo, 455, Água Branca, São Paulo, SP, CEP: 05001-900. E-mail: helcio@pesca.sp.gov.br

Resumo – Este estudo objetivou avaliar a qualidade microbiológica da água de várias localidades onde se produzem ostras *Crassostrea sp.* no estuário de Cananéia, tanto como nos bivalves através das densidades de coliformes. Durante os anos 2005 a 2011, foram coletadas amostras de água em 10 localidades. No laboratório, as amostras de água e das ostras foram submetidas à análise para a determinação do Número Mais Provável de coliformes, baseado na Técnica dos Tubos Múltiplos e avaliado conforme a legislação vigente. As localidades Mandira, Pedrinhas, Retiro e Ilha da Casca foram as que apresentaram menores densidades de coliformes na água. A análise da água apresentou média geométrica de 54,48 de coliformes totais e 24,67 NMP 100mL⁻¹ de termotolerantes. Médias de coliformes nos tecidos das ostras foram 18,78 de total e 15,53 NMP g⁻¹ de termotolerantes. Verificou-se diferença significativa entre as localidades analisadas em relação à densidade de coliformes totais e termotolerantes na água. Analisaram-se as variações das contagens bacterianas em relação à sazonalidade, verificando que no outono apresentou a maior média de coliformes nas ostras, sendo os

maiores dados coletados no mês de Abril. Houve correlação positiva entre coliformes na água e na ostra.

Termos para indexação: coliformes totais e termotolerantes, estuário, contaminação microbiológica, extração de bivalves.

Coliforms determination of water and tissue of oysters extracted in Cananeia, SP

Abstract - This study aimed to evaluate the microbiological quality of water from the various locations where extracted oyster *Crassostrea sp.* in the Cananeia's estuary, as well as of the bivalve, through the densities of coliforms. During 2005 at 2011 were collected samples of water in 10 points. In the laboratory, water samples and oysters were analyzed to determine the Most Probable Number of coliforms, based on the Multiple Tube Technique and as analyzed to current legislation. The locations Mandira, Pedrinhas, Retiro and Ilha da Casca were what had lower densities of coliforms in water. The analysis of the water had geometric mean of the 54.48 total coliform and 24.67 MPN 100mL⁻¹ of the thermotolerant. Means of the coliforms in soft tissues of oyster were 18.78 MPN of total and 15.53 MPN g⁻¹ of thermotolerant coliform. There were a significant difference in the locations analyzed in relation to the concentration of total and thermotolerant coliform in water. Observed that the autumn had the highest means of coliforms in oysters in relation to seasonality, and the hight data were collected in the April. There was a positive correlation between coliforms in water and oysters.

Index terms: total and thermotolerant coliforms, estuary, microbiology contamination, shellfish extraction.

Introdução

Os ambientes estuarinos estão sujeitos a diferentes tipos de contaminação, como as de veiculação microbiológica pelo lançamento de efluentes domésticos lançados *in natura* no ambiente, que podem causar riscos à saúde humana (GARCIA, 2005). O estuário de Cananéia é considerado uma das áreas úmidas mais importantes da costa brasileira em termos de biodiversidade e produtividade natural, reconhecido nacional e internacionalmente como terceiro ecossistema mais produtivo do Atlântico Sul, devido às suas características bem preservadas (UNESCO, 2005). Possui condições propícias para a formação de bancos naturais e implantação de engorda e extração de ostra *Crassostrea sp.*, sendo esta região responsável pela maior produção de ostras do estado de São Paulo (PEREIRA *et al.*, 2003; RISTORI *et al.*, 2007).

Os moluscos bivalves são organismos filtradores que se alimentam das partículas e microalgas que se encontram na água e acumulam em seus tecidos, grandes quantidades de substâncias orgânicas, inorgânicas, além dos microrganismos presentes no ambiente, atuando como bioindicador da insalubridade da água (SILVA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2006; ZANETTE *et al.*, 2006). Nesse sentido, a qualidade microbiológica da água foi monitorada através dos níveis de bactérias indicadoras de contaminação fecal, como os coliformes. Este bioindicador se relaciona com o risco potencial de contrair doenças infecciosas por meio de sua utilização para recreação e em alimentos contaminados (TOURON *et al.*, 2007). O hábito de consumir ostras cruas ou levemente cozidas pode contribuir para o surgimento de diversos casos de doenças transmitidas por alimentos (POTASMAN *et al.*, 2002; MENDES *et al.*, 2004). Assim sendo é necessário avaliar os contaminantes microbiológicos tanto para a água como para os moluscos frescos.

O grupo dos coliformes é característico de organismos que crescem no trato gastrointestinal de animais de sangue quente, então sua presença no ambiente e nos

organismos cultivados, indica contaminação fecal (AMARAL *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006; CODEX, 2008). Coliforme termotolerante é um dos patógenos amplamente utilizados no monitoramento da qualidade microbiológica da água em que se deseja constatar contaminação fecal recente ou de condições sanitárias insatisfatórias (SILVA *et al.*, 2006).

Em países como os EUA, Chile e Brasil o cultivo e a extração dos bivalves são controladas pela análise da qualidade de água (SILVA *et al.*, 2006). Entretanto, o nível dos coliformes pode ser afetado por fatores tais como as correntes, ventos e a chuva que ocorre na vizinhança do estuário (MACHADO *et al.*, 2000; MIQUELANTE e KOLM, 2011).

Na tentativa de minimizar os problemas relacionados à qualidade sanitária dos moluscos bivalves, programas como o Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB, 2011) e Codex Alimentarius (CODEX, 2008) estabelecem limites permissíveis de contaminação de origem fecal para os moluscos (GARCIA, 2005).

Diante da importância da qualidade da água nas áreas de extração da ostra *Crassostrea sp.* e contaminação por microrganismos fecais, este trabalho teve como objetivo comparar a densidade de coliformes nas águas das áreas de extração com aqueles do tecido mole destes moluscos bivalves no município de Cananéia, SP. Os resultados foram avaliados de acordo com a legislação vigente. A hipótese deste trabalho foi que a densidade de coliformes no tecido da ostra relacione-se diretamente com a contaminação de coliformes na água.

Materiais e Métodos

Foram coletadas amostras de águas estuarinas em dez localidades situadas no município de Cananéia (SP), no período de 2005 a 2011, onde se desenvolve a engorda e a extração de ostras (*Crassostrea sp.*) em tabuleiros fixos. As águas foram coletadas nas comunidades Agrossolar, Cooperostra, Ilha da Casca, Itapitanguí, Mandira, Mosquiteiro, Pedrinhas, Pier, Retiro e Taquari, referenciados através do aparelho GPS (Global System

Position). Estes pontos foram escolhidos por caracterizarem a estação amostral e devido à proximidade dos tabuleiros de engorda (figura 6). As análises das variáveis ambientais temperatura (°C), pH, salinidade e oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) foram obtidos na própria área da coleta com o auxílio do equipamento de medição Multiparâmetro YSI-63.

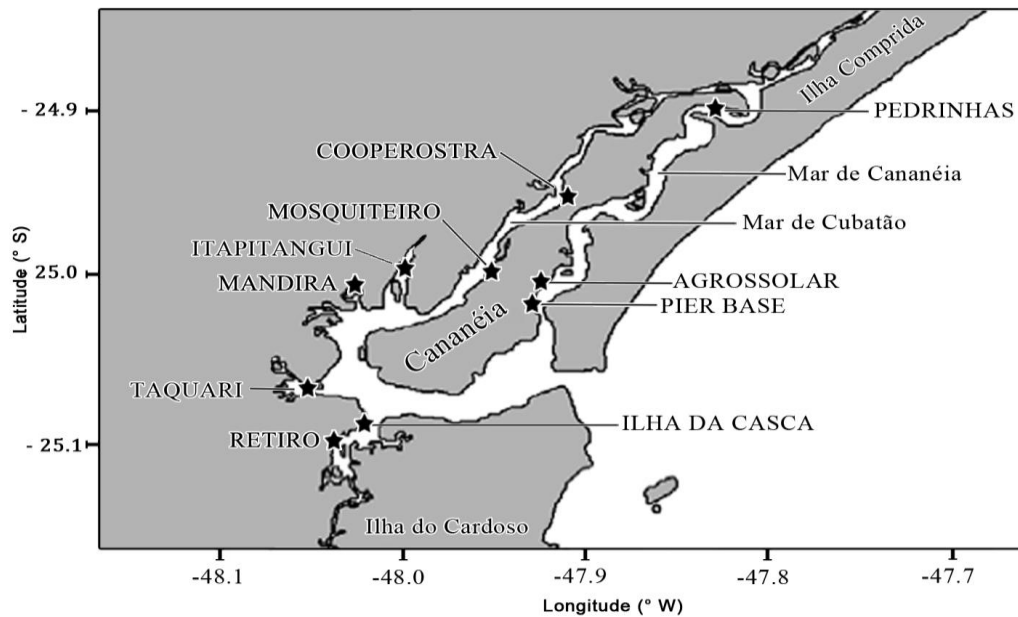


Figura 6: Localidades onde foram coletadas as águas para análise microbiológica em Cananéia, SP (10 pontos de coleta).

As amostras de água foram coletadas manualmente, em contra corrente na profundidade de 15 a 30 cm, utilizando-se frascos de vidro neutro de borossilicato. A seguir foram armazenadas em caixa isotérmica refrigerada para transporte e analisadas dentro de um período máximo de 6 horas a partir da amostragem em campo.

Nos mesmos períodos das coletas das águas, as ostras foram adquiridas antes de passar pelo processo de depuração, na Cooperativa dos Produtores de Ostras de Cananéia (Cooperostra) que consiste em uma cooperativa comunitária que possibilitou a organização da comercialização das ostras da região (GARCIA, 2005),

A análise da água e do tecido mole da ostra foi realizada no laboratório do Consaúde - Núcleo Regional de Registro, situado a 50 km de Cananéia. No laboratório, as amostras foram submetidas à análise para a determinação do NMP (Número Mais Provável) de Coliformes Totais (Ct) e Termotolerantes (CT), baseado na Técnica dos Tubos Múltiplos e seguindo a metodologia descrita pelo Standard Methods for the examination of water and wastewater (APHA, 2005).

A água foi diluída em água tamponada de proporção 1:9, obtendo diluições decimais seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} (realizada em duplicadas). 20 g do tecido mole da ostra recolhido em condições assépticas em recipiente estéril e homogeneizados em 180 mL de água tamponada. As amostras foram diluídas conforme APHA (2005) contendo Caldo Lauryl Sulfato de Sódio. Os tubos contendo amostra da água como da ostra foram incubados em estufa a 35°C por 24 – 48 h. Os tubos que apresentaram produção de gás nos tubos de Durham e ou acidificados (coloração amarelada) foram considerados positivos.

Para confirmação de coliformes totais, os tubos que foram considerados positivos no teste anterior, foram repicados em Caldo Verde Bile Brilhante (2%) incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48h. Para coliformes termotolerantes, as amostras foram repicadas e incubadas em EC (meio específico para *Escherichia coli*, utilizado como indicador de bactéria entérica patogênica) por um intervalo de 18 a 24h a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Após este período, foram considerados positivos os tubos que apresentaram produção de gás. O resultado das densidades de coliformes totais e termotolerantes nas águas foram expressos em Número Mais Provável por 100 mL (NMP 100mL^{-1}) e NMP g^{-1} para o tecido da ostra.

Fez-se o teste estatístico Shapiro-Wilk no qual mostrou que a distribuição dos dados não se ajustou à normalidade. A distribuição não sendo normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW-H) para comparação do nível de contaminação nos diferentes pontos de coleta e para os dados do tecido da ostra analisados, tanto mensalmente

quanto sazonalmente. O teste Correlação Linear de Spearman verificou a existência de correlação entre os coliformes na água e no tecido da ostra (ZAR, 1999).

Resultados e Discussão

A temperatura da água mensurada neste trabalho variou de 17 e 29°C (média de 22,85 °C), apresentando característica de regiões subtropicais. A salinidade variou entre 0,5 e 27,8, o pH entre 5,89 e 8,26 (média 7,23) e o oxigênio dissolvido teve média de 5,82 mg L⁻¹. A média geométrica geral de coliformes totais foi de 54,48 e a de termotolerantes de 24,67 NMP 100mL⁻¹.

As águas da região de Cananéia podem ser classificadas como salobra segundo a resolução CONAMA nº 357/2005, por apresentarem salinidade de 0,5 a 30. Esta resolução normatiza para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, pH entre 6,5 e 8,5, oxigênio dissolvido (OD) sendo maior que 5 mg L⁻¹ e a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mililitros, além disso o percentil de 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mililitros. Os dados ambientais coletados neste trabalho apresentaram valores dentro dos parâmetros definidos por esta resolução para águas salobras de classe 1, destinados à conservação ambiental e aqüicultura.

Os NMP de coliformes totais e termotolerantes da água variaram de 2 a 1.600 NMP 100mL⁻¹ nas diferentes áreas de engorda e extração. Mosquiteiro, Pier, Itapitangui e Taquari foram as áreas que apresentaram as maiores médias geométricas de coliformes totais, mas somente Mosquiteiro e Pier apresentaram médias elevadas nos termotolerantes (tabela 3). Apesar de Pier não ser uma área em que se extraíam ostras, foi utilizado como referência (controle) de localidade com contaminação microbiológica.

Tabela 3: Média geométrica em NMP 100mL⁻¹ dos coliformes totais (Ct) e termotolerantes (CT) das localidades analisadas, seu desvio padrão geométrica (DP) e percentagem abaixo de 88 NMP 100mL⁻¹.

	C. total	DP(geom.)	%	C. termot.	DP(geom.)	%
Cooperostra	47,26	4,82	64,29	25,28	4,60	74,07
Mosquiteiro	186,08	3,98	14,29	116,84*	5,66	33,33
Itapitangui	155,95	4,51	27,27	38,20	4,76	80,00
Mandira	17,92	2,88	83,33	9,34	3,32	90,91**
Pedrinhas	11,54	2,59	100,00	5,17	2,43	100,00**
Agrossolar	38,72	5,53	78,57	19,37	7,03	84,62
Pier	331,54	4,11	16,67	125,18*	5,55	52,94
Taquari	100,13	4,26	54,55	26,78	4,90	78,57
Retiro	23,27	3,11	83,33	11,36	3,01	100,00**
I.Casca	17,49	2,60	92,31	11,50	2,30	100,00**

* Estão acima dos limites permitidos pela legislação CONAMA 357/2005.

** Percentual dentro do limite da legislação vigente.

Valores elevados de coliformes encontrados nestas áreas podem estar sofrendo influência da proximidade da cidade com despejo de efluentes, considerado a principal causa da contaminação das águas. A média geométrica geral dos termotolerantes apresentou-se dentro do limite estabelecido, mas somente 78,10% estavam abaixo do critério estipulado em relação ao percentil, indicando contaminações acima do permitido.

As áreas com menores médias colimétricas foram Ilha da Casca, Mandira, Retiro e Pedrinhas. Estas áreas apresentaram valores de coliformes entre 2 e 130 NMP 100mL⁻¹ de totais e de termotolerantes entre 2 e 170 NMP 100mL⁻¹, apresentando pouca variação na amplitude entre os dados coletados. Verificou-se diferença estatística significativa entre as localidades analisadas entre os valores de coliformes totais (KW-H = 48,65 e p<0,0001) e entre os valores de termotolerantes (KW-H = 38,68 e p<0,0001). Observou-se diferença estatística entre o nível de contaminação da área mais contaminada (Pier, Mosquiteiro, Itapitangui e Taquari) com as localidades menos contaminadas (Pedrinhas e Ilha da Casca) (figura 7).

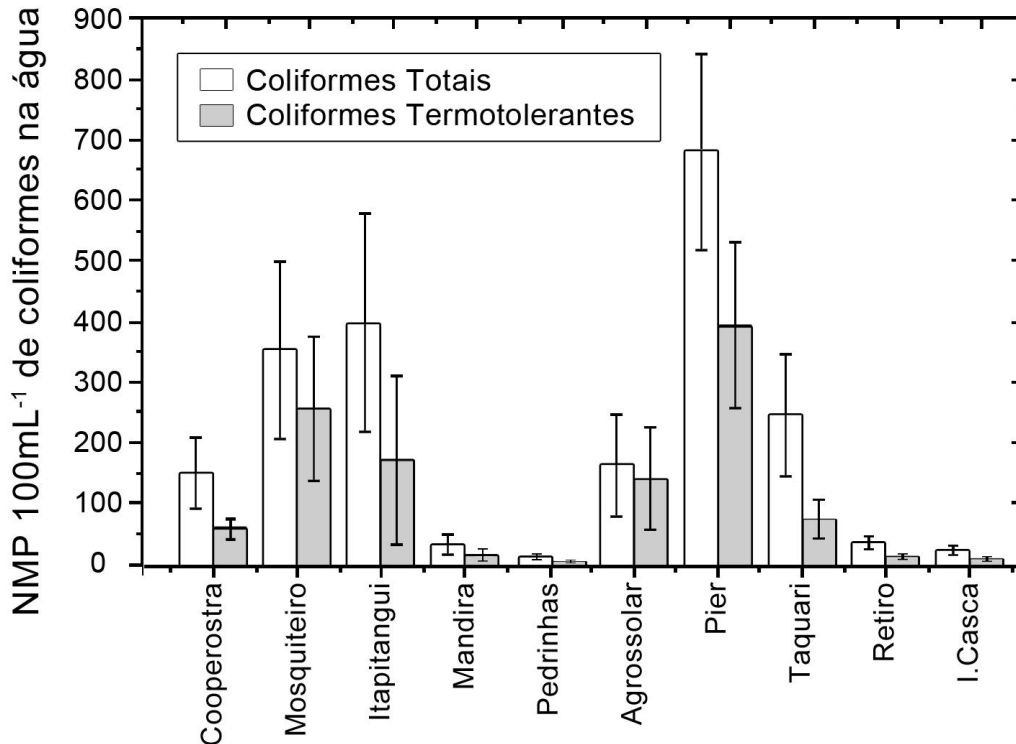


Figura 7: Médias dos coliformes totais e termotolerantes (NMP 100mL⁻¹) em suas respectivas localidades. As barras apresentam os seus respectivos desvios padrões.

RAMOS *et al.* (2010) analisaram amostras de água e de ostras quanto à quantidade de coliformes em alguns pontos da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, constatando que houve diferença significativa entre os pontos de coleta, com valores mais elevados em uma região que não permite uma circulação eficiente das águas, o que dificulta a diluição dos dejetos (quando ocorrem os despejos).

A contagem de coliformes totais no tecido da ostra variou de 0,43 a 240 NMP g⁻¹ e dos termotolerantes de 0,24 a 240 NMP g⁻¹, sendo os valores médios de 18,78 NMP g⁻¹ e 15,53 NMP g⁻¹, respectivamente. A resolução vigente Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001, especifica somente presença de estafilococos coagulante positiva e de *Salmonella sp* (presença ou ausência) em moluscos “in natura” resfriados ou congelados não consumidos crus, mas não oferece critérios para as densidades de coliformes (ANVISA, 2001).

O Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB, 2011) determinou requisitos mínimos necessários para garantir a inocuidade e qualidade dos moluscos bivalves produzidos no Brasil destinados ao consumo humano, por meio da estimativa da densidade média de coliformes termotolerantes (em NMP 100g⁻¹). O critério utilizado considera os seguintes valores de coliformes termotolerantes: liberada para consumo <300NMP 100g⁻¹, liberada sob condição (submeter ao processo de depuração) ≥300 e ≤6.000 NMP 100g⁻¹ e suspensa quando verificada >6.000NMP 100g⁻¹. Baseado nos critérios deste Programa, as ostras analisadas apresentam-se “liberados sob condição”, sendo necessário passar pelo processo de depuração para retirada das impurezas contidas no seu interior, antes de serem liberados para consumo.

Existem padrões internacionais para determinar limites de contaminações microbiológicas pelos valores de coliformes termotolerantes em tecidos moles das ostras cruas. The European Union Shellfish Quality Assurance Programme - EUSQAP (RODGERS, 2001) estabeleceu os valores de coliformes termotolerantes não excedam 6.000 NMP 100g⁻¹. Codex Alimentarius (CODEX, 2008) determina que o limite de *Escherichia coli* seja menor que 230 NMP g⁻¹. Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986) limita em 16NMP g⁻¹ dos coliformes termotolerantes nos bivalves frescos e congelados. Comparando os dados coletados neste trabalho com as normas internacionais, verificou-se que os coliformes nas ostras foram menores do que as recomendadas, apresentando-se em condições microbiológicas satisfatórias.

Apesar do mês de abril ter apresentado elevados valores de coliformes nas ostras (média 88,8 NMP g⁻¹), não foram observadas diferenças significativas entre as médias de coliformes totais (KW-H = 11,90 e p=0,37) e de termotolerantes (KW-H = 14,60 e p=0,20) em relação à análise mensal. O mês de novembro foi o que apresentou a menor média colimétrica, tanto para totais (1,5 NMP g⁻¹) como dos termotolerantes (1,23 NMP g⁻¹) (figura 8).

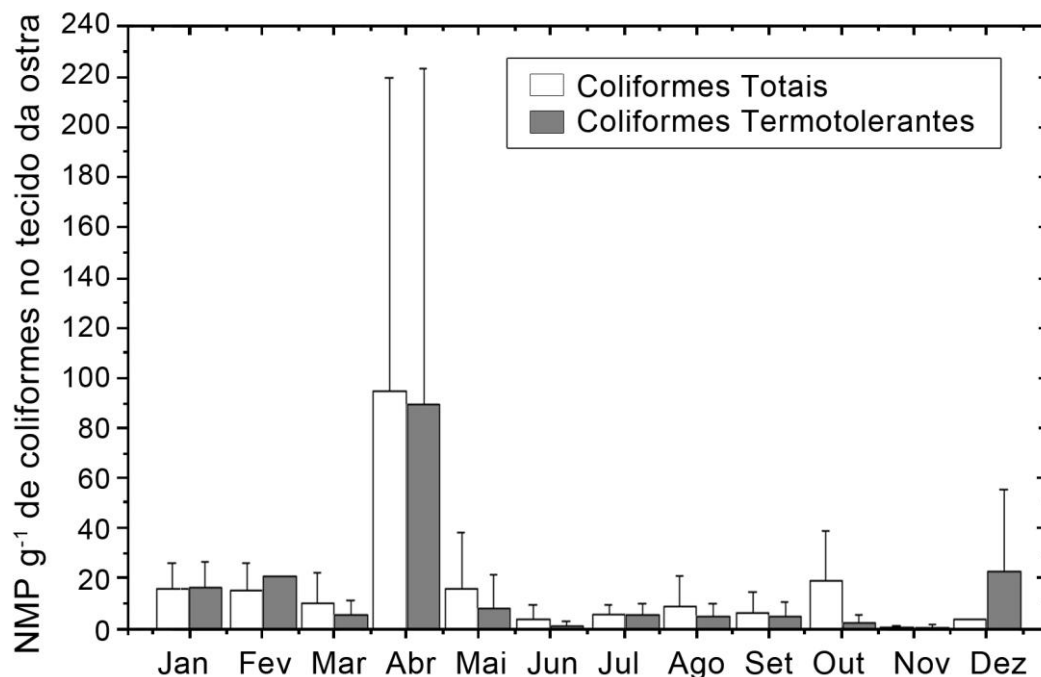


Figura 8: Médias dos coliformes totais e termotolerantes nos tecidos das ostras (NMP g⁻¹) analisados mensalmente. As barras apresentam os seus respectivos desvios padrões.

Verificou-se que as densidades de coliformes termotolerantes detectados neste trabalho estavam dentro do limite estabelecido pelas instituições citadas anteriormente, constatou-se que em alguns períodos do ano, os níveis dessas bactérias foram bem elevados. A densidade de microrganismos nos bivalves filtradores indica o nível de contaminação do momento da coleta, variando de um animal para outro e também depende de condições ambientais, meteorológicas e da atividade geral do organismo (HUSS *et al.*, 2000; KOLM e ANDRETTA, 2003; MILL *et al.*, 2006).

As densidades de coliformes encontradas nas ostras foram menores em relação às encontradas na água, corroborando com o estudo de VIEIRA *et al.* (2007) e SANDE *et al.* (2010), que indicaram uma maior contaminação na água do que no molusco. Diferentes resultados foram observados no trabalho de MOREIRA *et al.* (2011) realizado em Paraty (RJ), no qual descreveram que a densidade das bactérias fecais foram mais altas nos moluscos do que na água.

As águas analisadas apresentaram níveis de coliformes elevados no verão ($C_t = 213,55$ e $CT = 57,83 \text{ NMP } 100\text{mL}^{-1}$), divergindo da densidade no tecido das ostras, no qual verificou-se elevados níveis no outono ($C_t = 41,70$ e $CT = 34,08 \text{ NMP g}^{-1}$) em relação ao verão ($C_t = 13,07$ e $CT = 15,12 \text{ NMP g}^{-1}$) (figura 4). Não foi observada diferença estatística nas médias de contaminação no tecido da ostra relacionado à sazonalidade (C_t : KW-H = 3,90 e $p=0,27$, CT : KW-H = 4,49 e $p = 0,21$).

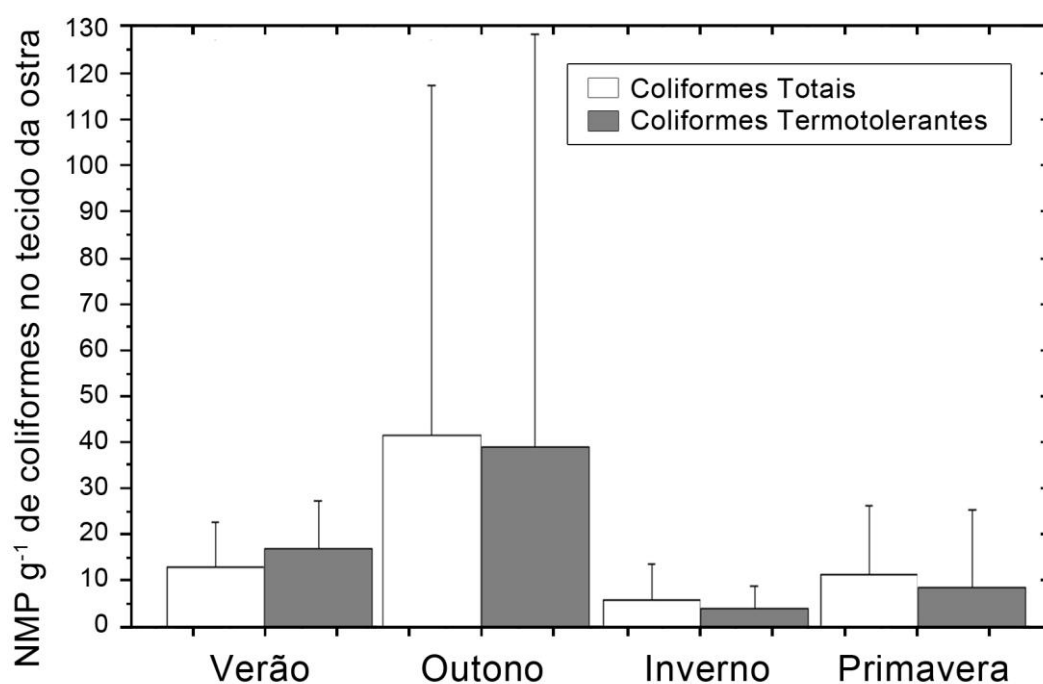


Figura 9: Valores médios dos coliformes totais e termotolerantes no tecido da ostra (NMP g^{-1}) por estação do ano. As barras apresentam os seus respectivos desvios padrões.

Como as ostras são filtradores e possuem características bioacumuladores, as partículas microbiológicas encontradas na água ficaram retidas dentro do organismo, elevando o nível de contaminação (figura 9). Resultados semelhantes foram observados em KOLM e ABSHER (2008) realizado no complexo estuarino de Paranaguá (PR), no qual verificaram que no verão a densidade de coliformes no tecido das ostras foi elevada em relação à água. FARIAS *et al.*

(2010) e RAMOS *et al.* (2010) verificaram que os valores de NMP nas amostras de água e o organismo foram mais elevados, principalmente na estação chuvosa.

Neste trabalho constatou-se correlação positiva entre os valores de coliformes totais (Spearman $r=0,89$, $p<0,001$) e termotolerantes (Spearman $r=0,93$, $p<0,001$) nas águas em relação às ostras (figura 10 e 11). O monitoramento contínuo da qualidade microbiológica da água onde estes organismos são cultivados é necessária, pois estas representam as condições higiênico-sanitárias dos organismos que habitam a região. Resultados divergentes foram descritos por VIEIRA *et al.* (2008), em que verificaram que a contaminação na água no estuário do Rio Pacoti - CE foi maior que nos bivalves, mas não observaram correlação entre eles.

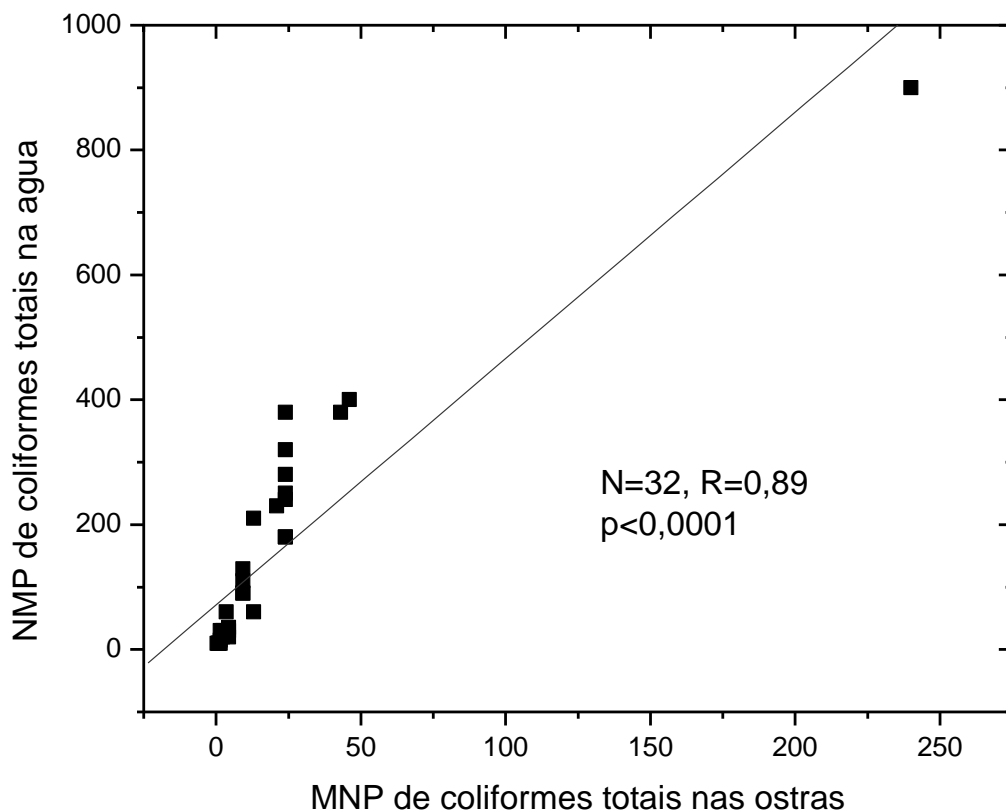


Figura 10: Regressão linear entre os NMP de coliforme totais na água e no tecido da ostra (n=24).

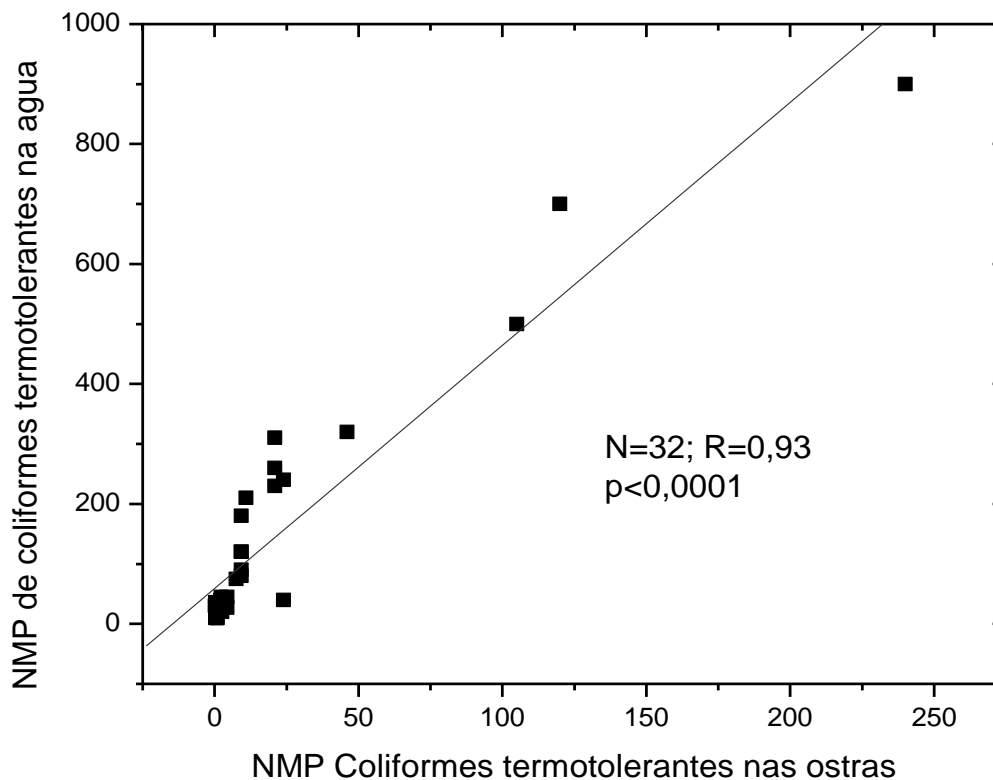


Figura 11: Regressão linear entre os NMP de coliforme termotolerantes na água e no tecido da ostra (n=24).

Os parâmetros de segurança estabelecidos pelas legislações para produção de bivalves baseiam-se apenas na determinação de coliformes na água, não sendo suficientes para garantir a qualidade microbiológica dos organismos. Além dos coliformes, análise de contaminação por estreptococos estão sendo utilizados, segundo a CETESB (2012), como um indicador adicional de análise de contaminação fecal das águas, por ter característica mais resistente às águas marinhas. MARTINEZ e OLIVEIRA (2010) descreveram a importância da análise dos enterococos além dos coliformes, pois eles foram detectados em densidades mais elevadas do que os termotolerantes, tanto na água como nos moluscos. Quando a análise deste organismo combinada com os coliformes, o resultado apresenta maior confiabilidade em relação à contaminação fecal.

Conclusões

1. Apesar do valor médio geral de termotolerantes estar dentro do critério da legislação vigente, algumas localidades apresentaram elevadas densidades de coliformes. Entre os dados coletados, somente 78,10% estavam abaixo do estabelecido, indicando que a água estava fora do limite citado pelo CONAMA.

2. Análise do tecido das ostras apresentaram valores médios inferiores às resoluções nacionais e internacionais, mas em algumas épocas do ano, detectou-se elevados dados de termotolerantes, sendo necessário passar pelo processo de depuração.

3. As maiores médias de coliformes foram constatadas no verão na água diferentemente no tecido da ostra, que foi em outono, causado por sua característica filtradora e bioacumulador de partículas em seu organismo.

4. Houve uma correlação forte das densidades de coliformes entre a água e o tecido da ostra, concluindo que a qualidade bacteriológica dos moluscos bivalves refletiu a qualidade da água analisada, resultado que comprovou nossa hipótese.

Agradecimentos

Agradecimento à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida para realização do programa de pós-graduação no Instituto de Pesca do Estado de São Paulo.

Ao CNPq pela bolsa de Produtividade de Edison Barbieri.

Referências

AMARAL, L.A.DOS; NADER, A.FILHO; ROSSI, O.D.JUNIOR; FERREIRA, F.L.A.; BARROS, L.S.S. 2003 Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Revista de Saúde Pública*. São Paulo, 37(4): 510-514.

ANVISA – AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2001 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. 68p.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2005 *Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group*. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC. 20th.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. 2012 *Qualidade das praias litorâneas no estado de São Paulo 2011*, São Paulo. 193 p.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. 2005 Resolução nº357, do dia 17 de março de 2005. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília.

CODEX – CODEX ALIMENTARIUS. 2008 *Standard for live and raw bivalve molluscus*. Codex Standard 292-2008: 1-7.

FARIAS, M.F.; ROCHA-BARRERA, C.A.; CARVALHO, F.C.T.; SILVA, C.M.; REIS, E.M.F.; COSTA, R.A.; VIEIRA, R.H.S. 2010 Condições microbiológicas de *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) (Mollusca: Bivalva: Solecurtidae) e da água no estuário do rio Ceará, em Fortaleza - CE. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 36(2): 135-142.

GARCIA, A.N. 2005 *Contaminação microbiológica na área de cultivo de moluscos bivalves de Anchieta (Espírito Santo, Brasil)*. Monografia – Oceanografia - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 68p.

HUSS, H.H.; REILLY, A.; EMBAREK, P.K.B. 2000 Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*, 11: 149-156.

ICMSF - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 1986 *Microorganismos in food. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. 2ed. Blackwell Scientific Publications, Toronto, 278p.

KOLM, H.E. e ANDRETTA, L. 2003 Bacterioplankton in different tides of the Perequê tidal creek, Pontal do Sul, Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 34: 97-103.

KOLM, H.E. e ABSHER, T.M. 2008 Bacterial density and coliform organisms in waters and oysters of Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 34(1): 49–59.

MACHADO, I.C.; KOGA, S.M.; WOIOECHOVSKY, E.; GELLI, D.S. 2000 Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário de Cananéia- SP, Brasil, com subsídio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue *Crassostrea brasiliiana*: avaliação da qualidade da água. *Higiene Alimentar*, São Paulo, 14(72): 66-75.

MARTINEZ, D.I. e OLIVEIRA, A.J.F.C.DE 2010 Faecal bacteria in *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) for biomonitoring coastal Waters and seafood quality. *Brazilian Journal of Oceanography*, São Paulo, 58: 29-35.

MENDES, E.S.; MENDES, P.P.; LOPES, C.A.deM.; COELHO, M.I.deS.; SOUZA, J.C.daR.; CRUZ, M.C.S.; ASSIS, A.S.de. 2004 Sazonalidade dos microrganismos em ostras consumidas na grande Recife, PE. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, 18(116): 79-87.

MILL, A.; SCHLACHER, T.; KAOULI, M. 2006 Tidal and longitudinal variation of faecal indicator bacteria in an estuarine creek in south-east Queensland, Austrália. *Marine Pollution Bulletin*, Austrália, 52(8): 881-891.

MIQUELANTE, F.A. e KOLM, H.E. 2011 Indicadores microbiológicos de poluição fecal na desembocadura da Gamboa Olho d'Água, Paraná: subsídio para o monitoramento da balneabilidade do Brasil. *UEPG Biology Health Science*. Ponta Grossa, 17(1): 21-35.

MOREIRA, A.S.; LEAO, M.V.P.; SANTOS, S.S.F.; JORGE, A.O.C.; SILVA, C.R.G. 2011 Qualidade sanitária da água e de bivalves *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818) na praia do Jabaquara, Paraty, RJ. *Revista Biociências, UNITAU*, São Paulo, 17(1): 66-71.

PEREIRA, O.M.; HENRIQUES, M.B.; MACHADO, I.C. 2003 Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* em bosques de mangue e proposta para a sua extração ordenada no estuário de Cananéia, SP, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 29(1): 19-28.

PEREIRA, M.A.; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R.V. 2006 Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianopolis – Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, Santa Catarina, 37(2): 159-163.

PNCMB - PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE HIGIÊNICO SANITÁRIO DE MOLUSCOS BIVALVES. 2011 *Estabelece os requisitos mínimos necessários para inocuidade e qualidade dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano, bem como monitorar e fiscalizar*. Instrução Normativa Interministerial, portaria 122, seção 1 do Diário Oficial da União, Brasil.

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. 2002 Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases*, Israel, 35(8): 921-928.

RAMOS, R.J.; PEREIRA, M.A.; MIOTTO, L.A.; FARIA, L.F.B.; SILVEIRA JUNIOR, N.; VIEIRA, C.R.W. 2010 Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impr.)*, São Paulo, 69(1): 29-37.

RISTORI, C.A.; IARIA, S.T.; GELLI, D.S.; RIVERA, I.N.G. 2007 Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. *International Journal of Environmental Health Research*, São Paulo, 17: 259-269.

RODGERS, C.J. 2001 *The NSW Shellfish Quality Assurance Program: an operational review*. Safe Food Production NSW, Sydney, 146 p.

SANDE, D.; MELO, T.A.; OLIVEIRA, G.S.A.; BARRETO, L.; TALBOLT, T.; BOEHS, G.; ANDRIOLI, J.B. 2010 Prospecção de moluscos bivalves no estudo da poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus, Bahia, Brasil. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, São Paulo, 47(3): 190-196.

SILVA, A.I.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENDES, F.G.R.; LIMA, L.N.G.C.; NASCIMENTO, S.M.M.; CARVALHO, F.C.T. 2003. Bactérias fecais em ostras, *Crassostrea rhizophorae*. *Arquivos de Ciências do Mar*, Fortaleza, 36: 63-66.

SILVA, M.P.; CAVALLI, D.R.; OLIVEIRA, T.C.R.M. 2006 Avaliação do Padrão de Coliformes a 45 °C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 26(2): 352 – 359.

TOURON, A.; BERTHE, T.; GARGALA, G.; FOURNIER, M.; RATAJCZAK, M.; SERVAIS, P.; PETIT, F. 2007 Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). *Marine Pollution Bulletin*, France, 54(9): 1441-1450.

UNESCO – UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION. 2005 *World Network of Biosphere Reserves – SC/EES – June 2005*. The MAB Program. 19p.

VIEIRA, R.H.S.F.; VASCONCELOS, R.F.; CARVALHO, E.M.R. 2007 Quantificação de vibrios, de coliformes totais e termotolerantes em ostra nativa *Crassostrea rhizophorae*, e na água do estuário do Rio Jaguaribe, Fortim-CE. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, Ceara, 1: 1-13.

VIEIRA, R.H.S.F.; ATAYDE, M.A.; CARVALHO, E.M.R.; CARVALHO, F.C.T.; FONTELES FILHO, A.A. 2008 Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do rio Pacoti (Eusébio, CE): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, Ceara, 45(3): 180-189.

ZANETTE, J.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. 2006 Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(2): 187-195.

ZAR, J.H. 1999 *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice-Hall. 4 ed.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O monitoramento periódico da qualidade microbiológica da água e a observação das medidas da sanidade dos moluscos bivalves são fatores importantes para a prevenção de doenças e veiculação hídrica, considerando-se que o consumo de produtos contaminados constitui-se em surgimentos de inúmeros casos de intoxicação por doenças transmitidas por alimentos.

Apesar de a média geral estar dentro dos critérios descritos pelo CONAMA 357/2005, densidades elevadas de coliformes termotolerantes na água foram coletados em alguns pontos analisados. Comparando com os dados coletados nos tecidos das ostras verificou-se que os valores foram maiores na água do que nas ostras. Pelas legislações vigentes relacionados com o tecido da ostra constatou-se que estavam dentro do limite de liberação somente após passar pelo processo de depuração.

Analisando as variações ambientais como a pluviosidade, salinidade e maré com as densidades de coliformes verificaram-se que estas forças podem influenciar nas contagens de microrganismos. A densidade colimétrica foi maior no verão na água e na ostra verificou-se no outono, podendo ser explicado pela característica filtradora e bioacumuladora dos bivalves.

Apesar de este trabalho analisar somente a densidade dos coliformes, trabalhos como de Martinez e Oliveira (2010) citam a importância de repensar nos parâmetros de segurança legais, tanto para os organismos aquáticos como o uso da água para recreação, pois o CONAMA 357 (2005) baseia-se somente na densidade de coliformes, não sendo suficiente para garantir a qualidade do pescado.

Embora exista o parâmetro microbiológico nas legislações atuais, importante verificar os padrões adequados para determinar a qualidade microbiológica da água e dos organismos aquáticos, pois há a necessidade de acompanhamento contínuo de contaminação destes recursos. A combinação da análise dos coliformes com enterococos podem apresentar resultados com maior confiabilidade em relação à contaminação fecal, devendo ser tema de pesquisas futuras.

Referências bibliográficas

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. 2005 Resolução nº357, do dia 17 de março de 2005. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providencias.* Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília.

MARTINEZ, D.I. e OLIVEIRA, A.J.F.C.DE 2010 Faecal bacteria in *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) for biomonitoring coastal Waters and seafood quality. *Brazilian Journal of Oceanography*, São Paulo, 58: 29-35.

APÊNDICE

ANEXO 1

ANVISA - Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (PARCIAL)

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária no uso da atribuição que lhe confere o art. 11, inciso IV, do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3029, de 16 de abril de 1999, em reunião realizada em 20 de dezembro de 2000.

INTRODUÇÃO

Os princípios gerais a serem aplicados para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos têm justificativa no que se refere aos problemas de saúde pública e na necessidade de uniformizar os padrões para o comércio entre os países.

Por esta razão, organismos internacionais como FAO (Food Agricultural Organization), OMS (Organização Mundial da Saúde) tem demonstrado preocupação crescente sobre este tema. O CODEX ALIMENTARIUS tem editado continuamente documentação normativa que regulamenta este tema e o I.C.M.S.F. (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) tem publicado embasamento técnico e tem colaborado com as atividades do CODEX ALIMENTARIUS.

Considerando que os países que integram o MERCOSUL também integram e participam ativamente na elaboração dos documentos do CODEX ALIMENTARIUS e do I.C.M.S.F., estes últimos poderão ser considerados como referências.

REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE OS PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA ALIMENTOS

1. ALCANCE

1.1 OBJETIVO:

Estabelecer os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos especificados no Anexo I e determinar os critérios para a Conclusão e

Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano especificados no Anexo II.

1.2 ÂMBITO DE APLICAÇÃO

Este Regulamento se aplica aos alimentos destinados ao consumo humano. Excluem-se deste Regulamento os produtos alimentícios e as toxinas de origem microbiana, como as micotoxinas, para os quais existem padrões definidos em legislação específica.

Excluem-se também matérias-primas alimentares e os produtos semi-elaborados, destinados ao processamento industrial desde que identificados com os seguintes dizeres: "inadequados para o consumo humano na forma como se apresentam" ou "não destinados para o consumo humano na forma como se apresentam".

2. CRITÉRIOS PARA O ESTABELECIMENTO DE PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS EM ALIMENTOS.

Os critérios para estabelecimento de padrão microbiológico podem ser considerados isoladamente ou em conjunto conforme a seguir:

2.1. Caracterização dos microrganismos e ou suas toxinas considerados de interesse sanitário.

2.2. Classificação dos alimentos segundo o risco epidemiológico.

2.3. Métodos de análise que permitam a determinação dos microrganismos

2.4. Plano de Amostragem para a determinação do número e tamanho de unidades de amostras a serem analisadas.

2.5. Normas e padrões de organismos internacionalmente reconhecidos, Codex Alimentarius e outros organismos.

5. PROCEDIMENTOS E INSTRUÇÕES GERAIS

5.8. Planos de amostragem

5.8.1. Para fins de aplicação de plano de amostragem entende-se:

a) m: é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável.

b) M: é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis

c) n: é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Nos casos nos quais o padrão estabelecido é ausência em 25g, como para *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* e outros patógenos, é possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral, respeitando-se a proporção p/v (uma parte em peso da amostra, para 10 partes em volume do meio de cultura em caldo).

d) c: é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes). Nos casos em que o padrão microbiológico seja expresso por "ausência", c é igual a zero, aplica-se o plano de duas classes.

5.8.2. Tipos de plano

a) Duas classes: quando a unidade amostral a ser analisada pode ser classificada como aceitável ou inaceitável, em função do limite designado por M, aplicável para limites qualitativos.

b) Três classes: quando a unidade amostral a ser analisada pode ser classificada como aceitável, qualidade intermediária aceitável ou inaceitável, em função dos limites m e M. Além de um número máximo aceitável de unidades de amostra com contagem entre os limites m e M, designado por c. As demais unidades, n menos c, devem apresentar valores menores ou iguais a m. Nenhuma das unidades n pode apresentar valores superiores ao M.

PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA ALIMENTOS

1. A tolerância é máxima e os padrões são mínimos para os diferentes grupos de produtos alimentícios, constantes no presente anexo, para fins de registro e fiscalização de produtos alimentícios. Estes limites e critérios podem ser complementados quando do estabelecimento de programas de vigilância e rastreamento de microrganismos patogênicos e de qualidade higiênica e sanitária de produtos

2. No caso de análise de produtos não caracterizados nas tabelas especificadas neste Anexo, considera-se a similaridade da natureza e do processamento do produto, como base para seu enquadramento nos padrões estabelecidos para um produto similar, constante no referido Anexo I deste Regulamento.

ANEXO I

Os limites e tolerâncias para as diferentes classes de produtos alimentícios constantes deste Regulamento devem obedecer os critérios e padrões especificados neste Anexo, nas condições previstas para sua aplicação, conforme consta dos Procedimentos Gerais. Os critérios e respectivos limites são como segue:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICRORGANISMO	Tolerância para amostra INDICATIVA	Tolerância para amostra Representativa			
			n	c	m	M
7. PESCADOS E PRODUTOS DE PESCA						
a) pescado, ovas de peixes, crustáceos e moluscos cefalópodes "in natura", resfriados ou congelados não consumido cru;	Estaf.coag.positiva/g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
moluscos bivalves "in natura", resfriados ou congelados não consumido cru; carne de rãs "in natura", refrigerada ou congelada	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
b) moluscos bivalves, carne de siri e similares cozidos, temperados e não resfriados ou congelados	Coliformes a 45°C/g	5x10	5	2	10	5x10
	Estaf.coag.positiva/g	10 ³	5	2	10 ²	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
c) pescados, moluscos e crustáceos secos e ou salgados; semi conservas de pescados, moluscos e crustáceos, mantidas sob refrigeração (marinados, anchovados ou temperados)	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	3	10	10 ²
	Estaf.coag.positiva/g	5x10 ²	5	2	10 ²	5x10 ²
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
d) pescado defumado, moluscos e crustáceos, refrigerados ou congelados; produtos derivados de pescado (surimi e similares), refrigerados ou congelados	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	2	10	10 ²
	Estaf.coag.positiva/g	5x10 ²	5	2	10 ²	5x10 ²
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
e) produtos à base de pescado refrigerados ou congelados (hamburgueres e similares)	Coliformes a 45°C/g	10 ³	5	3	10 ²	10 ³
	Estaf.coag.positiva/g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
f) ovas de pescados processadas, refrigeradas ou congeladas	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	3	10	10 ²
	Estaf.coag.positiva/g	5x10 ²	5	2	10 ²	5x10 ²
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
g) pescados pré cozidos,	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	2	10	10 ²

empanados ou não, refrigerados ou congelados	Estaf.coag.positiva/g	5x10 ²	5	2	10 ²	5x10 ²
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-

20. ALIMENTOS EMBALADOS E CONGELADOS, EXCEÇÃO DE SOBREMESAS

a) alimentos parcialmente preparados (massas alimentícias cruas com ou sem recheio, pratos crus à base de carnes, vegetais, pescados, cereais, etc.)	Coliformes a 45°C/g	5x10 ²	5	2	10 ²	5x10 ²
	Estaf.coag.positiva/g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	B.cereus/g (específico para produtos à base de cereais ou amidos)	5x10 ³	5	2	2x10 ²	5x10 ³
	C.sulf.redutor a 460C/g (específico para produtos à base de carnes)	3x10 ²	5	2	2x10 ²	3x10 ²
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
b) pães, pizzas e outras massas parcialmente preparadas, condimentadas ou não, adicionada de outros ingredientes ou não e similares, incluindo os pães de queijo	Coliformes a 45°C/g	5x10 ²	5	2	10 ²	5x10 ²
	Estaf.coag.positiva/g	5x10 ³	5	2	10 ³	5x10 ³
	B. cereus/g	5x10 ³	5	2	10 ³	5x10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
c) alimentos preparados, que necessitam de descongelamento e aquecimento, mas não de cocção, segundo instruções da rotulagem	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	2	5x10	10 ²
	Estaf.coag.positiva/g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	B.cereus/g (específico para produtos à base de cereais ou amidos)	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	C.sulf.redutor a 460C/g (específico para produtos à base de carnes)	5x10 ²	5	2	2x10 ²	5x10 ²
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-

22. PRATOS PRONTOS PARA O CONSUMO (ALIMENTOS PRONTOS DE COZINHAS, RESTAURANTES E SIMILARES)

a) a base de carnes, pescados, ovos e similares cozidos	Coliformes a 45°C/g	2x10	5	2	10	2x10
	Estaf.coag.positiva/g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	B.cereus/g (específico para produtos à base de cereais ou amidos)	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	C.sulf.redutor a 460C/g (específico para produtos à base de carnes)	10 ³	5	2	2x10 ²	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
b) a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru,	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	2	10	10 ²
	Estaf.coag.positiva/g	5x10 ³	5	3	10 ²	5x10 ³

carpaccio, sushi, sashimi, etc.)	V.parahaemolyticus(e específico para produtos à base de pescados)	10 ³	5	2	10 ²	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-
c) sopas, caldos e molhos cozidos	Coliformes a 45°C/g	10	5	2	1	10
	Estaf.coag.positiva/g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	B. cereus/g	10 ³	5	2	2x10 ²	10 ³
	C.sulf.redutor a 460C/g (específico para produtos à base de carnes)	10 ³	5	2	10 ²	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausente	5	0	Ausente	-

ANEXO II

CONCLUSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ALIMENTOS DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO

1. Interpretação dos resultados:

Para interpretação dos resultados, compara-se os valores encontrados nas análises realizadas com os valores estabelecidos no Anexo I. De acordo com essa comparação, temos:

1.1. Produtos em condições sanitárias satisfatórias

São aqueles cujos resultados analíticos estão abaixo ou igual aos estabelecidos para amostra indicativa ou amostra representativa, conforme especificado no Anexo I do presente Regulamento.

1.2. Produtos em condições sanitárias insatisfatórias

1.2.1.São aqueles cujos resultados analíticos estão acima dos limites estabelecidos para amostra indicativa ou amostra representativa, conforme especificado no Anexo I do presente Regulamento.

1.2.2.São aqueles cujos resultados analíticos demonstram a presença ou a quantificação de outros microrganismos patogênicos ou toxinas que representem risco à saúde do consumidor.

2.Conclusão

2.1. "PRODUTO OU LOTE (se amostra indicativa ou representativa, respectivamente) DE ACORDO COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES" para as situações enquadradas no item 1.1 do Anexo II deste Regulamento.

2.2."PRODUTO OU LOTE (se amostra indicativa ou representativa, respectivamente) IMPRÓPRIO PARA O CONSUMO HUMANO POR APRESENTAR ..." (citar o(s) resultado(s) analítico(s) e o(s) parâmetro(s) não atendido(s) do Anexo I) para as situações enquadradas no item 1.2.1. do Anexo II deste Regulamento.

2.3."PRODUTO OU LOTE (se amostra indicativa ou representativa, respectivamente) IMPRÓPRIO PARA O CONSUMO HUMANO POR APRESENTAR(microrganismo patogênico ou toxina que representa perigo severo a saúde do consumidor).

ANEXO 2

PNCMB – PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE HIGIÊNICO-SANITARIO DE MOLUSCOS BIVALVES (PARCIAL)

Considerando a necessidade de monitoramento de microorganismos contaminantes e de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves, como medida de prevenção de efeitos nocivos à saúde do consumidor, e com a finalidade de garantir padrões mínimos de qualidade;

Considerando a necessidade de estabelecer requisitos de inspeção industrial e sanitária dos estabelecimentos de processamento de moluscos bivalves, como medida de prevenção de efeitos nocivos à saúde do consumidor, e com a finalidade de garantir padrões mínimos de qualidade, resolve:

Art. 1º Instituir o Programa Nacional de Controle Higiênico- Sanitário de Moluscos Bivalves - PNCMB, com a finalidade de estabelecer os requisitos mínimos necessários para a garantia da inocuidade e qualidade dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano, bem como monitorar e fiscalizar o atendimento destes requisitos.

DEFINIÇÕES

Art. 3º Para os fins do PNCMB, entende-se por:

III - *Escherichia coli*: bacilos gram-negativos, oxidase-negativos, caracterizados pela atividade da enzima β -galactosidase; podem crescer em meios contendo agentes tensoativos e fermentam a lactose nas temperaturas de 44º-45ºC, com produção de ácido, gás e aldeído; têm seu habitat quase que exclusivamente limitado ao trato intestinal de seres humanos e animais de sangue quente, sendo assim selecionado como indicador para contaminação de origem fecal;

Art. 4º O Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) será estruturado conforme os seguintes anexos:

I - Anexo I: Monitoramento e Controle de micro-organismos contaminantes e biotoxinas marinhas em moluscos bivalves;

ANEXO I

CAPÍTULO I

DO MONITORAMENTO DE MICRORGANISMOS CONTAMINANTES EM MOLUSCOS BIVALVES

Art. 2º O monitoramento de microrganismos contaminantes em moluscos bivalves será estabelecido por meio da estimativa da densidade média de coliformes termotolerantes em 100 gramas da parte comestível dos moluscos bivalves (NMP/100g), utilizando-se metodologia oficial tecnicamente amparada.

§ 1º A estimativa de *Escherichia coli* poderá ser utilizada em substituição à estimativa de coliformes termotolerantes.

CAPÍTULO III

DO CONTROLE DA RETIRADA DE MOLUSCOS BIVALVES

Art. 4º Os resultados do monitoramento de microrganismos contaminantes e de biotoxinas produzidas por microalgas marinhas serão utilizados para a definição da retirada de moluscos bivalves.

Art. 5º A retirada de moluscos bivalves destinados ao consumo humano será definida como:

- I - liberada;
- II - liberada sob condição; ou
- III - suspensa.

Art. 6º Para a definição de retirada de moluscos bivalves serão considerados os seguintes valores

Critério para retirada liberada de moluscos bivalves						
NMP para coliformes termotolerantes e <i>E.coli</i> em 100g da parte comestível dos moluscos bivalves		Limites de Biotoxinas produzidas por microalgas em 1 quilograma (Kg) da parte comestível dos moluscos bivalves				
Coliformes termotolerantes	<i>E.coli</i>	PSP	DSP	DSP	ASP	AZP
< 300	< 230	<0,8mg (STX)	<0,16mg (AO)	<1mg (YTX)	<20mg (DA)	<0,16mg (AZA)

Critério para retirada liberada sob condição de moluscos bivalves						
NMP para coliformes termotolerantes e <i>E.coli</i> em 100g da parte comestível dos moluscos bivalves		Limites de Biotoxinas produzidas por microalgas em 1 quilograma (Kg) da parte comestível dos moluscos bivalves				
Coliformes	<i>E.coli</i>	PSP	DSP	DSP	ASP	AZP

termotolerantes						
300 a 6.000 NMP	230 a 4.600 NMP	<0,8mg (STX)	<0,16mg (AO)	1mg (YTX)	<20mg (DA)	<0,16mg (AZA)

Critério para retirada suspensa de moluscos bivalves

NMP para coliformes termotolerantes e <i>E.coli</i> em 100g da parte comestível dos moluscos bivalves		Limites de Biotoxinas produzidas por microalgas em 1 quilograma (Kg) da parte comestível dos moluscos bivalves				
Coliformes termotolerantes	<i>E.coli</i>	PSP	DSP	DSP	ASP	AZP
> 6.000	> 4.600	≥ 0,8mg (STX)	≥ 0,16mg (AO)	≥ 1mg (YTX)	≥ 20mg (DA)	≥0,16mg (AZA)

(PSP - Paralytic Shellfish Poisoning (Intoxicação paralisante); DSP - Diarrhoeic Shellfish Poisoning (Intoxicação diarreica); ASP - Amnesic Shellfish Poisoning (Intoxicação amnésica); NSP - Neurologic Shellfish Poisoning (Intoxicação neurológica); AZP - Azaspiracid Shellfish Poisoning (Intoxicação por consumo de azaspirácidos); STX - saxitoxina; AO - ácido ocadaico; DTX – dinofisistoxinas; YTX – yessotoxinas; DA - ácido domóico; BTX – brevetoxinas; AZA – azaspirácidos.)

ANEXO 3

RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005 (PARCIAL)

Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

CAPITULO I

Das Definições

Art. 2o Para efeito desta Resolução são adotadas as seguintes definições:

I - águas doces: águas com salinidade igual ou inferior a 0,5 ‰;

II - águas salobras: águas com salinidade superior a 0,5 ‰ e inferior a 30 ‰;

III - águas salinas: águas com salinidade igual ou superior a 30 ‰;

VI - aqüicultura: o cultivo ou a criação de organismos cujo ciclo de vida, em condições naturais, ocorre total ou parcialmente em meio aquático;

XI - coliformes termotolerantes: bactérias gram-negativas, em forma de bacilos, oxidase-negativas, caracterizadas pela atividade da enzima β -galactosidase. Podem crescer em meios contendo agentes tenso-ativos e fermentar a lactose nas temperaturas de 44°- 45°C, com produção de ácido, gás e aldeído. Além de estarem presentes em fezes humanas e de animais homeotérmicos, ocorrem em solos, plantas ou outras matrizes ambientais que não tenham sido contaminados por material fecal;

XIV - controle de qualidade da água: conjunto de medidas operacionais que visa avaliar a melhoria e a conservação da qualidade da água estabelecida para o corpo de água;

XXIII - *Escherichia coli* (*E.coli*): bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae caracterizada pela atividade da enzima β -glicuronidase. Produz indol a partir do aminoácido triptofano. É a única espécie do grupo dos coliformes termotolerantes cujo habitat exclusivo é o intestino humano e de animais homeotérmicos, onde ocorre em densidades elevadas;

Seção III

Das Águas Salobras

Art. 6º

As águas salobras são assim classificadas:

I - classe especial: águas destinadas:

- a) à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; e,
- b) à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas.

II - classe 1: águas que podem ser destinadas:

- a) à recreação de contato primário, conforme Resolução CONAMA no 274, de 2000;
- b) à proteção das comunidades aquáticas;
- c) à aquicultura e à atividade de pesca;
- d) ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional ou avançado; e
- e) à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película, e à irrigação de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto.

III - classe 2: águas que podem ser destinadas:

- a) à pesca amadora; e
- b) à recreação de contato secundário.

IV - classe 3: águas que podem ser destinadas:

- a) à navegação; e
- b) à harmonia paisagística.

CAPITULO III

Das Condições E Padrões De Qualidade Das Águas

Seção I

Das Disposições Gerais

Art. 10. Os valores máximos estabelecidos para os parâmetros relacionados em cada uma das classes de enquadramento deverão ser obedecidos nas condições de vazão de referência.

§ 1º Os limites de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), estabelecidos para as águas doces de classes 2 e 3, poderão ser elevados, caso o estudo da capacidade de autodepuração do corpo receptor demonstre que as

concentrações mínimas de oxigênio dissolvido (OD) previstas não serão desobedecidas, nas condições de vazão de referência, com exceção da zona de mistura.

§ 2º Os valores máximos admissíveis dos parâmetros relativos às formas químicas de nitrogênio e fósforo, nas condições de vazão de referência, poderão ser alterados em decorrência de condições naturais, ou quando estudos ambientais específicos, que considerem também a poluição difusa, comprovem que esses novos limites não acarretarão prejuízos para os usos previstos no enquadramento do corpo de água.

§ 3º Para águas doces de classes 1 e 2, quando o nitrogênio for fator limitante para eutrofização, nas condições estabelecidas pelo órgão ambiental competente, o valor de nitrogênio total (após oxidação) não deverá ultrapassar 1,27 mg/L para ambientes lênticos e 2,18 mg/L para ambientes lóticos, na vazão de referência.

§ 4º O disposto nos parágrafos 2º e 3º não se aplica às baías de águas salinas ou salobras, ou outros corpos de água em que não seja aplicável a vazão de referência, para os quais deverão ser elaborados estudos específicos sobre a dispersão e assimilação de poluentes no meio hídrico.

Seção IV

Das Águas Salobras

Art. 21 As águas salobras de classe 1 observarão as seguintes condições e padrões:

I - condições de qualidade de água:

- a) não verificação de efeito tóxico crônico a organismos, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente, ou, na sua ausência, por instituições nacionais ou internacionais renomadas, comprovado pela realização de ensaio ecotoxicológico padronizado ou outro método cientificamente reconhecido;
- b) carbono orgânico total: até 3 mg/L, como C;
- c) OD, em qualquer amostra: não inferior a 5 mg/ L O₂;
- d) pH: 6,5 a 8,5;
- e) óleos e graxas: virtualmente ausentes;
- f) materiais flutuantes: virtualmente ausentes;

g) substâncias que produzem cor, odor e turbidez: virtualmente ausentes;

h) resíduos sólidos objetáveis: virtualmente ausentes; e

i) coliformes termotolerantes: para o uso de recreação de contato primário deverá ser obedecida a Resolução CONAMA nº 274, de 2000. 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 por 100 mL, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mililitros. Essas densidades deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras. Para a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película, bem como para a irrigação de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto, não deverá ser excedido o valor de 200 coliformes termotolerantes por 100 mL. Para os demais usos não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mL em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. A *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.