

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE OSTRAS (*Crassostrea* sp) E DE ÁGUAS COLETADAS EM CULTIVOS E EM BANCOS NATURAIS DE CANANÉIA (SP)

Eliete Rodrigues BALLESTEROS¹; Vanessa da Costa ANDRADE²; Edison BARBIERI³; Aline Bartelochi PINTO²; Raphaela Sanches de OLIVEIRA¹; Ana Júlia Fernandes Cardoso de OLIVEIRA¹

RESUMO

O consumo de organismos marinhos, especialmente moluscos bivalves, pode afetar a saúde humana, uma vez que os mesmos concentram em seus tecidos, partículas em suspensão, incluindo microrganismos patogênicos. A região de Cananéia é a maior produtora de ostras do Estado de São Paulo, e em 1999 foi fundada a Cooperostra (Cooperativa dos Produtores de ostras de Cananéia), que promove o processo de depuração das ostras em tanques estéreis, levando a redução e/ou eliminação das substâncias retidas nos seus tecidos. Os objetivos do presente estudo foram (i) avaliar a qualidade das águas nas adjacências de bancos naturais e nas etapas do processo de depuração realizado na Cooperostra, através da determinação de *Escherichia coli*, coliformes totais e coliformes termotolerantes e (ii) avaliar a contaminação de *Crassostrea* sp por *Salmonella* sp., coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva, em exemplares coletados em áreas naturais de cultivo e na Cooperostra, avaliando o grau de contaminação dos organismos e a eficiência do processo de depuração. Os resultados mostraram uma diminuição nas densidades de *Salmonella* sp e de coliformes nos tecidos das ostras, após o processo de depuração, entretanto, as densidades de *Staphylococcus* coagulase positiva apresentaram níveis elevados, o que pode ser indicativo de contaminação por manipulação. Os resultados para *Salmonella* sp. estavam em conformidade com a RDC n° 12.

Palavras-chave: *Staphylococcus*; *Salmonella* sp; ostras; qualidade microbiológica; processo de depuração; bactérias.

MICROBIAL QUALITY OF OYSTERS AND WATERS FROM CULTURE AND NATURAL BANKS IN CANANEIA (SP)

ABSTRACT

The consumption of marine organisms, especially bivalve molluscs, might affect the human health, once that they concentrate in their tissues, suspended particles, including pathogenic microorganisms. Cananeia region is the largest oyster producer in the state of São Paulo, and in 1999 was founded the Cooperostra (Cooperative), which promotes the oysters depuration process in sterile tanks, leading to reduce and/or eliminate retained substances in their tissues. This study aims (i) evaluate the water quality in the adjacencies of the natural oysters' beds and during the steps of the depuration process, through the determination of *Escherichia coli*, total coliforms and thermotolerant coliforms, and (ii) evaluate the contamination of *Crassostrea* sp by *Salmonella* sp., total coliforms, thermotolerant coliforms and *Staphylococcus* coagulase positive, in samples collected at Cooperostra and in natural oysters' beds, assessing the contamination level of the organisms and the efficiency of the depuration process. The results show a reduce of *Salmonella* sp and coliforms densities in the oysters' tissues after the depuration process. However, *Staphylococcus* coagulase positive shown high levels, which may be indicative of handling contamination. The *Salmonella* sp results were in agreement with RDC n12.

Keywords: *Staphylococcus*; *Salmonella* sp; oysters; microbiological quality; depuration process, bacteria.

Artigo Científico: Recebido em 16/11/2015 - Aprovado em 01/03/2016

¹ Laboratório de Microbiologia Marinha, Universidade Estadual Paulista – UNESP. Praça Infante Dom Henrique, s/n°, Pq. Bitaru, São Vicente – SP, Brasil, CEP: 11330-900. Telefone: +55(11) 3569-7113 e-mail: ajuliaf@clp.unesp.br e

² Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada – Avenida 24 A, 1515, Rio Claro – SP, Brasil, CEP: 13506-900. E-mail: costa.andrade@terra.com.br e aline.bartelochi@gmail.com

³ Instituto de Pesca – APTA – SAASP. Av. Prof. Besnard s/n., CEP 11990-000, Cananéia – SP, Brasil. Caixa Postal 157. e-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A ocupação desordenada da região costeira causa sérios impactos nos ecossistemas marinhos e adjacentes. Um dos principais problemas é o crescimento populacional nas cidades litorâneas, que nem sempre é acompanhado da infraestrutura de saneamento básico e gera efluentes domésticos que são lançados diretamente ao mar, sem qualquer tratamento prévio (WHO, 1998). O lançamento de esgotos em águas costeiras causa modificações físicas, químicas e biológicas no corpo receptor, promovendo a diminuição do oxigênio dissolvido, diminuição do pH e aumento da turbidez, afetando diretamente a qualidade da água. Além disto, os esgotos podem carregar contaminantes químicos e organismos patogênicos como vírus, protozoários e bactérias (BARBIERI *et al.*, 2012). A contaminação das águas e a degradação de ambientes costeiros podem também desfavorecer a economia das cidades litorâneas, afetando negativamente o turismo (KOCASOY, 1995; SIUNG-CHANG, 1995) e comprometendo atividades pesqueiras, extrativistas e/ou de aquicultura (COLLINS *et al.*, 1998; OFIARA e BROWN, 1999). A qualidade sanitária da água do mar e dos organismos utilizados como fonte de alimento são extremamente importantes, uma vez que a ingestão de água e/ou alimentos contaminados por microrganismos patogênicos é uma das principais causas de doenças diarreicas no país (VAZQUEZ *et al.*, 1999; INGHAM e SCHIMDT, 2000; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004; PONTUAL *et al.*, 2006). O consumo de organismos marinhos, principalmente ostras e mariscos, apresenta grande relação com a saúde pública, uma vez que estes são organismos que filtram a água para obtenção de alimento e oxigênio, podendo concentrar em seus tecidos todo material em suspensão, inclusive bactérias patogênicas (VIEIRA, 2003).

A maricultura é uma área da aquicultura que está se desenvolvendo progressivamente no Brasil. A atividade teve início através de estudos técnicos do Instituto de Pesca da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SP) que avaliaram o potencial da ostreicultura na região de Cananéia nos anos 70 (BRANDINI *et al.*, 2000). Esta região

integra o complexo Estuarino de Iguape, Cananéia e Paranaguá, sendo caracterizada como rica em bancos naturais de moluscos bivalves e uma das mais produtivas do país, destacando-se a ostra do mangue *Crassostrea* sp. (LOVE *et al.*, 2010; BARBIERI *et al.*, 2013).

Os padrões microbiológicos da qualidade de alimentos inclusive de origem marinha, tais como peixes, moluscos e crustáceos são regulamentados pela Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução ANVISA RDC nº 12/01, baseando-se nas densidades de Coliformes a 45° C, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp. (ANVISA, 2001). A qualidade de águas destinadas a criação de organismos aquáticos, incluindo salobras e salgadas, é avaliada por meio da Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução CONAMA nº 357/05, que considera como parâmetros os coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*.

Em 1999 foi fundada a Cooperativa dos Produtores de Ostra de Cananéia (Cooperostra) que comercializa ostras provenientes de viveiros de engorda localizados no complexo estuarino de Cananéia (SP). As ostras, após coletadas, passam primeiramente por uma limpeza física para a retirada de organismos incrustantes (cracas *Ballanus* spp. e mexilhões *Mytella* spp.), em seguida são lavadas com água sob pressão, selecionadas por tamanho e então submetidas ao processo de depuração. Na depuração, estes organismos são mantidos por aproximadamente seis horas (tempo mínimo) em tanques com água bombeada da laguna, devidamente filtrada e esterilizada. Através deste processo as ostras eliminam certas substâncias retidas em seu interior, inclusive a maior parte dos microrganismos patogênicos, o que as torna aptas para o consumo (LOVE *et al.*, 2010).

Ostras e mariscos na maioria das vezes são consumidos crus, podendo causar gastroenterites se os mesmos estiverem contaminados por bactérias e/ou pela presença de toxinas (BALABAN e RASSOLY, 2000) liberada por estas, significando um sério problema de saúde pública (MIGNIANI *et al.*, 2013).

Sendo assim, os objetivos do presente estudo foram (i) avaliar a qualidade das águas nas

adjacências de bancos naturais e nas etapas do processo de depuração realizado na Cooperostra, através da determinação de *Escherichia coli*, coliformes totais e coliformes termotolerantes e (ii) avaliar a contaminação de *Crassostrea* sp por *Salmonella* sp., coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva, em exemplares coletados em áreas naturais de cultivo e na Cooperostra, avaliando o grau de contaminação dos organismos e a eficiência do processo de depuração.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *Crassostrea* sp. e de água foram coletadas nos tanques da Cooperostra (Figura 1) antes e após o processo de depuração, nos meses

de maio, julho e outubro de 2010, e em janeiro e abril de 2011. As amostras de água foram coletadas em frascos plásticos estéreis e mantidas sob refrigeração até seu processamento no laboratório de Microbiologia Marinha (Micromar) da UNESP CLP. As ostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes os quais foram etiquetados e mantidos abertos mantendo os organismos vivos até a hora do processamento. Também foram coletadas amostras de água em áreas com bancos naturais de ostras Itapitangui e Mandira (Figura 1). Dados abióticos foram mensurados *in situ* por meio de equipamentos portáteis, tais como refratômetro (salinidade) e uma sonda HANNA portátil (temperatura e pH).



Figura 1. Mapa do complexo estuarino Cananéia - Iguape, indicando a localização da cooperativa Cooperostra (1) e bancos naturais, Itapitangui (2) e Mandira (3).

Análise da água

As determinações das densidades de Coliformes Totais e Termotolerantes foram realizadas através da técnica de Tubos Múltiplos

(APHA, 2012), utilizando como meios para Coliformes Totais o Caldo Lactosado e o Caldo Lactosado com Verde Brillhante e Bile 2%, e para Coliformes Termotolerantes o Caldo EC. Os

resultados das densidades médias de bactérias foram expressos em número mais provável em 100mL (NMP 100mL⁻¹).

Para determinação de *Escherichia coli*, foi utilizada a técnica de Membrana Filtrante (APHA 2012) utilizando-se o meio de cultura Ágar mTEC. Para confirmação foi utilizada a técnica de substrato de ureia, onde as colônias com coloração amarela foram consideradas características, e os resultados expressos como Unidades Formadoras de Colônias em 100mL (UFC 100mL⁻¹).

Análises das ostras

Os exemplares coletados foram lavados sob água corrente e limpos para a remoção de organismos incrustantes e sedimentos aderidos na parte externa. Após a lavagem, as ostras foram abertas e foram separados 40g de carne e líquido intravalvar.

Para as análises das densidades de coliformes totais e termotolerantes, foi utilizada a Técnica de Tubos Múltiplos (APHA, 2012), semelhante ao realizado com as amostras de água. Em um liquidificador limpo e estéril, foram adicionados 20g da carne e do líquido intravalvar a 180mL de água estéril, e homogeneizados por aproximadamente 2 minutos, constituindo assim a primeira diluição (10⁻¹). A partir desta diluição, transferiu-se 10mL, com uma pipeta estéril, para frascos de diluição contendo 90mL de água estéril, originando a segunda diluição (10⁻²), sendo o mesmo feito para obter-se a diluição 10⁻³. Os resultados das densidades médias foram expressos como Número Mais Provável em 1g (NMP g⁻¹).

A determinação das densidades de *Staphylococcus* coagulase positiva nos tecidos moles das ostras foi feita pelo método de *spread plate*, utilizando o meio de cultura Agar Baird Parker. As placas foram incubadas a 37°C por 24h (HARRIGAN, 1998) sendo que as colônias típicas adquirem coloração negra brilhante e com halo claro em torno de suas bordas (VIEIRA, 2004).

Os isolados foram identificados morfológica e bioquimicamente (coloração de gram, prova de catalase, crescimento na presença de 5% de NaCl, oxidase, crescimento em anaerobiose e motilidade), e a confirmação das colônias deu-se através do teste de coagulase como estabelecido

pela RCD ANVISA 12/01 utilizando cepas padrão de *Staphylococcus* para controle positivo (ATCC 25923) e *S. epidermidis* para controle negativo (ATCC 14990). Os resultados foram expressos em UFC em 1g (UFC.g⁻¹).

Para a determinação de *Salmonella* sp. foram realizadas as seguintes etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em Agar seletivo e diferencial, seleção das colônias suspeitas, e sorologia. Na etapa de pré-enriquecimento, 20g de tecido mole das ostras foram homogeneizados com 180mL de Caldo Lactosado no liquidificador por dois minutos, sendo o homogenato transferido para um erlenmeyer estéril, permanecendo em repouso por 60 minutos em temperatura ambiente e por fim incubado por 24 horas (± 2 horas) a 35°C. Após a incubação, inoculou-se 0,1mL em 10mL de meio de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis (RV), posteriormente incubado por 24 horas a 42°C (± 0,2°C), e 1 mL inoculado em 10 mL de caldo Tetrionato (TT), sendo incubado por 24 horas em estufa bacteriológica a 35°C (± 0,2°C). Com o auxílio da alça de platina, foram transferidos do RV e TT para meios seletivos Agar Sulfito de Bismuto (BS), Agar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), Agar Entérico Hektoen (HE) e incubados por 24 horas (± 2 horas) por 35°C. Colônias típicas foram selecionadas em Agar BS (colônias escuras com ou sem brilho metálico), Ágar XLD (colônias róseas com ou sem centro negro) e Ágar HE (colônias verde-azuladas com ou sem centro negro), e transferidas para tubos contendo Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA) inclinados e incubados a 35°C por 24 horas (± 2 horas).

Após a incubação foram observadas reações típicas nos meios TSI (ápice alcalino e base ácida, com ou sem produção de gás e H₂S) e LIA (base alcalina e produção de H₂S). Todas as culturas com reações positivas no meio TSI foram transferidas para o meio Ágar Triptona de Soja (TSA) (VIEIRA, 2004) e submetidas ao teste sorológico flagelar polivalente (H) e ao teste sorológico somático polivalente (O). Os resultados foram expressos como presença ou ausência de *Salmonella* em 25g de amostra.

Análise estatística

As densidades médias bacterianas nas amostras de água e de ostras (dos bancos naturais e do processo de depuração) foram confrontadas através do teste de Levene para homocedasticidade dos dados sendo aplicado, a posteriori, o teste de Kruskal-Wallis no caso de amostras não homogêneas e a análise de variância de uma via (one-way ANOVA) para as amostras homogêneas a um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Ao longo do período de estudo, a temperatura medida na água antes da depuração apresentou média de $19,9^{\circ}\text{C} \pm 1,3$, e a média após o processo foi de $19,7^{\circ}\text{C} \pm 1,3$. A salinidade média antes do tratamento foi de $18,8 \pm 2,9$, e após a depuração $20 \pm 3,9$. O pH apresentou médias $6,9 \pm 0,2$ (Coop. Antes) e $7,0 \pm 0,1$ (Coop. Depois).

Em Itapitangui, a média de temperatura foi de $21,3^{\circ}\text{C} \pm 2,3$, a salinidade média de $19 \pm 4,8$ e o médio de $7,0 \pm 0,3$, enquanto que no Mandira a temperatura média foi de $21,1^{\circ}\text{C} \pm 2,7$, a salinidade média de $17,4 \pm 3,5$ e o pH médio de $7,2 \pm 0,5$. As análises estatísticas realizadas mostraram homogeneidade dos dados com exceção das amostras de coliformes totais em ostra e coliformes termotolerantes em água, com pode ser observado pelo valor de p (Tabela 1). Desta maneira foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW) para as amostras não homogêneas e ANOVA para as homogêneas. Diferenças significativas foram observadas apenas para as amostras de *Staphylococcus* coagulase positivos em ostras e coliformes totais em água (Tabela 1).

Tabela 1 - Análises estatísticas das amostras de água e de ostras, coletadas em áreas naturais e na Cooperostra. Resultados do Teste de Levene para verificação da homocedasticidade dos dados, do Teste Kruskal-Wallis para dados não homogêneos e ANOVA para os homogêneos.

	gl	F	p	KW	ANOVA
<i>Staphylococcus</i>	4	0,9416	0,4603		0,008***
CT água	4	1,5922	0,2194		0,006**
CT ostra	4	3,6058	0,02**	0,0788	
Ctermo água	4	2,4241	0,0859		0,577095
Ctermo ostra	4	4,1167	0,013**	0,1786	

KW-Kruskal-Wallis e One-way ANOVA -análise de variância. gl= graus de liberdade * $p < 0,05$
** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$

A maior média de densidade de *Staphylococcus* coagulase positiva ocorreu nas amostras do Mandira ($2,09 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) e a menor nas amostras coletadas após o processo de depuração (Coop depois $1,01 \times 10^4$ UFC.g⁻¹). Diferenças significativas foram observadas para as amostras do Mandira em relação às demais

($p < 0,05$) e notou-se uma grande diminuição nas densidades bacterianas após o processo de depuração (Figura 2), ainda que não tenha sido observada diferença significativa entre as densidades antes e após o processo de depuração (Tabela 1).

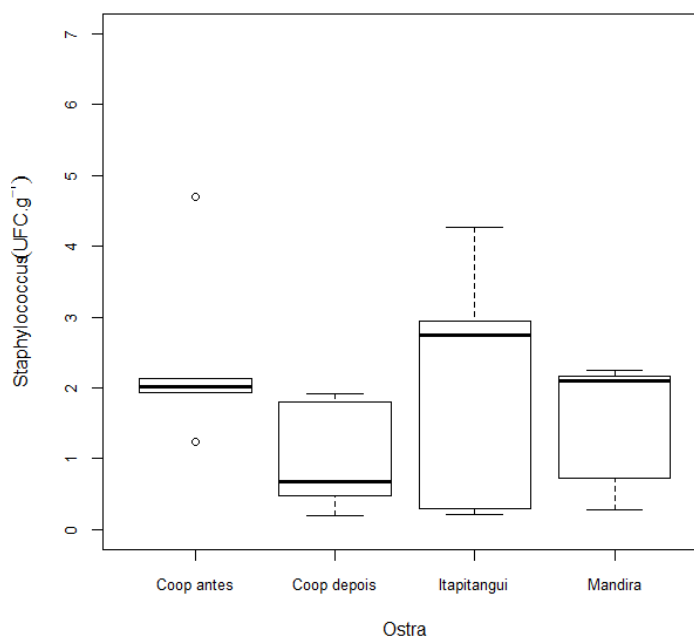


Figura 2- Densidade de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de tecido de ostra coletadas em bancos naturais (Itapitangui e Mandira) e na Cooperostra (Coop), antes e após o processo de depuração. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) $\times 10^4$ por grama (g^{-1}). Traço horizontal = média.

A média da densidade de coliformes totais nas amostras de água foi maior no Mandira em relação às demais, havendo diferença significativa entre Mandira e as amostras da cooperativa antes ($p < 0,05$). A maior média foi obtida para as amostras do Itapitangui (647 NMP.mL^{-1}) e a menor para as amostras da cooperativa antes ($77,2 \text{ NMP.mL}^{-1}$). Houve um aumento de coliformes totais após o processo de depuração em relação às amostras de antes do processo, porém não foi observada diferença significativa.

Para as amostras de ostra, a maior média da densidade de coliformes totais foi observada para as amostras de antes do processo de depuração (1220 NMP.g^{-1}) e para aquelas coletadas no Mandira (1058 NMP.g^{-1}). A menor densidade de coliformes totais para as amostras de ostra foi observada nas amostras coletadas depois do processo de depuração (107 NMP.g^{-1}) (Figura 3).

Nas amostras de água, maior média da densidade de coliformes termotolerantes foi observada para as amostras do Mandira (458 NMP.mL^{-1}) e a menor para as amostras coletadas antes do processo de depuração ($22,4 \text{ NMP.mL}^{-1}$). Não houve diferença significativa entre os pontos amostrados, entretanto foi possível observar um aumento na média das densidades bacterianas após o processo de depuração. Em relação às amostras de ostras, a maior média da densidade de coliformes termotolerantes foi obtida para as amostras do Mandira (981 NMP.g^{-1}) e a menor para as amostras coletadas após o processo de depuração ($61,2 \text{ NMP.g}^{-1}$). Não houve diferença significativa entre as amostras, porém foi observada uma diminuição na média das densidades após o processo de depuração (Figura 4).

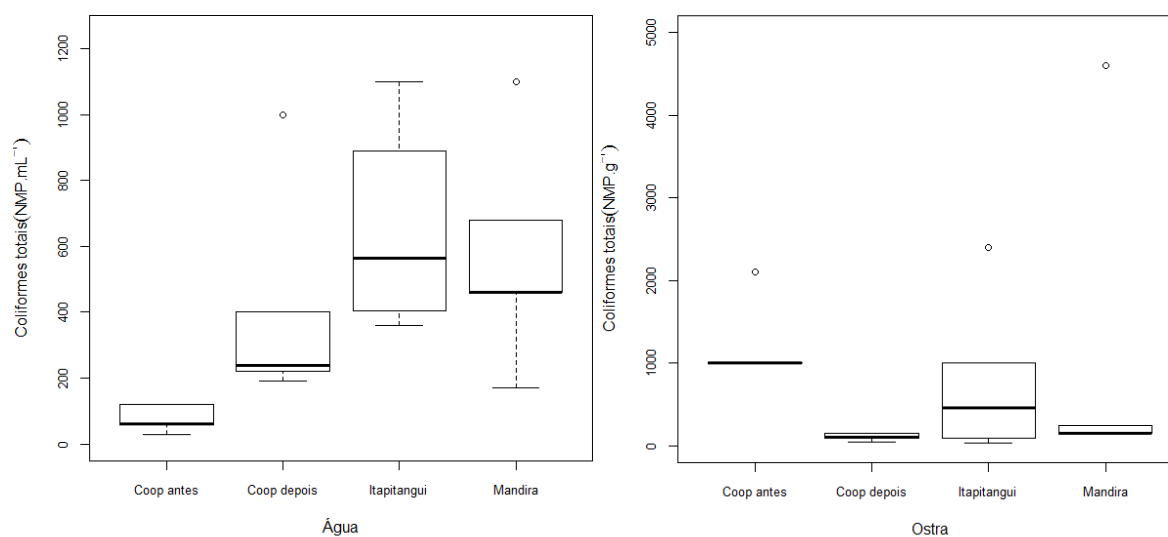


Figura 3—Médias das densidades de coliformes totais em amostras de água e ostra, coletadas em bancos naturais (Itapitangui e Mandira) e na Cooperostra (Coop), antes e após o processo de depuração. Número Mais Provável (NMP) por mililitro (mL⁻¹). Traço horizontal = média; box = média \pm desvio padrão; linhas limite verticais = média \pm 1,96*desvio padrão; círculos brancos = *outliers*.

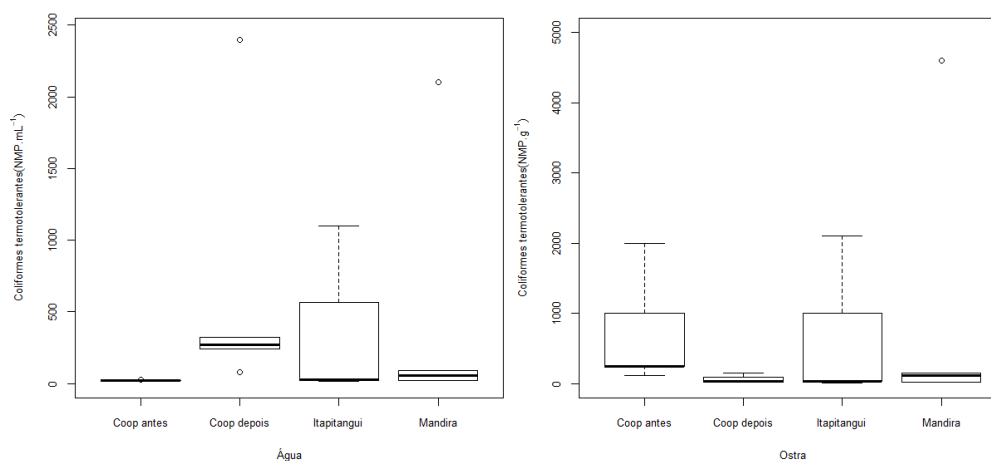


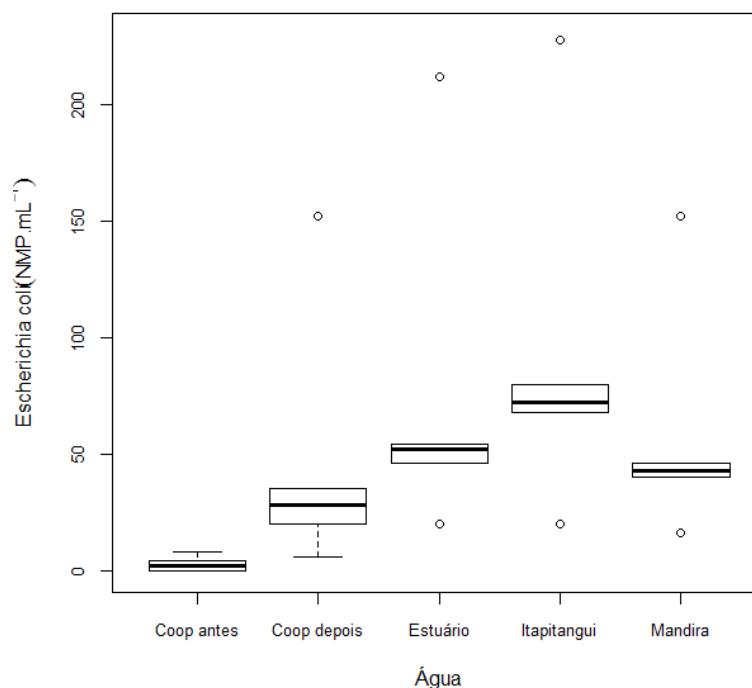
Figura 4—Médias das densidades de coliformes termotolerantes nas amostras de água e ostra, coletadas em bancos naturais (Itapitangui e Mandira) e na Cooperostra (Coop), antes e após o processo de depuração. Número Mais Provável (NMP) por mililitro (mL⁻¹). Traço horizontal = média; box = média \pm desvio padrão; linhas limite verticais = média \pm 1,96*desvio padrão; círculos brancos = *outliers*.

Não houve diferença significativa entre os pontos em relação à *Escherichia coli*, sendo a maior média de densidade encontrada para Mandira (93,6 NMP.mL⁻¹) e a menor para as amostras de antes

do processo de depuração (2,8 NMP.mL⁻¹). Ainda que não tenha sido observada diferença significativa, nota-se um aumento na densidade de bactérias após o processo de depuração (Figura

5). Por fim, todas as amostras apresentaram resultado positivo para a presença de *Salmonella* sp porém, após o processo de depuração, as

amostras analisadas apresentaram resultado negativo.



e

Figura 5- Média das densidades de *Escherichia coli* nas amostras de água, coletadas em bancos naturais (Itapitangui e Mandira) e na Cooperostra (Coop), antes e após o processo de depuração. Número Mais Provável (NMP) por mililitro (mL^{-1}). Onde: traço horizontal = média; box = média \pm desvio padrão; linhas limite verticais = média $\pm 1,96$ * desvio padrão; círculos brancos = *outliers*.

DISCUSSÃO

A principal via de intoxicação de seres humanos por poluentes orgânicos, inorgânicos e microrganismos, associados a sistemas aquáticos, é o consumo de itens de pescado contaminados (MACKAY e CLARK, 1991). Os riscos à saúde, associados à ingestão de pescado contaminado chegam a ser de 20 a 40 vezes mais elevados do que o resultado de ingestão de água contaminada (FORAN, 1990; BARROS e BARBIERI, 2012). Isto se deve ao fato dos organismos aquáticos serem capazes de concentrar os elementos em até 105 vezes as concentrações observadas no meio ambiente (GUIMARÃES *et al.*, 1985).

Organismos filtradores, como ostras e mexilhões, podem concentrar e bioacumular micro-organismos, inclusive aqueles patogênicos, em seus tecidos, quando cultivados ou extraídos

de locais contaminados (MARTINEZ e OLIVEIRA, 2010; DOI *et al.*, 2014). Esses patógenos presentes em moluscos possuem uma longa história relacionada a epidemias de doenças gastrointestinais, sendo, portanto, de extrema importância processos que levem à sua eliminação em moluscos comercializados para consumo humano (CORRÊA *et al.*, 2007). Principalmente para garantir a sanidade desses animais e evitar problemas de saúde pública.

Por esse motivo este trabalho determinou as densidades de coliformes (Totais e Termotolerantes), *E. coli*, *Salmonella* sp e *Staphylococcus* coagulase positiva, para se verificar a eficiência do processo de depuração realizado pela Cooperativa dos Produtores de Ostra de Cananéia sendo possível notar a redução das densidades bacterianas nos tecidos de *Crassostrea* sp e aumento, após o processo de depuração, das

densidades de coliformes nas amostras de água. No caso de *E. coli*, foram observados aumentos na densidade destas após o processo de depuração, indicando que as ostras estariam eliminando e/ou diminuindo as concentrações bacterianas em seus tecidos. LOVE *et al.*, (2010) demonstraram que, em moluscos contaminados artificialmente, a concentração de micro-organismos patogênicos diminui expressivamente após o processo de depuração, principalmente quando se otimiza parâmetros ambientais como salinidade, turbidez e pH. A elevada presença de coliformes nas amostras de água indica contaminação por esgoto doméstico, provavelmente nos locais onde as ostras sofrem o processo de engorda. Em Cananéia, dados sobre o saneamento básico são muito escassos, tanto por parte da prefeitura como da SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo), sendo assim é provável que a maior parte do esgoto seja despejado no estuário *in natura* sem nenhum tratamento. A água em que as ostras são colocadas para o processo de depuração encontram-se de acordo com a Resolução CONAMA nº 357 (2005), que normatiza 43 NMP 100mL⁻¹ de Coliformes Termotolerantes nas águas de cultivo de bivalves. Os picos tanto de Coliformes (Totais e Termotolerantes) quanto de *E. coli* apresentam-se no mês de janeiro, que coincide com a época de temporada, aumentando assim a carga de efluentes domésticos no estuário (CETESB, 2006).

A ANVISA determina previamente as densidades permitidas para pescados e produtos de pesca (ANVISA, 2001), visando garantir a segurança de alimentos provenientes do mar, definindo como o ideal a ausência de *Salmonella* sp. em 25g de amostra, portanto após o processo de depuração as ostras encontraram-se próprias para o consumo, considerando apenas esta bactéria. A depuração mostrou-se eficiente na eliminação de *Salmonella* sp. uma vez que, após o processo de depuração, todas as amostras coletadas apresentaram resultados negativos para a presença desta bactéria. Da mesma maneira, CORRÊA *et al.*, (2007) demonstraram, em experimentos realizados com a ostra *Crassostrea gigas* em Santa Catarina, que a combinação de tratamento com luz ultravioleta e cloração, eliminaram completamente *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dos tecidos das ostras, em

um período de 12h. Diversos estudos afirmam que a legislação brasileira atual não regula os sistemas de depuração, apenas a presença de coliformes fecais nas águas de cultivo e *Salmonella* sp nos tecidos de moluscos (CORRÊA *et al.*, 2007; DIEGO *et al.*, 2013). Uma vez que elevadas densidades de *Staphylococcus* coagulase positiva foram observadas nas amostras de tecido de ostra, o presente estudo reforça a necessidade do estabelecimento de padrões para regulamentar os sistemas de depuração de moluscos destinados ao consumo humano. A presença deste micro-organismo nas amostras provavelmente é resultante de contaminação cruzada, uma vez que estas bactérias são comuns à pele de humanos, principalmente *S. aureus*, sendo utilizadas como indicadores de deficiências de caráter higiênico no processo de obtenção do alimento e nas operações de manipulação (CANDLISH, 2001; DIEGO *et al.*, 2013).

CONCLUSÕES

O processo de depuração tem se mostrado importante na redução de microrganismos patogênicos, especialmente *Salmonella* sp. e coliformes termotolerantes, conforme demonstrado neste estudo, entretanto, o sistema de depuração pode e deve ser aprimorado visando uma maior eficiência do processo de descontaminação bem como o descarte adequado da água dos tanques após o término do processo.

Apesar da eficiência no processo de depuração, as concentrações relativamente significantes de *Staphylococcus* coagulase positiva são um indicativo de uma possível contaminação cruzada dentro da cooperativa, proveniente da manipulação das ostras pelos cooperados, o que indica a necessidade de ações visando a adoção de boas práticas de higiene para os manipuladores de ostras a fim de garantir a segurança e uma maior qualidade do produto.

Ainda são necessários mais estudos com relação a diversos fatores, tais como a contaminação por outros microrganismos, incluindo vírus e bactérias patogênicas e a presença de bactérias resistentes a agentes antimicrobianos, além de desenvolvimento de outras técnicas que aumentem a eficiência do processo.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho está vinculado ao projeto “Análises Microbiológicas de Ostras e de Águas Coletadas em Bancos Naturais e em Ostriculturas: ferramentas para proposta de novo indicador bacteriológico para a avaliação da qualidade sanitária de alimentos de origem marinha e de águas de cultivo” e os autores agradecem a FAPESP (Processo FAPESP nº 2009/05960-7).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, 10 jan. 2001, Brasil.
- APHA, American Public Health Association. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APH, AWWA, WEF. 22nd Edition. 1120p.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins: a review. *International Journal Food Microbiology*, 21: 1-10.
- BARBIERI, E.; BONDIOLI, A. C.; WOICIECHOVSKI, E.; ZAPOTOSKI, S. M. K. 2012. Microbiology quality of the oysters cultivation water marketed in Cananeia-SP, Brazil. *O Mundo da Saúde*. 36(4): 541-547.
- BARROS, D.; BARBIERI, E. 2012. Análise da ocorrência de metais: Ni, Zn, Cu, Pb e Cd em ostras (*Crassostrea brasiliana*) e sedimentos coletados no Estuário de Cananéia, SP (Brasil). *O Mundo da Saúde*. 36(4): 635-642.
- BRANDINI, F.P.; SILVA, A.S.; PROENÇA, L. A. 2000. Oceanografia e maricultura. In: Valenti, W. C. P.; Pereira, C. R.; Borghetti, J. R.; *Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. CNPq: Ministério da Ciência e Tecnologia. 3: 107-142.
- CANDLISH, A.A.G.; PEARSON, S.M.; AIDOO, K.E.; SMITH, J. E; KELLY, B.; IRVINE, H. 2001. A survey of ethnic foods for microbial quality and aflatoxin content. *Food Additives and Contaminants*, 18(2): 129-136.
- CETESB - São Paulo. 2006. Relatório de qualidade das águas litorâneas do Estado de São Paulo: *Balneabilidade das praias 2005*.
- COLLINS, A.; STAPLETON, M.; WHITMARSH, D. 1998. Fishery-pollution interactions: A modelling approach to explore the nature and incidence of economic damages. *Marine Pollution Bulletin*, 36: 211-221.
- CONAMA. 2005. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
- CORRÊA, 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*, 63(5): 479-489.
- DIEGO, A.G.L.; RAMOS, A.P.D.; SOUZA, D.S.M.; DURIGAN, M.; GREINERT-GOULART, J.A.; MORESCO, V.; AMSTUTZ, R.C.; MICOLI, A.H.; NETO, R.C.; BARARDI, C.R.M.; FRANCO, R.M.B. 2013. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. *Ocean and Coastal Management*, 72: 93-100.
- DOI, S.A.; BARBIERI, E.; MARQUES, H.L.A. 2014. Densidade colimétrica das áreas de extrativismo de ostras em relação aos fatores ambientais em Cananeia (SP). *Engenharia Sanitária e Ambiental*. 19(1): 165-171.
- FORAN, J.A. 1990. Toxic substances in surface waters. *Environmental Science and Technology*. (24): 604-608.
- GUIMARÃES, J.R.D.; LACERDA, L.D.; TEIXEIRA, V.L.. 1982. Concentração de metais pesados em algas bentônicas da Baía da Ribeira, Angra dos Reis: Com sugestão de espécies monitoras. *Revista Brasileira de Biologia*. 42(4): 553-557.
- HARRIGAN, W.F. 1998. Laboratory methods in food microbiology. 3^a ed. San Diego Academic Press., 533p. Inghan, A. C.; Reyes, J. C. N.; Lang, M. M. (2000) Potential use of presumptive enterococci and staphylococci as indicators of sanitary conditions implant making hard Italian-type cheese. *Journal of Food Protection*. 63(12): 1697-1701.
- INGHAM, S.C. e SCHIMDT, D. 2000 Alternative indicator bacteria analyses for evaluating the sanitary condition of beef carcasses. *Journal of Food Protection*, 63: 51-55.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ E CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA “Professor Alexandre Vranjac”. 2004. Diarréia e rotavírus.

- Revista de Saúde Pública*, São Paulo, 38(6), 844-845.
- KOCASOY, G. 1995. Effects of tourist population pressure on pollution of coastal seas. *Environmental Management*, 19(1): 75-79.
- LOVE, D.C.; LOVELACE, G.L.; SOBSEY, M.D. 2010. Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, poliovirus and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3): 211-217.
- MACKAY, D.; CLARCK, K.E. 1991. Predicting the environmental partitioning of organic contaminants and their transfer to biota. In: Jones, K.C. (ed) *Organic Contaminants in the Environment. Environmental Management Series*, Elsevier Science Pub, New York. 254p.
- MARTINEZ, D. I. e OLIVEIRA, A. J. F. C. 2010. Faecal bacteria in Perna perna (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) for biomonitoring coastal waters and seafood quality. *Brazilian Journal of Oceanography* (Impresso), 58: 25-35.
- MIGNANI, L.; BARBIERI, E.; Marques, H.L.A.; OLIVEIRA, A.J.F.C. 2013. Coliform density in oyster culture waters and its relationship with environmental factors. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*.48: 833-840.
- OFIARA, D.D.; BROWN, B. 1999. Assessment of Economic Losses to Recreational Activities from 1988 Marine Pollution Events and Assessment of Economic Losses from Long-Term Contamination of Fish within the New York Bight to New Jersey. *Marine Pollution Bulletin*, 38 (11): 990-1004.
- PONTUAL, J.P.S.; FALBO, A.R.; GOUVEIA, J.S. 2006. Estudo etiológico da diarreia em crianças hospitalizadas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP, em Recife, Pernambuco, *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil Recife*, 6(1): 11-17.
- SIUNG-CHANG, A. 1997. A review of marine pollution issues in Caribbean. *Environmental Geochemistry and Health*, 19(2): 45-55.
- VAZQUEZ, M.L.; MOSQUERA, M.; CUEVAS, L.E.; GONZALEZ, E.S.; VERAS, I.C.L.; LUZ, E.O.; BATISTA-FILHO, M.; GURGEL, R.Q. 1999. Incidência e fatores de risco de diarreia e infecções respiratórias agudas em comunidades urbanas de Pernambuco, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 15(1): 163-171.
- VIEIRA, R.H.S.F. 2003. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. Livraria Varela, São Paulo.
- WHO - World Health Organization. 1998. Guidelines for Safe Recreational Waters - Water Environments. Volume 1: Coastal and Fresh-Waters. WHO/EOS/98.14, World Health Organization, Geneva, 208p.