



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

RENATA RODRIGUES DE MELO

**Análise da qualidade microbiológica do peixe (*Eugerres brasiliensis*,
Curvier 1830) e das águas do Estuário do Rio Itanhaém, SP, Brasil.**

RIO CLARO – SP
Março, 2015

RENATA RODRIGUES DE MELO

**Análise da qualidade microbiológica do peixe (*Eugerres brasiliensis*,
Curvier 1830) e das águas do Estuário do Rio Itanhaém, SP, Brasil.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Biociências do campus de Rio
Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio
de Mesquita Filho, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Microbiologia
Aplicada)

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a Ana Julia Fernandes
Cardoso de Oliveira

RIO CLARO – SP
Março, 2015

*Dedico este trabalho à meus Pais, que
sempre me apoiaram e me deram forças
pra que eu nunca desistisse dos meus
sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer à minha família, em especial meus Pais, que sempre me deram força, apoio e estrutura para que eu conseguisse realizar meus sonhos.

Agradeço também a minha irmã Priscila, que além de ter dado força e ter aguentado os períodos estressantes conjuntamente, também nos deu algo muito precioso, minha sobrinha Letícia, que tornou nossas vidas mais felizes.

Também gostaria de agradecer a Professora Ana Júlia por abrir as portas do Laboratório Micromar para uma pessoa totalmente inexperiente na área, e proporcionar não só o aprendizado, mas também a melhor forma de trabalhar. Obrigada por tudo AJ!

Também gostaria de agradecer ao meu namorado Caio, que sempre esteve ao meu lado me dando força, principalmente nos momentos difíceis e estressantes.

Agradeço também aos meus amigos que sempre estiveram comigo nessa caminhada e lutam por um lugar ao sol. Obrigada Tofu, Prematura, Meti, Malária, MiPGA, Mirella, Bisonha, Seu Bosta, Tixa, Cerol, e todos os outros que eu tenha esquecido de citar (são muitos).

Agradeço a Unesp-Campus Rio Claro, por oferecer estrutura para a melhor realização do Mestrado como um todo. Também a Unesp-Campus São Vicente por oferecer toda estrutura necessária para a realização do trabalho.

Agradeço também aos pescadores Roxinho e Xandão por terem ajudado nas coletas, sem eles este trabalho não teria sido realizado. E também ao senhor Zézinho, responsável pelo centro de pesquisa do Estuário do rio Itanhaém, que ajudou no oferecimento da embarcação para a realização das coletas.

Agradeço a toda a equipe Micromar, em especial Bruna e Mirella, que me ajudaram na realização das coletas e triagem do material.

A quem eu não citei neste texto, mas que tem consciência que ajudou de alguma forma, muito Obrigada!

RESUMO

A microbiota bacteriana encontrada nos peixes vivos está diretamente relacionada à microbiota do ambiente, ou seja, os microrganismos presentes em sua superfície corporal, brânquias, trato gastrointestinal e musculatura estão relacionados aos mesmos do ambiente em que está inserido. Os peixes possuem naturalmente uma vasta gama de bactérias, que também podem ser comumente encontradas na água. Porém, as bactérias de origem fecal, como *E.coli* e *Enterococos*, não são habitantes comuns da flora intestinal dos peixes, sendo sua presença atrelada à contaminação por fezes humanas ou de outros animais de sangue quente na água de captura. Sendo assim, o monitoramento da qualidade microbiológica tanto da água, quanto dos organismos retirados dela para consumo humano, tornam-se necessários, já que podem causar prejuízo a saúde do homem, provocando problemas de saúde pública. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica do peixe (*Eugerres brasiliensis*, Curvier 1830) e das águas do estuário do Rio Itanhaém, SP (Brasil). Três bactérias foram utilizadas para avaliar a qualidade microbiológica da água e dos peixes, duas de origem fecal humana, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. e uma de origem não fecal, *Staphylococcus aureus*, todas obtidas pela técnica da membrana filtrante. Nos peixes foram avaliados suas brânquias e músculo. Os resultados obtidos mostraram que durante todo o período do estudo, as águas do rio Itanhaém apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação CONAMA 357/05, porém o uso de *E.coli*, demonstrou ser insuficiente para avaliar a qualidade da água, visto que a densidade de *Enterococcus* sp. foi alta durante todo o estudo em todos os pontos analisados. Na análise dos peixes, foram encontradas altas concentrações para as três bactérias utilizadas, com as brânquias se apresentando com maior número em relação ao músculo. De acordo com a legislação RDC 12/01, os peixes avaliados durante o estudo estavam impróprios para consumo. Nas proximidades da ETE-Anchieta, localizada a margem esquerda do rio, a bactéria *S.aureus* foi mais abundante, e nos demais pontos avaliados, *E.coli* e *Enterococcus* foram mais abundantes, tanto na água quanto no peixe. Foi possível concluir que, o uso de *Enterococcus* e *S.aureus* é válido para avaliar não somente a água, como também o peixe, e suas concentrações podem ajudar a avaliar de melhor maneira a contaminação no ambiente. Em relação a legislação, as águas do rio Itanhaém se apresentaram dentro dos limites estabelecidos, porém a análise dos peixes demonstrou que, a longo prazo a contaminação no rio tem causado certo prejuízo ao ambiente.

Palavras-chave: Contaminação, Peixe, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The bacterial microbiota found in live fish is directly related to the microbiota of the environment, in the words, the microorganisms present in their body surface, gills, gastrointestinal tract and muscle are related to the same environment in which it is inserted. Fish naturally have a wide range of bacteria, which may also be commonly found in the water. However, the bacteria of fecal origin, such as *E.coli* and *Enterococci*, are not common inhabitants of the intestinal flora of fish, being his presence linked to contamination by human feces or other warm-blooded animals in the water capture. Thus, the monitoring of the microbiological quality of the water and the fish caught for human consumption, it is necessary, since they can cause harm to human health, causing public health problems. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of fish (*Eugerres brasiliensis*, Curvier 1830) and waters of the estuary of the River Itanhaém, SP (Brazil). Three bacteria were used to assess the microbiological quality of water and fish, two of human fecal origin, *Escherichia coli* and *Enterococci*, and a source not fecal, *Staphylococcus aureus*, all obtained by membrane filtration. The fish were evaluated for their gills and muscle. The results showed that during the entire period of the study, the waters of the river Itanhaém presented within the limits set by legislation CONAMA resolution 357/05, however the use of *E.coli*, proved to be insufficient to assess the quality of the water, since the density of *Enterococci* was high throughout the study in all points analyzed. The analysis of fish, were found high concentrations for the three bacteria used, with the gills presenting with greater number in relation to the muscle. According to the RDC 12/05, the fish were evaluated during the study were unfit for consumption. In the proximity of the ETE-Anchieta, located to the left boarder of the river, the bacteria *S.aureus* was more abundant, in others points assessed, *E.coli* and *Enterococci* were more abundant, both in the water and in fish. It was possible to conclude that the use of *Enterococci* and *S.aureus* is valid to evaluate not only the water, as well as the fish, and their concentrations can help you evaluate the best possible contamination in the environment. The waters of the river Itanhaém presented within the limits laid down, but the fish analysis demonstrated that, in the long term the contamination in river has caused some harm to the environment.

Keywords: Contamination, Fish, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

.Figura 1. Descarte da ETE-Anchieta na margem esquerda do rio Itanhaém.....	17
Figura 2. Mapa do Estuário do Rio Itanhaém, localizado no litoral sul do Estado de São Paulo (2015).....	18
Figura 3. Espécie <i>Eugerres brasiliensis</i> (Cuvier, 1830) utilizada durante o estudo.	19
Figura 4. Mapa do Brasil, com destaque para a costa Sudeste do Estado de São Paulo, na qual se localiza a área de trabalho com os respectivos pontos de coleta no estuário do rio Itanhaém, SP (Município de Itanhém, São Paulo, Brasil).....	30
Figura 5. Em 5a: espécie <i>Eugerres brasiliensis</i> , popularmente conhecida como Caratinga, utilizada no estudo; em 5b: arte de pesca com tarrafa utilizada durante a coleta dos peixes no estuário e 5c: pescadores locais que ajudaram na coleta dos peixes.	31
Figura 6. Em 6a: placa de petri contendo colônias do gênero <i>Enterococcus</i> sp.; e em 6b: teste de confirmação utilizando o meio de cultura Enterococcosel caldo, onde os tubos com enegrecimento apontam como positivo a presença de <i>Enterococcus</i>	32
Figura 7. Em 7a: placas de Petri contendo colônias de bactérias, sendo contabilizado como <i>E.coli</i> as colônias amareladas; e em 7b: teste de confirmação por uréia, sendo confirmado para <i>E.coli</i> as colônias que permanecem amareladas.	33
Figura 8. Placa de Petri contendo o meio de cultura Agar Salt Manitol, onde o meio com crescimento de bactérias da espécie <i>S. aureus</i> fica com a coloração amarela (B), sendo originalmente vermelho (A).	33
Figura 9. Em 9a: Crescimento bacteriano obtido mediante da técnica de plaqueamento com semeadura em superfície utilizado alça de Drigalsk; Em 9b: Alça de Drigalsk utilizada para a realização da técnica.	35
Figura 10. Densidade de <i>E.coli</i> no músculo e nas brânquias de Caratingas capturadas em Itanhém, nos quatro pontos amostrados durante todas as estações do ano (Outono ao Verão).	41
Figura 11. Densidade de <i>Enterococcus</i> sp. no músculo e nas brânquias de exemplares de Caratinga coletados nos quatro pontos amostrados em Itanhém, durante todas as estações do ano (Outono ao Verão).....	44
Figura 12. Comparação dos valores de <i>E.coli</i> e <i>Enterococcus</i> sp. encontrados na água do rio Itanhaém, e músculo e brânquias dos peixes <i>Eugerres brasiliensis</i> em todos os pontos amostrados (1 a 4), durante todas as estações do ano.....	45
Figura 13. Densidade de <i>Staphylococcus aureus</i> no músculo e nas brânquias da Caratinga nos quatro pontos amostrados durante todas as estações do ano (Outono ao Verão).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontos de coleta, com suas respectivas coordenadas geográficas e registro fotográfico dos pontos amostrados.....	29
Tabela 2. Resultados dos parâmetros físico-químico da água encontrados durante todo o estudo (Maio/2014 a Janeiro/2015) nos quatro pontos amostrados.	38
Tabela 3. Densidades de <i>E.coli</i> encontradas nas diferentes partes do peixe (músculo e brânquias) e na água dos pontos amostrados nas quatro estações do ano.	40
Tabela 4. Valores de correlação de pearson entre a densidade de <i>E.coli</i> na água e nas brânquias dos peixes durante as estações do ano.	41
Tabela 5. Valores de correlação de pearson entre a densidade de <i>E.coli</i> na água e na musculatura dos peixes durante as estações do ano.....	42
Tabela 6. Densidades de <i>Enterococcus</i> sp. encontradas nas diferentes partes do peixe (músculo e brânquias) e na água dos pontos amostrados nas quatro estações do ano.	43
Tabela 7. Valores de correlação de pearson entre a densidade de <i>Enterococcus</i> sp. na água e nas brânquias dos peixes coletados em Itanhaém, durante as estações do ano.	46
Tabela 8. Valores de correlação de pearson entre a densidade de <i>Enterococcus</i> sp. na água e na musculatura dos peixes durante as estações do ano.....	46
Tabela 9. Densidades de <i>Staphylococcus aureus</i> encontradas nas diferentes partes do peixe (músculo e brânquias) e na água dos pontos amostrados nas quatro estações do ano.....	48
Tabela 10. Valores de correlação de pearson entre a densidade de <i>S.aureus</i> na água e nas brânquias dos peixes durante as estações do ano.....	49
Tabela 11. Matriz de correlação de pearson entre a densidade de <i>S.aureus</i> . na água e na musculatura dos peixes durante as estações do ano.....	49
Tabela 12. Matriz de Correlação (Pearson) entre os parâmetros ambientais e as densidade bacterianas encontradas no ponto 1.....	50
Tabela 13. Matriz de Correlação (Pearson) entre os parâmetros ambientais e as densidade bacterianas encontradas no ponto 2.....	51
Tabela 14. Matriz de Correlação (Pearson) entre os parâmetros ambientais e as densidade bacterianas encontradas no ponto 3.....	51
Tabela 15. Matriz de Correlação (Pearson) entre os parâmetros ambientais e as densidade bacterianas encontradas no ponto 4.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Estuário do rio Itanhaém	16
2.2 <i>Eugeres brasilianus</i> – “Caratinga”	18
2.3 Microrganismos Indicadores	19
2.4 <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	20
2.5 <i>Enterococcus</i> sp.	21
2.6 <i>Staphylococcus</i> sp.	22
2.7 Contaminação de peixes por microrganismos de origem fecal	24
2.8 Legislação Brasileira para corpos d’água e pescado.....	25
3 HIPÓTESE	27
4 OBJETIVOS.....	27
5 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 Coleta de amostras	28
5.2 Análises microbiológicas	31
5.3 Tratamento de dados	35
6 RESULTADOS	37
6.1 Parâmetros físico-químicos da água	37
6.2 <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	38
6.3 <i>Enterococcus</i> sp.	42
6.4 <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S.aureus</i>)	46
6.5 Densidades microbianas e as variáveis ambientais.....	50
7 DISCUSSÃO.....	53
8 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

Os peixes, assim como os chamados frutos do mar, estão expostos a diversos tipos de contaminação desde a sua captura até o seu consumo. Mesmo com a garantia de refrigeração no transporte e cuidados de higiene em seu manuseio e preparo, se o peixe for retirado de locais contaminados por microrganismos patogênicos os riscos à saúde do homem ainda estão presentes (COSTA, 1998; NOVOTNY *et al.*, 2004).

A microbiota bacteriana encontrada nos peixes vivos está diretamente relacionada à microbiota do ambiente, ou seja, os microrganismos presentes em sua superfície corporal, brânquias, musculatura e no trato gastrointestinal, estão relacionados quali e quantitativamente às características microbiológicas do ambiente. Portanto não é suficiente apenas monitorar a qualidade dos produtos de origem marinha, mas também a água de onde provém (PAL E DASGUPTA, 1992; SIPAÚBA-TAVARES, 1994; MOLLERKE *et al.*, 2002; GUZMÁN *et al.*, 2004).

Para o monitoramento da qualidade microbiológica tanto da água, quanto de alimentos de origem aquática, são utilizados o número de microrganismos indicadores de contaminação fecal e não-fecal. Dentre as bactérias que podem ser encontradas tanto na água como também nos peixes estão aquelas pertencentes a Família Enterobacteraceae (Enterobactérias) à qual pertencem as bactérias do grupo coliformes e, segundo Jay (1994), a presença de coliformes de origem fecal (*Escherichia coli*) oferece os maiores riscos à saúde do consumidor. Outros gêneros como *Staphylococcus* sp., também são encontrados em água e em tecidos de organismos aquáticos (BROWN e DORN, 1977; FELDHUSEN, 2000).

Dentro do gênero *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus aureus* se destaca por sua patogenicidade ao homem, sendo responsável por surtos de intoxicação alimentar, decorrentes da formação de toxinas estafilocócicas no alimento (MURATORI *et al.*, 2007). Sua presença no peixe está mais relacionada com o manuseio inadequado e preparo pelo manipulador, porém também pode ser encontrada no meio ambiente (FRAZIER e WETHOFF, 1988). Por sua patogenicidade ao homem, a legislação vigente a utiliza como parâmetro microbiológico de qualidade dos alimentos. Segundo a resolução RDC nº12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), para o pescado “*in natura*” os parâmetros microbiológicos devem compreender a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo, as quais devem ser menores que 10^3 g^{-1} de pescado e

também a *Salmonella* sp, que deve estar ausente nestes produtos. A Legislação CONAMA 357/05 entretanto, não prevê a avaliação de *Staphylococcus* sp. e nem tão pouco de *Salmonella* sp. em corpos hídricos.

O gênero *Escherichia* sp., tem a *Escherichia coli* (*E.coli*) como a espécie mais abundante, sendo considerada a bactéria representante do grupo dos coliformes fecais. Está relacionada com doenças do trato digestivo e infecções urinárias que podem variar, em gravidade, desde formas extremamente benignas até formas que podem ser mortais, dependendo de fatores como o tipo de estirpes patogênicas, a susceptibilidade do paciente e o grau de exposição (MURATORI, 2000; BRASIL, 2004).

De acordo com a Resolução CONAMA 357/05, seção IV, sobre as águas salobras, artigo 21, II i, para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras de água coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mililitros, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mililitros. Esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras. Para os demais usos não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros 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. (BRASIL, 2005).

A legislação Brasileira não utiliza a contagem de *Enterococcus* sp. e *E.coli* em alimentos, e por mais que diversos estudos (CABELLI *et al.*, 1982; INGHAM e SCHMIDT, 2000; CUNHA E SILVA, 2006; AMARAL, 2007; GOMES, 2007; MARTINEZ e OLIVEIRA, 2010) já tenham comprovado que estes grupos de microrganismos poderiam ser utilizados como indicadores de contaminação de Alimentos, principalmente em produtos provenientes de atividade de pesca, nem a RDC 12/01, nem tão pouco a CONAMA 357/05 consideram a avaliação deste grupo como parâmetro, embora seja este o parâmetro atualmente mais utilizado para avaliar a qualidade de águas recreacionais marinhas.

Estas divergências na legislação são particularmente importantes em áreas utilizadas para criação e ou extração de alimentos, como é o caso do Estuário do Rio Itanháem, localizado no litoral sul do Estado de São Paulo. Este estuário pode ser classificado como de

águas Salinas e Salobras, sendo considerado de classe 2 (CONAMA nº 357/05) segundo a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – CETESB, por ainda não ter sido objeto de enquadramento (CETESB, 2013).

Apesar de ser considerado um rio ainda bastante preservado em suas margens, o rio Itanhaém sofre a pressão de áreas de expansão urbana desordenada, principalmente a margem esquerda, porção mais próxima ao mar (CETESB, 20013), estando exposto a vários impactos potencialmente degradantes, sendo assim importante o uso destes parâmetros microbiológicos para monitoramento da qualidade da água deste estuário.

Dentre as atividades impactantes, recorrentes na região, que podem alterar a qualidade da água e do pescado, estão o recebimento de esgoto doméstico sem tratamento e as influências indiretas da disposição de resíduos domésticos em lixões (SERIANI *et al.*, 2006). Somente 9% do esgoto do Município de Itanhém é coletado, e destes, apenas 81% são tratados nas duas estações de tratamento de esgoto (ETE) da cidade (CETESB, 2013). Além disso, por ser um rio navegável, o rio Itanhaém abriga inúmeras marinas, que também contribuem com a contaminação da água (CETESB, 2013).

Estas atividades impactantes, podem colocar em risco a vida aquática local, ameaçando também a exploração econômica dos recursos biológicos, trazendo efeitos negativos para a economia e para a saúde humana, já que muitas atividades extrativistas acontecem na região, sendo a pesca artesanal uma das mais importantes. A pesca artesanal é, em grande parte, praticada por pescadores autônomos que exercem esta atividade individualmente, ou em parcerias com outros pescadores. Boa parte dos peixes capturados são destinados à consumo próprio ou familiar, porém existe uma pequena porção que é destinada ao comércio (SERIANI, 2008; MACHADO *et al.*, 2010). Das espécies de peixes consumidas pela população local, a que apresenta maior frequência na pesca é a *Eugerres brasilianus* (CURVIER, 1830), popularmente conhecida como “Carantiga”.

Embora diversos estudos ecotoxicológicos realizados com sedimento e com a água desta região (ABESSA *et al.*, 2006; CAMARGO e BIÚDES, 2006; BIÚDES e CAMARGO, 2006; SERIANI *et al.*, 2006; 2008) terem considerado a água do estuário de boa qualidade, poucos são os estudos relacionados com a qualidade microbiológica da água e do pescado. Segundo a Cetesb (2013), o rio apresenta qualidade microbiológica sempre dentro dos limites impostos pela legislação, porém seu monitoramento é somente realizado na foz do rio.

Diante a esta problemática, e visto que a água pode ser uma via de contaminação para o peixe, e seu consumo pode acarretar problemas de saúde pública, e considerando a escassez de dados sobre o uso de *Enterococcus* sp. e *E.coli* para avaliar não somente a água, mas também a qualidade microbiológica do peixe no ambiente natural, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica das águas e de peixes capturados pela pesca artesanal no estuário do rio Itanhaém, utilizando indicadores microbiológicos de origem fecal e não-fecal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estuário do rio Itanhaém

O Estuário do Rio Itanhaém (24° 16'59''S, 46°47'20''W) (Figura 2), situado no Litoral Sul do estado de São Paulo, está inserido dentro da Bacia Hidrográfica do Rio Itanhaém considerada uma das maiores bacias litorâneas do Estado de São Paulo (LAMPARELLI, 1999). Com aproximadamente 930 km², a bacia do Rio Itanhaém pode ser dividida em 4 regiões de acordo com a altitude, declividade e geomorfologia (CAMARGO *et al.*, 1997).

A porção superior está localizada no entorno da cidade de São Paulo e encontra-se inserida em duas áreas de proteção ambiental: o Parque Estadual da Serra do Mar (PESM) e a Área de Proteção Ambiental (APA) “Capivari-Monos”. Logo abaixo desta porção, entre 700 e 50 metros está a região íngreme de Serra, que ainda está inserida no PESM. A planície costeira, região de baixo relevo composta por depósitos quaternários, é formada principalmente por vegetação de restinga e floresta herbáceo-arbustiva que é parcialmente afetada por pressões antropogênicas de agricultura (plantação de banana) e urbanização. A porção inferior da bacia esta coberta por manguezais em torno de rios e canais, e, é em grande parte afetada pela urbanização descontrolada e descarga de esgoto (CAMARGO *et al.*, 1997; NOGUEIRA, 2001; PEREIRA, 2002).

O canal do Rio Itanhaém é formado por quatro rios principais: os Rios Branco, Mambu, Preto e Aguapeú. Os Rios Branco e Mambu possuem origem no planalto, percorrendo vales e porções íngremes da Serra do Mar até chegar a planície costeira. As cabeceiras de Aguapeú originam-se a 400 metros da Serra do Bariri. O Rio Preto tem sua origem em três áreas diferentes, a maioria das suas cabeceiras estão acima de 700 metros em uma região bem preservada no interior do PESM. Outros riachos de cabeceira originam-se a 400 metros em uma área parcialmente ocupada pela agricultura, conhecida como Serra dos Itatins (FEREIRA e PETRERE, 2009). Contudo, os rios Branco e Preto, são considerados os canais principais, e em confluência formam o Rio Itanhaém (BATRES, 1978).

O Rio itanhaém conta com aproximadamente 7 km de extensão até a foz, apresentando como afluentes menores os rios Guapurá, Cabuçú, Negro Morto, Volta Deixada, Campininha e do Poço. Por percorrer área de pequena declividade, o Rio apresenta baixa turbulência de

suas águas, com o fluxo e características hidrológicas acompanhando variações sazonais da pluviosidade local (CAMARGO e FLORENTINO, 2000). Sua porção estuarina (porção inferior do rio), apresenta dinâmica hidrogeológica bastante dinâmica e complexa devida a grande influência das marés e das condições climáticas e hidrológicas da região (LAMPARELLI, 1999).

Sua porção inferior, que apresenta uma extensa área de manguezal em suas margens, é considerada um grande berçário natural para muitas espécies de peixes, que adentram no estuário em busca de abrigo e alimento (SOUZA-PEREIRA e CAMARGO, 2004). Dentre as espécies que podem ser encontradas tem-se: pescada (*Cynoscion* spp.), corvina (*Micropogonias furnieri*), bagre (*Genidens* spp.), tainha (*Mugil liza*), parati (*Mugil curema*), robalo (*Centropomus* spp.), cação (*Carcharhinus* spp.), sororoca (*Scomberomorus brasiliensis*), salteira (*Oligoplites*), espada (*Trichiurus lepturus*) e caratinga (*Eugerres brasiliensis*) (FEREIRA e PETRERE, 2009; MACHADO *et al.*, 2010; MOTTA, *et al.*, 2014).

Apesar da vegetação apresentar condições favoráveis de preservação, intervenções antrópicas recentes, advindas de incrementos da ocupação na região litorânea do município, tem causado crescente alteração e degradação (CAZZOLI, 1997). Na porção superior do estuário, no rio Branco, à margem direita, está localizado o sistema de captação Mambu, que é realizado através de uma barragem de concreto estrutural para elevação do nível d'água, apresentando capacidade máxima de captação na ordem de 750L/s. Além disso, o rio recebe desde de 2002 efluentes domésticos da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) – Anchieta, localizada a margem esquerda do rio (Figura 1 e 2).



Figura 1. Descarte da ETE-Anchieta na margem esquerda do rio Itanhaém.

Implantada em 2001, e em funcionamento desde de 2002, a ETE do rio Itanhaém abrange somente 9% do esgoto produzido pelo município, tratando 81% deste esgoto (PAGANI, 2003). Com o sistema de tratamento do tipo “unitank” (conjunto de tanques de aeração e clarificação) possui capacidade de 207 L/s (ITANHAÉM, 2010). De acordo com a Prefeitura do município (ITANHAÉM, 2010), uma nova ETE está sendo construída a margem direita do estuário, e terá capacidade de tratamento de 574L/s. Segundo a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), responsável pelas obras de expansão das ETEs, pretende-se abranger 100% da coleta de esgoto do município até 2018.

Além desta conhecida descarga de efluentes domésticos, o estuário de Itanhaém ainda recebe esgotos provenientes das habitações que não possuem rede coletora de esgoto, e inserção de lixo pela população que reside na região (NOGUEIRA, 2001).

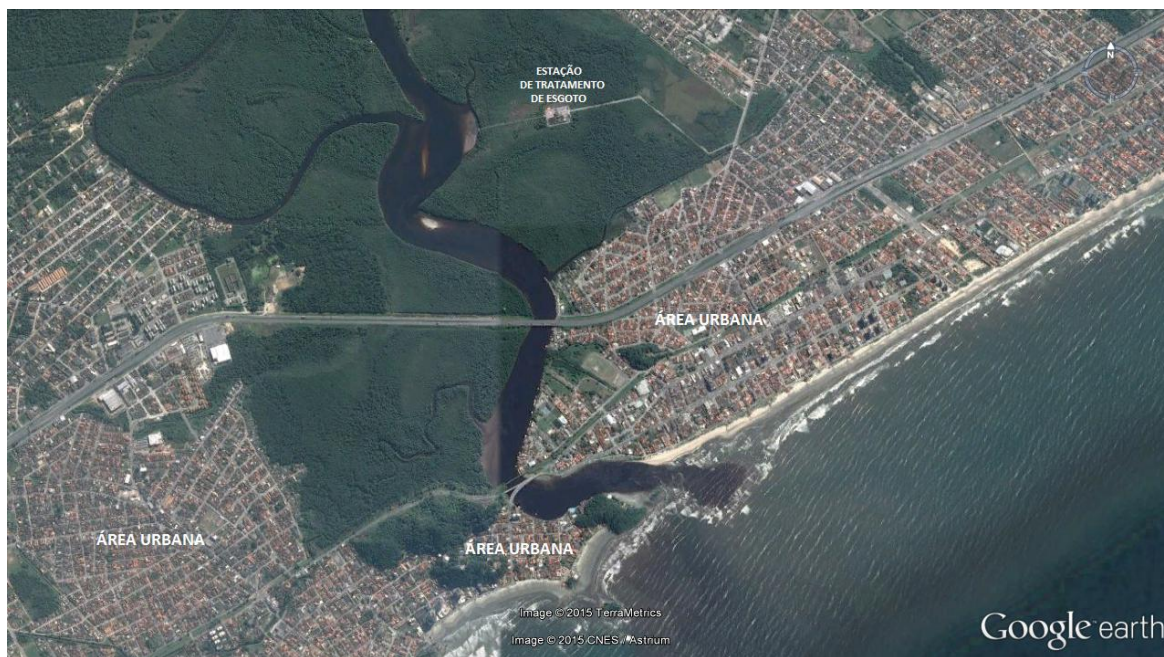


Figura 2. Mapa do Estuário do Rio Itanhaém, localizado no litoral sul do Estado de São Paulo (2015).

2.2 *Eugerres brasilianus* – “Caratinga”

A espécie *Eugerres brasilianus*, pertencente a família Gerreidae, é comumente encontrada em todo o litoral brasileiro, principalmente em regiões estuarinas, onde são capturadas pela pesca artesanal ou de subsistência (MENEZES e FIGUEIREDO, 1980; BARBOSA, 2012). Segundo Cervigón *et al.* (1992) e Floeter *et al.* (2003), o *E. brasilianus* distribui-se no Atlântico Ocidental, desde a Carolina do Sul (Estados Unidos) até Santa Catarina (Brasil).

Esta espécie de Gerreidae é a que alcança maior tamanho, com os maiores exemplares medindo cerca de 40cm. Possui boca pontuda e muito protusível, capaz de se estender em forma de tubo durante a alimentação (BARBOSA, 2012). Possuem corpo comprimido lateralmente, coberto por escamas ciclóides, com altura variável, apresentando coloração prateada com a parte superior do corpo mais escura, nadadeira dorsal e anal com base revestidas por escamas e nadadeira caudal bifurcada (MENEZES e FIGUEIREDO, 1980; BARBOSA, 2012) (Figura 3).

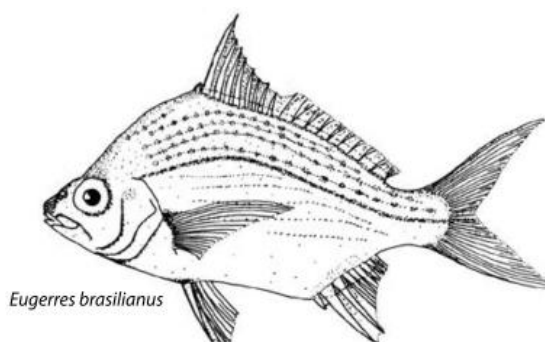


Figura 3. Espécie *Eugerres brasiliensis* (Cuvier, 1830) utilizada durante o estudo.

Segundo Paiva (2009), esta espécie está associada a ambientes com níveis de salinidade elevada (20 a 37) e é abundante durante o período seco. Possui hábitos alimentares típicos de espécies demersais e alimenta-se, principalmente, de invertebrados presentes no substrato, assim como grande parte dos representantes de sua família (PAIVA *et al.*, 2008).

A ocorrência de *E. Brasilianus* foi documentada em diversos trabalhos realizados no Estuário do Rio Itanhaém (QUIÑONES, 2000; FERREIRA e PETRERE, 2009; MACHADO *et al.*, 2010; MOTTA *et al.*, 2014) como componente da Ictiofauna da região sendo encontrada em abundância, apresentando elevada frequência de captura, com grande representatividade na pesca artesanal e de subsistência, além de boa aceitação no mercado local.

2.3 Microrganismos Indicadores

A poluição hídrica é um dos grandes problemas ambientais da atualidade, e está comumente associada com a descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas (MASON, 1996). Microrganismos indicadores de contaminação tem sido utilizados há décadas para avaliar, monitorar e controlar a qualidade da água, e este monitoramento é um procedimento importante na proteção dos ecossistemas aquáticos.

A utilização de microrganismos indicadores é extremamente útil, principalmente para a avaliação de impactos ambientais decorrentes de descargas pontuais dos diferentes tipos de efluentes, sendo possível monitorar as estações de amostragem a montante, no local do lançamento e a jusante da fonte poluidora (CALLISTO *et al.*, 2003).

A presença de microrganismos patogênicos na água, geralmente está relacionada à poluição dos corpos hídricos por fezes humanas e de animais, provenientes de águas residuárias urbanas e rurais. Sendo assim, o uso de indicadores de contaminação fecal torna-se o melhor para avaliar a qualidade microbiológica da água (GONZALEZ *et al.*, 1982).

As bactérias do grupo dos coliformes são comumente utilizadas como indicadores microbiológicos da presença de fezes no ambiente, sendo a contagem de coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli* comumente utilizada para monitorar a qualidade das águas recreativas ou potáveis (BRASIL, 2005). Outro grupo de bactérias, como *Enterococcus* sp., também é utilizado para avaliar a qualidade das águas marinhas e salobras, pois a ausência de *E.coli* não significa que não possam existir outros grupos de patógenos de origem fecal (CETESB, 2001).

Além destas duas bactérias, a presença de *Staphylococcus aureus* no ambiente aquático tem sido relacionada ao número de banhistas usuários dos corpos hídricos, pois esta bactéria é habitante natural da superfície do corpo humano, podendo ser considerada um indicador de risco para a saúde do homem. Sua resistência na água do mar (por até 96 horas), sugere sua importância como indicadora de poluição antrópica (VIEIRA, 2004).

2.4 *Escherichia coli* (*E.coli*)

E.coli é uma bactéria gram-negativa da família *Enterobacteriaceae*, não esporulada, anaeróbia facultativa, fermentativa, em sua maioria móveis (flagelos peretriqueos) e crescem em temperaturas de 18 a 44°C. Metaboliza uma ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos, produzem catalase, e utiliza glicose, amônia e nitrogênio como fontes de carbono (BRASIL, 2001).

As colônias de *E. Coli*, quando cultivadas em meios sólidos, apresentam cerca de 1 a 3mm de diâmetro e, podem apresentar aspecto rugoso, grosseiro e com contornos irregulares, ou aspecto liso com colônias lisas, convexas, brilhantes e com bordos regulares (MURATORI, 2000).

Seu principal habitat é o trato intestinal dos seres humanos e de outros animais homeotérmicos. A maioria de seus sorogrupos fazem parte da flora comensal do intestino dos mamíferos, no entanto certos sorotipos são patogênicos para o homem e para outros animais e não são considerados como integrantes da flora intestinal normal (PELCZAR *et al.*, 1996). Sua incidência tem sido relacionada com doenças do tubo digestivo e infecções, que podem variar, desde formas benignas até formas que podem ser mortais, dependendo de fatores como o tipo de estirpes patogênicas, a susceptibilidade do paciente e o grau de exposição (MURATORI, 2000; BRASIL, 2004).

Considerada a representante do grupo dos coliformes fecais, a contagem de *E.coli* tem sido extensivamente utilizada nos monitoramentos de qualidade das águas. A resolução CONAMA 357/05 afirma que a *E.coli* pode substituir o parâmetro de coliformes termotolerantes, e visto que são restritas ao trato intestinal de animais homeotérmicos, são consideradas por diversos autores como mais significativas que os coliformes totais para expressar poluição ambiental de origem fecal (FRAZIER e WESTHOFF, 1988; NASCIMENTO *et al.*, 2001; MASCARENHAS *et al.*, 2002; CONCEIÇÃO, 2011).

A legislação não indica o uso, nem tão pouco valor limite para *E.coli* em alimentos, porém analisar sua presença é de extrema importância, já que está relacionada a contaminação de origem fecal e à qualidade higiênica (AGNESE *et al.*, 2001; LOREZON, 2009).

2.5 *Enterococcus* sp.

Este gênero compreende cocos Gram-positivos que ocorrem isolados, aos pares ou em pequenas cadeias. São anaeróbios facultativos, alguns são móveis e a temperatura ótima de crescimento é de 35 a 37°C. Caracterizam-se pela alta tolerância às condições adversas de crescimento, como a capacidade de sobreviver na presença de 6,5% de cloreto de sódio (halotolerantes), em pH 9,6 e em ampla faixa de temperatura (de 10 a 45°C) (FATTAL *et al.*, 1987; BRASIL, 2000; BRASIL, 2005).

Atualmente estão descritas 30 espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*, com a espécie *E. faecalis* sendo a predominante, além dela *E. faecium*, *E. hirae*, *E. avium* e *E. durans* também são comumente encontradas. Dentre essas espécies *E. faecalis* e *E. faecium* estão presentes em fezes humanas (ANDRE *et al.*, 2005).

Devido a alta concentração nas fezes e a sua alta capacidade de sobrevivência no ambiente, principalmente os salobros e salinos, o grupo *Enterococcus* tem sido proposto como indicador de contaminação fecal complementar aos coliformes fecais (*E.coli*) (USEPA, 2000; RIBEIRO, 2002; ANDRE *et al.*, 2005). Além disto, cabe salientar que *Enterococcus* sp. têm demonstrado um tempo maior de sobrevivência na água, principalmente a marinha, e apesar de serem menos numerosos do que *E.coli* em fezes humanas, eles ainda são abundantes o suficiente para serem detectados, mesmo após diluição significativa (RIBEIRO, 2002). Choi *et al.* (2003) verificaram que além de terem sobrevivido por mais tempo, *Enterococcus* sp. se apresentaram mais resistentes aos processos de tratamento de efluentes quando comparados a *E.coli*, havendo boa correlação deste microrganismos com a presença de microrganismos patogênicos.

O CONAMA em sua resolução 274/00, propõe o uso do gênero *Enterococcus* para indicar a presença de contaminação de origem fecal, afim de avaliar a qualidade sanitária das águas para balneabilidade das praias, porém os limites propostos limitam-se a águas marinhas.

A presença de coliformes fecais (*E.coli*) e do gênero *Enterococcus* são frequentemente determinadas em amostras de água, e apesar de insuficiente a legislação sugere o uso destas como parâmetro microbiológico para avaliar certos tipos de água (*Enterococcus* sp. para água marinha e *E.coli* para as demais). Apesar de diversos estudos já terem relatado a eficiências de *Enterococcus* como indicadores de contaminação fecal em alimentos, principalmente nos frutos do mar (CABELLI *et al.*, 1982; INGHAM e SCHMIDT, 2000; CUNHA E SILVA, 2006; AMARAL, 2007; GOMES, 2007; MARTINEZ e OLIVEIRA, 2010), nenhuma legislação vigente as utiliza para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos, o que é extremamente preocupante devido ao fato que o consumo de qualquer alimento contendo estes microrganismos pode acarretar problemas a saúde do homem.

2.6 *Staphylococcus* sp.

Pertencente à família Micrococcaceae, as bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem células esféricas, gram-positivas, podem ser encontradas isoladas, aos pares ou em agrupamentos irregulares, são imóveis e não esporuladas, anaeróbias facultativas, quimiorganotróficas com metabolismos fermentativo e respiratório, e sua temperatura ótima de crescimento varia entre 30 e 37°C (HOLT *et al.*, 1994).

Muitas espécies são patogênicas para o ser humano e animais, uma vez que produzem toxinas extracelulares. Entretanto, *Staphylococcus aureus* é a espécie coagulase positivo de maior importância (HOLT *et al.*, 1994; LOREZON, 2009).

O *S.aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns e, seu habitat é amplo tornando sua presença largamente distribuída na natureza, onde sobrevivi muito bem. Entretanto, *S. aureus* é também integrante da microbiota da superfície e da mucosa humana (CASTRO *et al.*, 1984) e por isto sua presença muitas vezes é relacionada à contaminação de alimentos por manipulação humana. Produz uma série de enzimas que podem contribuir para a sua patogenicidade, tais como a coagulase, catalase, desoxirribonuclease (DNAse), lipase, termonuclease (TNase) e toxinas hemolíticas, cuja produção está associada com sua virulência (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Esta bactéria é responsável por surtos de intoxicação de origem alimentar, devido a ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, representando um risco para a saúde pública, sendo considerado o agente reponsável por, aproximadamente, 45% das toxinfecções no mundo (CUNHA NETO *et al.*, 2002).

Por sua contaminação estar mais vinculada ao alimento, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da legislação RDC 12/01, impôs limites aceitáveis de estafilococos coagulase positivo (*S.aureus*) nos alimentos.

Entretanto, a presença de *S. aureus* não é apenas importante para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos pois, estudos relacionados com a qualidade de águas recreacionais verificaram a importância do uso deste microrganismo como indicador de contaminação de origem não-fecal na água. Vários estudos encontraram *S.aureus* sendo o principal agente etiológico de doenças transmitidas por água contaminada por animais, pessoas doentes, e portadores assintomáticos (TOOD, 1977; VERHOEF, 1981; HAGLER, 1896; HAGLER, 1990). Hagler (1990), apontou *S.aureus* como patógeno oportunista, e relatou sua frequência inclusive em águas de piscinas cloradas e em águas de praias onde o índice de coliformes satisfazia o padrão de balneabilidade. O autor ainda afirmou que *S.aureus* pode ser considerada indicador de poluição recente, salvo sua curta duração em águas, principalmente marinhas (96 horas).

Sendo assim, a contagem de *S.aureus* pode ser um bom indicador de contaminação de origem não-fecal no monitoramento de águas, para evitar surtos de infecções ocasionadas por seu contato e ingestão através da água, o que é muito importante pois, segundo Tortora (2006), estes microrganismos desenvolvem rapidamente resistência a numerosos agentes antimicrobianos, constituindo problemas terapêuticos difíceis.

2.7 Contaminação de peixes por microrganismos de origem fecal

A penetração e estabelecimento de microrganismos nos diferentes tecidos e órgãos dos peixes, tais como tubo digestivo, brânquias, músculo, rim, fígado e bexiga natatória está diretamente relacionada à microbiota da água onde ele vive (MOLLERKE *et al.*, 2002). Assim, peixes capturados em ambientes poluídos por esgotos, dejetos e fezes, podem albergar microrganismos patogênicos existentes nestes tipos de poluentes (GUZMÁN *et al.*, 2004).

De acordo com Pal e Dasgupta (1992), a concentração bacteriana nos diferentes órgãos e tecidos dos peixes aumenta com o aumento da carga bacteriana da água, bem como o grau de contaminação bacteriológica dos alimentos consumidos por eles. No entanto, a concentração de bactérias em diferentes tecidos e órgãos varia muito em função das diferentes espécies de peixes e a duração da exposição à água contaminada (GUZMÁN *et al.*, 2004).

Contudo, os peixes possuem diferentes mecanismos de proteção natural, que ajudam a mantê-los livres de inúmeros agentes infecciosos presentes na água. O primeiro mecanismo de defesa é o tegumento externo, que é coberto por uma espessa camada de muco que impede a fixação e crescimento de microrganismos. O segundo mecanismo de defesa é interno, realizado pelos órgãos linfóides, tais como o baço e o rim, que eliminam de forma eficiente vários tipos de antígenos (LAMERS e DE HAAS, 1985). Além disso, as células integrantes do sistema imunológico de peixes tais como linfócitos, neutrófilos e macrófagos, atacam e combatem invasores microbianos (TRUST, 1986).

Estes mecanismos de defesa possuem uma “concentração limiar”, que representa o limite de exposição que o peixe pode sofrer sem se contaminar, quando este limite é ultrapassado, a defesa natural não é mais eficaz, propiciando a invasão dos microrganismos (BURAS *et al.*, 1987). Ao quebrar estas barreiras imunológicas, os microrganismos além de conseguir penetrar nos diferentes tecidos e órgãos dos peixes, podem sobreviver e se acumular nos mesmos (BURRAS *et al.*, 1985; PAL e DASGUPTA, 1991; FATTAL *et al.*, 1992).

A “concentração limiar” é variável de acordo com a espécie do peixe, e o tempo de exposição ao poluente na água. Diversos estudos com tilápias já relataram que em concentrações de coliformes fecais acima de 10^4 UFC 100mL⁻¹ na água já é possível verificar sua presença também na musculatura do peixe, em situações de exposição à esgoto tratado (BURRAS *et al.*, 1985; FATTAL *et al.*, 1993; EL-SHAFAI *et al.*, 2004).

Nascimento *et al.* (2001), relacionaram o grau de contaminação do rio Bacanga em São Luís (MA) com a qualidade microbiológica dos peixes e sururus capturados no local, e verificaram que os altos valores de coliformes totais e termotolerantes encontrados no estudo indicaram a presença de uma fonte poluidora constante no local e o perigo dos peixes provocarem infecções ou intoxicações ao consumidor.

Sendo assim, os produtos de pesca oriundos de sistemas poluídos passam a ser importantes veículos de grande número de microrganismos, entre eles os patogênicos ao ser humano, sendo necessário o constante monitoramento destas áreas, bem como sua preservação em padrões aceitáveis de qualidade.

2.8 Legislação Brasileira para corpos d’água e pescado

Manter a qualidade ambiental de um sistema hídrico é difícil e caro, normalmente os países estabelecem normas contendo parâmetros e limites básicos de classificação dos corpos d’água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. No Brasil, cabe ao Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA estabelecer normas de qualidade ambiental, sendo a Resolução 357/2005, a qual dispõe sobre a classificação dos corpos d’água, bem como as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, estabelecendo as condições e padrões de lançamentos de efluentes, e de outras providências (BRASIL, 2005; ESCHRIQUE *et al.*, 2011).

A resolução CONAMA 357/2005 para águas Salobras de Classe 2, propõe a avaliação das condições microbiológicas da água através da contagem de coliformes termotolerantes ou *E.coli* em sua substituição, sendo que a concentração de termotolerantes não deverá exceder um limite de 2500 por 100mL 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 (CONAMA 357/05, Seção IV, Artigo nº22, Id).

O estabelecimento de normas para qualidade de produtos alimentares cabe a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, sendo a resolução RDC nº12/2001, a qual dispõe as diretrizes e limites bacteriológicos que os alimentos devem apresentar para estarem aptos ao consumo humano.

De acordo com a RDC 12/01, o pescado “*in natura*” deve ser ausente de *Salmonella* sp./25g e apresentar valor $<10^3$ /g de estafilococos coagulase positiva, que veio em substituição a *Staphylococcus aureus*, que quando necessário pode ser identificada a fim de se obter dados de interesse à saúde pública (BRASIL, 2001).

A legislação não utiliza microrganismos indicadores de contaminação fecal na avaliação de qualidade de produtos de pesca, bem como não utilizam outros microrganismos de origem não fecal, mas que podem causar algum dano a saúde do homem, na análise de qualidade da água. Diversos estudos já relataram inúmeros microrganismos tanto para alimentos como para a água que poderiam ser utilizados para indicar da melhor maneira a contaminação, porém a movimentação governamental parece relutante e inexistente na melhoria de tais parâmetros (GONZALEZ e PARANHOS, 2010).

3 HIPÓTESE

Diante a todas as informações tratadas, a hipótese fundamental do trabalho é que as atividades impactantes recorrentes no estuário do rio Itanhaém estejam comprometendo a qualidade microbiológica das águas e do pescado que é capturado.

4 OBJETIVOS

O objetivo principal do estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de peixes e das águas do estuário do rio Itanhaém, visando:

- 4.1. Determinar as densidades de *Enterococcus* sps, *E.coli* e *Staphylococcus aureus* presentes nas águas e na “Caratinga” capturadas no estuário;
- 4.2. Analisar qual das bactérias ou grupo de bactérias indicadoras avaliadas mostram melhores resultados em relação ao grau de contaminação do pescado e da água do qual são extraídos, propiciando uma maior segurança quanto ao consumo por humanos;
- 4.3. Comparar os valores de densidade com os limites estabelecidos pelas legislações vigentes;
- 4.4. Avaliar a influência da contaminação da água sob os diferentes órgãos e tecidos da “Caratinga”;
- 4.5. Relacionar as densidades bacterianas com os fatores abióticos coletados na região.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta de amostras

As campanhas foram realizadas de maio de 2014 a janeiro de 2015, sendo uma em cada estação do ano: maio/14, julho/14, outubro/14 e janeiro/15 representando, respectivamente, Outono, Inverno, Primavera e Verão.

As amostras de água e de peixe foram coletadas em quatro áreas distintas, nomeadas como “pontos” para melhor compreensão (Tabela1; Figura 4), que foram selecionados de acordo com informações dadas pelos pescadores locais, como áreas de intensa atividade de pesca. Todas as coletas foram realizadas durante a maré vazante.

O ponto 1, está localizado bem próximo a ETE-Anchieta, o ponto 2 abrange a zona máxima de turbidez do estuário, o ponto 3 está localizado próximo as marinas (Garagem de barcos) e o ponto 4 está localizado mais próximo a desembocadura do rio (Figura 4).

Tabela 1. Pontos de coleta, com suas respectivas coordenadas geográficas e registro fotográfico dos pontos amostrados.

Área	Coordenadas Geográficas (°)	Registro Fotográfico
Área 1	46°48'08"O, 24°10'17"S	
Área 2	46°47'45"O, 24°10'51"S	
Área 3	46°47'52"O, 24°11'16"S	
Área 4	46°47'43"O, 24°11'23"S	

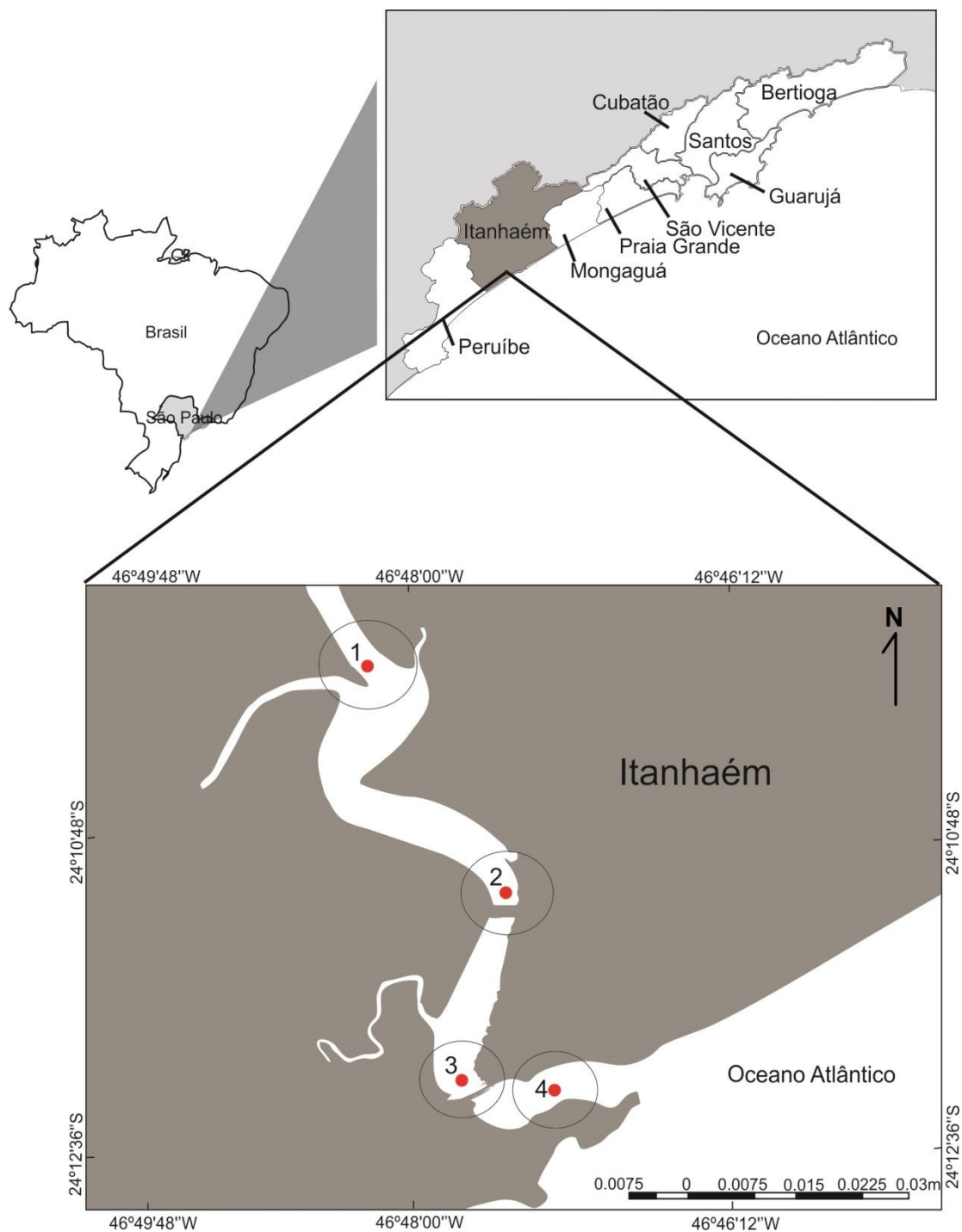


Figura 4. Mapa do Brasil, com destaque para a costa Sudeste do Estado de São Paulo, na qual se localiza a área de trabalho com os respectivos pontos de coleta no estuário do rio Itanhaém, SP (Município de Itanhém, São Paulo, Brasil).

Em cada ponto foram coletados uma amostra de água e três peixes da espécie *Eugerres brasilianus* (Cuvier, 1830) (Figura 5a), popularmente conhecida por “Caratinga”, que é uma espécie abundante durante todo ano, segundo os pescadores locais, e bastante consumida pela população da região, totalizando 48 peixes analisados durante todo o estudo.

A pesca foi realizada utilizando-se rede do tipo tarrafa manuseada pelos pescadores, que contribuíram com o estudo (Figura 5b,c).



Figura 5. Em 5a: espécie *Eugerres brasiliensis*, popularmente conhecida como Caratinga, utilizada no estudo; em 5b: arte de pesca com tarrafa utilizada durante a coleta dos peixes no estuário e 5c: pescadores locais que ajudaram na coleta dos peixes.

Para coleta de água foram utilizados frascos esterilizados contendo EDTA e Tiossulfito de Sódio (Neutralizadores de metais pesados e de Cloro na água, respectivamente), e para os peixes sacos esterilizados. As amostras foram mantidas sob refrigeração até seu processamento no Laboratório de Microbiologia Marinha (MICROMAR), localizado na UNESP (Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”) - Campus Experimental do Litoral Paulista, o qual não ultrapassou 24 horas.

No momento das coletas foram medidos também os parâmetros físico-químicos da água: salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido (mg/L) e pH, com auxílio de uma sonda multiparametro da marca HORIBA série U52-G.

5.2 Análises microbiológicas

a) Amostras de água

As densidades de bactérias do gênero *Enterococcus* sp., bem como *Escherichia coli* (*E.coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) foram determinadas com base na Técnica de Membrana Filtrante (APHA, 2013), que consiste na filtração de volumes de água previamente estipulados através de membranas mistas de ésteres e celulose, com porosidade de 0,45µm, as quais são transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura seletivo e diferencial para cada microrganismo. Após o período de incubação, que é específico para cada

microrganismo, as colônias típicas são contadas, e testes complementares são realizados para confirmação da eficiência de recuperação do meio.

Para determinação do gênero *Enterococcus* sp. foi utilizado o meio de cultura Ágar mEnterococcus (Marca Dfco). Foram filtrados volumes de 50 e 25 mL de amostras de água. As placas foram incubadas a 37°C por 24/48h, e após este período, as colônias de coloração vermelho-marrom (Figura 6a) foram contadas como *Enterococcus* sp. Algumas das colônias contadas como *Enterococcus* sp. foram selecionadas aleatoriamente e transferidas para tubos de cultura contendo o meio de confirmação Enterococosel caldo (Marca BDL). Após o período de incubação de 24 horas à 36°C, os tubos enegrecidos foram considerados positivos para esta bactéria (Figura 6b). Após esta confirmação algumas cepas foram isoladas para confirmação bioquímica para determinação das espécies.

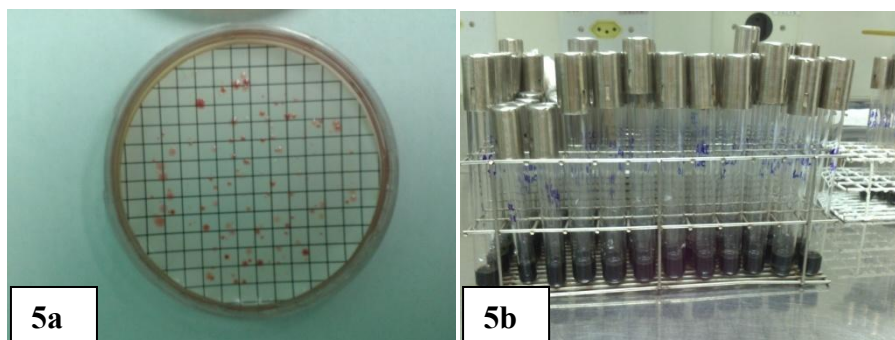


Figura 6. Em 6a: placa de petri contendo colônias do gênero *Enterococcus* sp.; e em 6b: teste de confirmação utilizando o meio de cultura Enterococosel caldo, onde os tubos com enegrecimento apontam como positivo a presença de *Enterococcus*.

Para a determinação de *E.coli* foi utilizado o meio de cultura Agar mTEC (Marca BD), sendo também filtrados volumes de 50 e 25 mL de amostras de água. As placas foram incubadas por 2 horas em estufa a 35°C para aclimação das células, posteriormente sendo transferidas para o banho maria onde permaneceram em torno de 22/48 horas a 44,5°C. As colônias de coloração amarelada foram contadas como sendo *E.coli* (Figura 7a), sendo também utilizado um meio de confirmação. No caso destas bactérias, a confirmação foi realizada através do substrato de uréia. Essa confirmação consiste em transferir as membranas para uma placa contendo discos de papel filtro embebidos em substrato de uréia, como as células de *E.coli* não possuem capacidade de hidrolisar a uréia as colônias que se mantiveram com coloração amarelada foram identificadas como pertencentes a essa espécie.

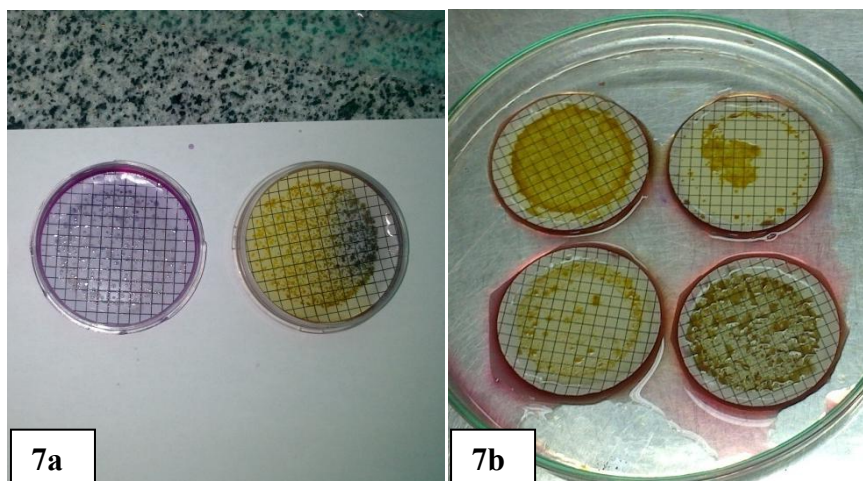


Figura 7. Em 7a: placas de Petri contendo colônias de bactérias, sendo contabilizado como *E.coli* as colônias amareladas; e em 7b: teste de confirmação por uréia, sendo confirmado para *E.coli* as colônias que permanecem amareladas.

Para a determinação de *Staphylococcus aureus* foi utilizado o meio de cultura Agar Salt Manitol (Marca BD) sendo também filtrados volumes de 50 e 25 mL de amostras de água. As placas foram incubadas em estufa na posição invertida por 24/48 horas a 37°C. Foram consideradas *S. aureus* as colônias pequenas convexas com coloração amarela derivada da produção de ácido resultante da metabolização do manitol presente no meio (Figura 8). Apesar deste meio ser considerado altamente seletivo (HAJDENWURCEL, 2004; LEBOFFE e PIERCE, 2005), às colônias estão armazenadas para posterior realização do teste de coagulase.

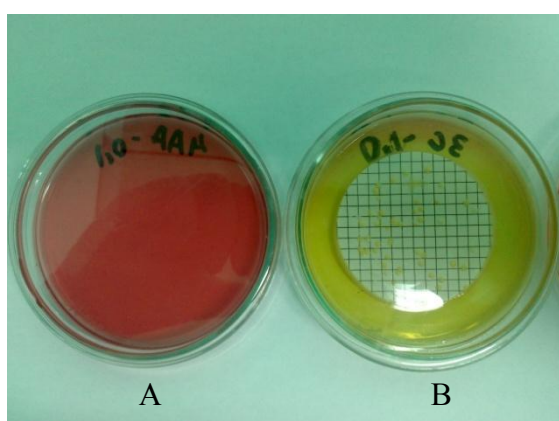


Figura 8. Placa de Petri contendo o meio de cultura Agar Salt Manitol, onde o meio com crescimento de bactérias da espécie *S. aureus* fica com a coloração amarela (B), sendo originalmente vermelho (A).

Após a contagem das colônias, os resultados para as três bactérias analisadas foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por 100 mL (UFC 100mL⁻¹).

b) Tecido Muscular e Brânquias

Antes dos peixes serem dissecados, sua pele foi lavada com álcool 70% para evitar a contaminação de seu interior. Em seguida foram dissecados com o auxílio de um bisturi previamente esterilizado, tomando o devido cuidado para que não ocorresse rompimento do trato gastrointestinal. Foram utilizados 25 gramas de músculo de cada peixe aos quais foram adicionados 225 mL de água destilada esterilizada. Este material foi então homogeneizado por um minuto em liquidificador simples, também previamente esterilizado, obtendo-se assim a diluição 10⁻¹. Após período de decantação, volumes de 0,1mL, 1mL e 3 mL do sobrenadante foram filtrados, através dos mesmos procedimentos descritos para as amostras de água, para determinação das bactérias *E. coli* e *Enterococcus* sp., pela técnica de membrana filtrante.

O preparo das amostras de brânquias foi semelhante ao da musculatura. Todo o conteúdo das brânquias foi retirado do peixe, e adicionado a quantidade de água destilada esterilizada em volume proporcional para obtenção da diluição 10⁻¹. Sendo posteriormente homogeneizados em liquidificador simples previamente esterilizado. Após período de decantação, volumes de 0,1mL, 1mL e 3 mL do sobrenadante foram utilizados para determinação das densidades bacterianas (*E. coli* e *Enterococcus* sp.) pela técnica de membrana filtrante.

Para a determinação de *S.aureus* foram utilizados volumes de 0,1mL e 1mL. Para o menor volume de diluição (0,1mL) foi utilizado o método de plaqueamento com semeadura em superfície com auxílio de uma alça de Drigalsk (Figura 9 a;b). Para o volume de diluição de 1mL foi utilizado a técnica da membrana filtrante para as duas partes dos peixes. O procedimento para incubação foram iguais aos descritos para as análises de água.

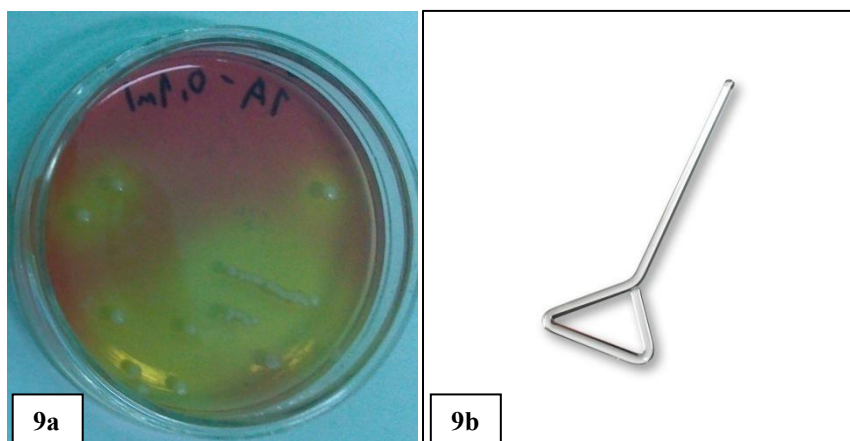


Figura 9. Em 9a: Crescimento bacteriano obtido mediante da técnica de plaqueamento com semeadura em superfície utilizado alça de Drigalsk; Em 9b: Alça de Drigalsk utilizada para a realização da técnica.

Após a contagem das colônias, os resultados para as três bactérias de ambas as estruturas analisadas (musculatura e brânquias) foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC.g⁻¹).

c) Identificação das Bactérias do Gênero *Enterococcus*

Algumas colônias previamente identificadas no Enterococcosel Broth como *Enterococcus*, foram selecionadas aleatoriamente e transferidas para tubos de ensaio contendo Ágar BHI inclinado (Oxoid), para realização de testes bioquímicos.

Os teste bioquímicos utilizados foram os descritos por Facklam e Collins (1989). As colônias foram submetidas a 4 testes bioquímicos: produção de catalase, crescimento em NaCl 6,5%, crescimento a 45°C e produção de pirrolidonil arilamidase (PYR³). Para a identificação das espécies os seguintes testes foram realizados: teste de fermentação de carboidratos (arabinose, rafinose, manitol, xilose e sorbitol), utilização de piruvato 1%, produção de pigmento amarelo, motilidade e descarboxilação da arginina.

5.3 Tratamento de dados

Primeiramente realizou-se o teste de normalidade dos dados, e posteriormente para verificar a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre as estações de coleta, entre as estações do ano e entre as estruturas dos peixes, foi aplicado a Análise de Variância (Anova) e a posteriori o teste Tukey (ZAR, 1999). A matriz de Pearson foi utilizada para verificar a correlação entre a concentração microbiológica das diferentes bactérias analisadas nas diferentes estruturas corporais dos peixes com a água, e também em relação aos parâmetros

ambientais analisados. As análises foram realizadas a partir do programa Primer 6 (CLARKE e GORLEY, 2005).

6 RESULTADOS

6.1 Parâmetros físico-químicos da água

Os resultados dos parâmetros físico-químicos encontrados em todos os pontos amostrados durante todo o período do estudo estão apresentados na Tabela 2. Em relação aos parâmetros observados, o único que apresentou valores abaixo dos limites estabelecidos pelo CONAMA 357/05 foi o pH durante a estação de Outono, que variou de 3,1 a 3,5.

Os valores médios de oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) variaram entre 6,5 (Ponto 2 e 4) e 7,1 (Ponto 3) durante todo o período analisado. Os maiores valores foram observados durante as estações de Inverno e Primavera, exceto no Ponto 4, no qual as estações de Outono e Inverno apresentaram os maiores valores para oxigênio. Não houve diferença significativa entre os pontos amostrados (ANOVA - $p=0,95$), porém as estações de Inverno e Verão apresentaram diferenças significativas (ANOVA - $p < 0,05$) durante o período do estudo, com os maiores valores verificados no verão e os maiores no inverno.

Em relação a temperatura, os valores variaram entre 19°C (Outono) e $30,4^{\circ}\text{C}$ (Verão), com os registros mais altos observados durante o Verão e os menores durante o Outono. A temperatura apresentou variação sazonal comumente encontrada em regiões estuarinas subtropicais, cujas temperaturas mais baixas são sempre observadas durante o inverno e as mais altas durante o verão. Não foi observada diferença significativa entre os pontos amostrados (ANOVA - $p=0,99$), porém as estações Outono, Inverno e Primavera apresentaram diferenças significativas em relação a estação de Verão (ANOVA - $p < 0,01$).

A salinidade variou em média de 7,68 (Ponto 1) a 22,2 (Ponto 4), com os maiores valores observados no Ponto 4, que está mais próximo a foz, e os menores no Ponto 1, que é mais próximo a montante do rio. Estes pontos apresentaram diferenças significativas entre si (ANOVA - $p < 0,05$), porém não em relação aos demais pontos. Não foram encontradas diferenças significativas (ANOVA - $p=0,34$) entre as estações do ano.

Os valores de pH variaram de 3,1 (Ponto 1) a 7,5 (Ponto 1 e 2), com os maiores valores sendo observados durante o Verão e os menores durante o Outono. Não foram observadas diferenças significativas entre os pontos (ANOVA - $p=0,98$), porém houve diferenças significativas entre os valores registrados durante o Outono com as demais estações do ano (ANOVA - $p < 0,01$).

Durante o período analisado (Maio/2014 a Janeiro/2015) foi possível observar um perfil sazonal marcante para região típico de regiões estuarinas, cujo os menores valores de temperatura, e os maiores valores de salinidade e oxigênio foram registrados durante o inverno, e as maiores temperaturas, e menores valores de salinidade e oxigênio durante o verão.

Tabela 2. Resultados dos parâmetros físico-químico da água encontrados durante todo o estudo (Maio/2014 a Janeiro/2015) nos quatro pontos amostrados.

Parâmetro	CONAMA Água Salobra Classe II	Estação do Ano	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	> 4,0 mg/L	Outono/14	5,39	6,07	5,7	8,46
		Inverno/14	10,35	8,64	8,15	8,61
		Primavera/14	7,24	7,28	10,1	4,8
		Verão/15	4,3	4,2	4,3	4
Temperatura (°C)	-	Outono/14	19	19	19	19
		Inverno/14	20,1	20,3	20,3	20,3
		Primavera/14	22,8	22,8	22,7	22,7
		Verão/15	30,1	30,2	30,4	30,4
pH	6,5 a 8,5	Outono/14	3,1	3,5	3,4	3,5
		Inverno/14	7,5	7,3	7,2	7,1
		Primavera/14	6,8	6,9	7,3	7,2
		Verão/15	7,4	7,5	7,32	7,19
Salinidade	0,5 a 30	Outono/14	2,9	9,3	14,5	16,7
		Inverno/14	7,7	22,3	24,5	26,9
		Primavera/14	7,2	9,5	10,4	28,2
		Verão/15	12,9	18,7	17,6	17,02

6.2 *Escherichia coli* (*E.coli*)

Os resultados das densidades de *E.coli* encontrados na água, na musculatura e nas brânquias dos exemplares de peixes capturados nos diferentes pontos amostrados durante todo período de estudo estão apresentados na Tabela 3.

As densidades de *E.coli* obtidas para as brânquias dos peixes não apresentaram diferenças significativas, nem entre os pontos (ANOVA - $p=0,33$), nem entre as estações do ano (ANOVA - $p=0,71$). Durante a estação de Outono a bactéria não foi detectada nas brânquias de nenhum dos peixes capturados nos pontos amostrados. No ponto 1, mais interno ao rio, o maior registro foi observado nas brânquias dos peixes obtidos na estação de Inverno ($9,5 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) e o menor na estação de Verão ($4,1 \times 10^4$ UFC.g⁻¹). No ponto 2, o maior registro foi observado nas brânquias dos peixes capturados na Primavera ($8,9 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) e o menor no Inverno ($5,5 \times 10^4$ UFC.g⁻¹). No ponto 3, o maior registro também foi observado

na Primavera ($1,1 \times 10^5$ UFC.g⁻¹) e o menor no Verão ($8,7 \times 10^4$ UFC.g⁻¹). E no ponto 4, o maior valor foi obtido nas brânquias dos peixes capturados no Inverno ($5,6 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) e o menor na Primavera ($4,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹).

Em relação as densidades de *E.coli* na musculatura dos peixe, não foram observadas diferenças significativas entre os pontos amostrados (ANOVA - $p=0,73$), porém entre as estações do ano, as amostras de musculatura dos peixes capturados no Outono apresentaram diferenças significativas em relação àqueles capturados no Inverno (ANOVA - $p<0,05$). Não foi detectada a presença de *E. coli* na musculatura dos peixes capturados no ponto 1, no outono e na primavera, . Nas demais estações, verão e inverno, o maior valor foi observado no Inverno ($3,5 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) e o menor no Verão ($2,8 \times 10^4$ UFC.g⁻¹).

No ponto 2, o valor obtido foi na musculatura dos peixes capturados no Inverno ($8,8 \times 10^5$ UFC.g⁻¹), e o menor naqueles capturados na Primavera ($1,2 \times 10^4$ UFC.g⁻¹). Já na musculatura dos peixes obtidos no ponto 3, em todas as estações do ano foi encontrada a presença de *E.coli*, com o maior registro também verificado no Inverno ($5,8 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) e o menor no Outono ($1,8 \times 10^3$ UFC.g⁻¹). Já na musculatura dos peixes capturados no ponto 4, a maior densidade foi observada no Verão ($8,2 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) e a menor na Primavera ($3,8 \times 10^3$ UFC.g⁻¹).

Em relação as amostras de água, segundo a legislação CONAMA 357/05 (Brasil, 2005) a densidade de *E.coli*, pode substituir coliformes termotolerantes na avaliação da qualidade microbiológica de corpos d'água, para águas salobras de classe 2 e o valor de coliformes termotolerantes e/ou de *E. coli* não deve ultrapassar 1000 UFC.100 mL⁻¹. Porém, segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2013), os valores de *E.coli* apresentam diferença de 1.25 em relação a coliformes termotolerantes, e, portanto, deve ser considerado para *E.coli* o limite de 800 UFC.100mL⁻¹.

Levando em consideração este limite (800 UFC.100mL⁻¹), durante o estudo foram observados períodos que a água apresentou densidade de *E.coli* acima dos limites estabelecidos. Nas amostras de água, não houve diferença significativa nas densidades de *E. coli* encontradas entre os pontos amostrados (ANOVA - $p=0,96$), porém entre as estações do ano, o Verão apresentou diferenças em relação as estações de Inverno e Primavera (ANOVA - $p<0,05$). Entre as amostras de água obtidas no ponto 1, a estação de Inverno apresentou o maior valor de densidade e este foi acima do limite estabelecido (>800 UFC.100mL⁻¹),

enquanto que, o menor de densidade de *E. coli* na água foi observado no Outono (500 UFC.100mL⁻¹).

No ponto 2, a maior densidade de *E. coli* na água também foi obtida ,durante o Inverno, e este foi acima do limite estabelecido pela legislação vigente (>800 UFC.100mL⁻¹), enquanto que, a menor densidade foi observada na Primavera (296 UFC.100mL⁻¹). As amostras de água dos pontos 3 e 4 apresentaram valores semelhantes de densidade de *E. coli*, com a estação de Verão apresentando valores acima dos limites estabelecidos pela legislação (>800 UFC.100mL⁻¹), e o Inverno apresentando as menores densidades (400 UFC.100mL⁻¹).

Tabela 3. Densidades de *E.coli* encontradas nas diferentes partes do peixe (músculo e brânquias) e na água dos pontos amostrados nas quatro estações do ano.

Amostra	Estação do Ano	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
Brânquias (UFC.g⁻¹)	Outono/14	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
	Inverno/14	9,5 x 10 ⁴	5,5 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁵	5,6 x 10 ⁴
	Primavera/14	5,1 x 10 ⁴	8,9 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁵	4,0 x 10 ³
	Verão/15	4,1 x 10 ⁴	6,8 x 10 ⁴	8,7 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁴
Músculo (UFC.g⁻¹)	Outono/14	-	-	1,8 x 10 ³	-
	Inverno/14	3,5 x 10 ⁴	8,8 x 10 ⁵	5,8 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁴
	Primavera/14	-	1,2 x 10 ⁴	9,0 x 10 ³	3,8 x 10 ³
	Verão/15	2,8 x 10 ⁴	4,5 x 10 ⁴	3,2 x 10 ⁴	8,2 x 10 ⁴
Água (UFC.100mL⁻¹)	Outono/14	500	400	394	580
	Inverno/14	>800	>800	400	400
	Primavera/14	-	269	282	400
	Verão/15	580	566	>800	>800

Foi possível observar que, na maioria das amostras, a densidade de *E.coli* nas brânquias foi maior do que a encontrada na musculatura (Figura 10). Porém, nos pontos 2 e 4 não foram encontradas diferenças significativas (ANOVA - p= 0,46 e p=0,57, respectivamente) entre as concentrações de *E.coli* do músculo e das brânquias.

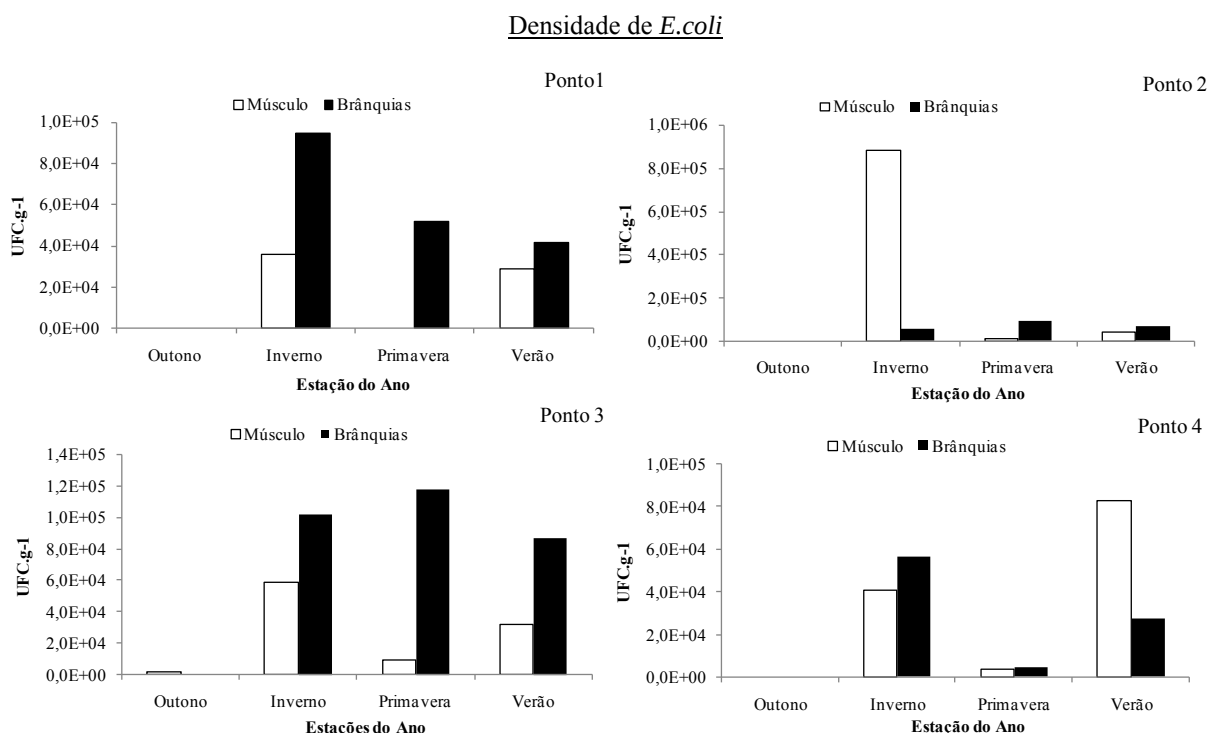


Figura 10. Densidade de *E.coli* no músculo e nas brânquias de Caratingas capturadas em Itanhém, nos quatro pontos amostrados durante todas as estações do ano (Outono ao Verão).

A densidade de *E.coli* na água e nas brânquias apresentaram-se durante o Outono e Inverno extremamente correlacionadas (*coef.* 0,99 e 0,82, respectivamente), já durante a Primavera e o Verão as análises de correlação apresentaram-se negativas e baixas (*coef.* -0,97 e -0,33, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de correlação de pearson entre a densidade de *E.coli* na água e nas brânquias dos peixes durante as estações do ano.

	Brânq-Out	Brânq-Inv	Brânq-Pri	Brânq-Ver	Água-Out	Água-Inv	Água-Pri	Água-Ver
Brânq-Out								
Brânq-Inv	0.8262							
Brânq-Pri	-0.9867	-0.9023						
Brânq-Ver	-0.3606	-0.8129	0.4877					
Água - Out	0.9999	0.8206	-0.9849	-0.3525				
Água - Inv	0.9970	0.8219	-0.9794	-0.3709	0.9974			
Água - Pri	0.9982	0.7947	-0.9781	-0.3061	0.9985	0.9932		
Água - Ver	0.9994	0.8114	-0.9834	-0.3328	0.9995	0.9947	0.9996	

*Brânq=Brânquias, Out=Outono, Inv=Inverno, Pri=Primavera e Ver=Verão

A correlação entre as densidades de *E.coli* na água e no músculo do peixe, mostrou que somente durante a estação do Outono houve correlação entre os dois (*coef.* 0,85), durante o Inverno a correlação foi baixa (*coef.* 0,39), e na Primavera e no Verão apresentou-se baixa e negativa (*coef.* -0,05 e -0,65, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de correlação de pearson entre a densidade de *E.coli* na água e na musculatura dos peixes durante as estações do ano.

	Mus - Out	Mus - Inv	Mus - Pri	Mus - Ver	Água-Out	Água-Inv	Água-Pri	Água-Ver
Mus - Out								
Mus - Inv	0.6219							
Mus - Pri	0.3256	0.3349						
Mus - Ver	-0.8626	-0.9326	-0.3585					
Água-Out	0.8551	0.3559	-0.1943	-0.6280				
Água-Inv	0.8164	0.3960	-0.2789	-0.6368	0.9916			
Água-Pri	0.9045	0.3499	-0.0575	-0.6457	0.9881	0.9613		
Água-Ver	0.8791	0.3812	-0.1470	-0.6550	0.9988	0.9869	0.9930	

*Mus=Músculo, Out=Outono, Inv=Inverno, Pri=Primavera e Ver=Verão

6.3 *Enterococcus* sp.

Os resultados das densidades de *Enterococcus* sp. encontrados na água, na musculatura e nas brânquias dos peixes nos diferentes pontos amostrados durante todo o período de estudo estão apresentados na Tabela 6.

As densidades de *Enterococcus* sp. encontradas nas brânquias dos peixes não apresentaram diferenças significativas entre os pontos amostrados (ANOVA - $p=0,92$), porém entre as estações do ano, as densidades encontradas no Inverno apresentaram diferenças estatísticas em relação as encontradas na Primavera (ANOVA - $p<0,05$).

No Outono não foi detectada a presença de *Enterococcus* sp. nas brânquias de nenhum dos peixes capturados em todos os pontos amostrados.

Em relação às densidades de *Enterococcus* sp. nas brânquias dos peixes capturados nos pontos 1 e 2, estas apresentaram padrões de variação semelhantes, em relação as estações do ano, nas quais os maiores registros foram observados na estação de Inverno ($2,4 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ e $1,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, respectivamente) e os menores na estação de Primavera ($1,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ e $6,3 \times 10^3$ UFC.g⁻¹, respectivamente).

Os pontos 3 e 4, também apresentaram padrões de variação semelhantes em relação as estações do ano, sendo os maiores registros observados durante o Inverno ($1,2 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ e $2,4 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, respectivamente) e os menores no Verão ($5,5 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ e $2,5 \times 10^4$ UFC.g⁻¹, respectivamente).

Em relação as densidades de *Enterococcus* sp. na musculatura do peixe, também não foram observadas diferenças significativas entre os pontos amostrados (ANOVA - $p=0,99$),

porém entre as estações do ano, o Inverno também apresentou diferenças significativas em relação a Primavera (ANOVA - $p < 0,05$).

As densidades de *Enterococcus* na musculatura dos peixes capturados nos pontos 1, 2 e 3, apresentaram padrões de variação semelhantes em relação as estações do ano, sendo que no Inverno foram obtidas as maiores densidades ($2,4 \times 10^5$ UFC.g⁻¹; $3,8 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ e $6,8 \times 10^4$ UFC.g⁻¹, respectivamente) e na Primavera os menores ($2,2 \times 10^3$ UFC.g⁻¹; $3,2 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ e $4,4 \times 10^3$ UFC.g⁻¹, respectivamente). No ponto 4, a maior densidade também foi observada no Inverno ($2,4 \times 10^5$ UFC.g⁻¹), porém a menor ocorreu no Verão ($2,7 \times 10^3$ UFC.g⁻¹).

Em relação as amostras de água, não ocorreram diferenças significativas nem entre os pontos amostrados (ANOVA - $p = 0,18$), nem tão pouco entre as estações do ano (ANOVA - $p = 0,28$).

Nos pontos 1, 2 e 4, as amostras de água obtidas no Inverno apresentaram as maiores densidades de *Enterococcus* sp. (344 UFC.100mL⁻¹, 600 UFC.100mL⁻¹ e 600 UFC.100mL⁻¹, respectivamente), enquanto que os menores valores foram obtidos nas amostras coletadas no Verão (127 UFC.100mL⁻¹, 144 UFC.100mL⁻¹ e 165 UFC.100mL⁻¹, respectivamente) (Tabela 6).

Tabela 6. Densidades de *Enterococcus* sp. encontradas nas diferentes partes do peixe (músculo e brânquias) e na água dos pontos amostrados nas quatro estações do ano.

Amostra	Estação do Ano	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
Brânquias (UFC.g ⁻¹)	Outono/14	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
	Inverno/14	$2,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$
	Primavera/14	$1,0 \times 10^3$	$6,3 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$	-
	Verão/15	$1,3 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$	$5,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^4$
Músculo (UFC.g ⁻¹)	Outono/14	-	-	-	-
	Inverno/14	$2,4 \times 10^5$	$3,8 \times 10^4$	$6,8 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$
	Primavera/14	$2,2 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$4,4 \times 10^3$	$5,6 \times 10^3$
	Verão/15	$9,6 \times 10^3$	$3,4 \times 10^4$	$7,1 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$
Água (UFC.100mL ⁻¹)	Outono/14	276	248	406	548
	Inverno/14	344	600	600	600
	Primavera/14	261	489	473	191
	Verão/15	127	144	685	165

As análises de identificação das espécies do gênero *Enterococcus*, mostraram a presença de cinco diferentes espécies durante todo o estudo: *E.faecium*, *E.durans*, *E.faecalis*, *E. hirae* e *E.durans*. Todas comumente encontradas em ambientes aquáticos. Nas quatro estações do ano as cinco espécies foram encontradas, com exceção da estação de Verão, onde somente *E.faecalis* e *E.faecium* foram identificadas.

Em todos os pontos de coleta foi possível observar que, as maiores densidades de *Enterococcus* sp. foram obtidas no Inverno, sendo que os pontos 1 e 4 apresentaram padrões semelhantes de variação de densidades, com o músculo dos peixes apresentando maiores densidades do que as brânquias.

Da mesma forma, os pontos 2 e 3 apresentaram padrões de variação semelhantes, porém as brânquias apresentaram densidades maiores do que os músculos do peixe (Figura 11). Contudo, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de *Enterococcus* sp. no músculo e nas brânquias.

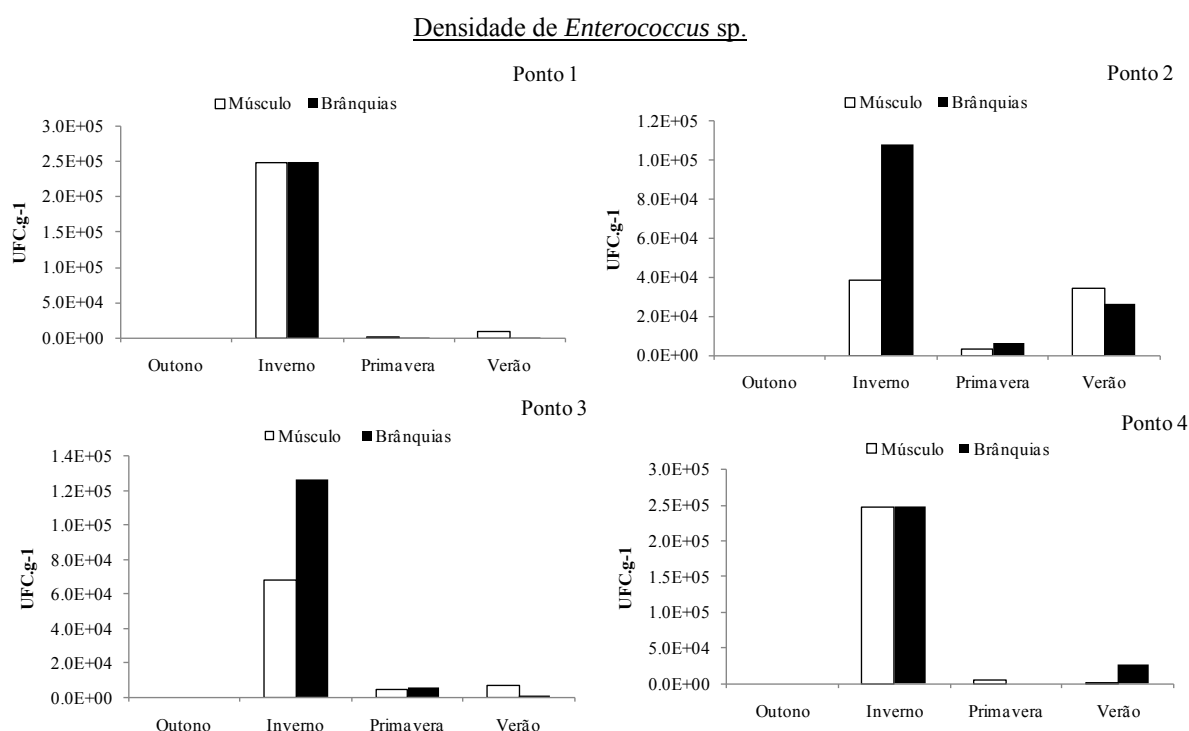


Figura 11. Densidade de *Enterococcus* sp. no músculo e nas brânquias de exemplares de Caratinga coletados nos quatro pontos amostrados em Itanahém, durante todas as estações do ano (Outono ao Verão).

Com base nos resultados apresentados, é possível afirmar que, em relação à contaminação das brânquias, os peixes capturados no ponto 4, foram os que apresentaram maior nível de contaminação de origem fecal, assim como também foi observado para as amostras de água. Os resultados de correlação também mostraram que o padrão de variação

das brânquias e dos músculos foram semelhantes e estiveram positivamente relacionados, principalmente para as bactérias *E.coli* e *Enterococcus* (Figura 12).

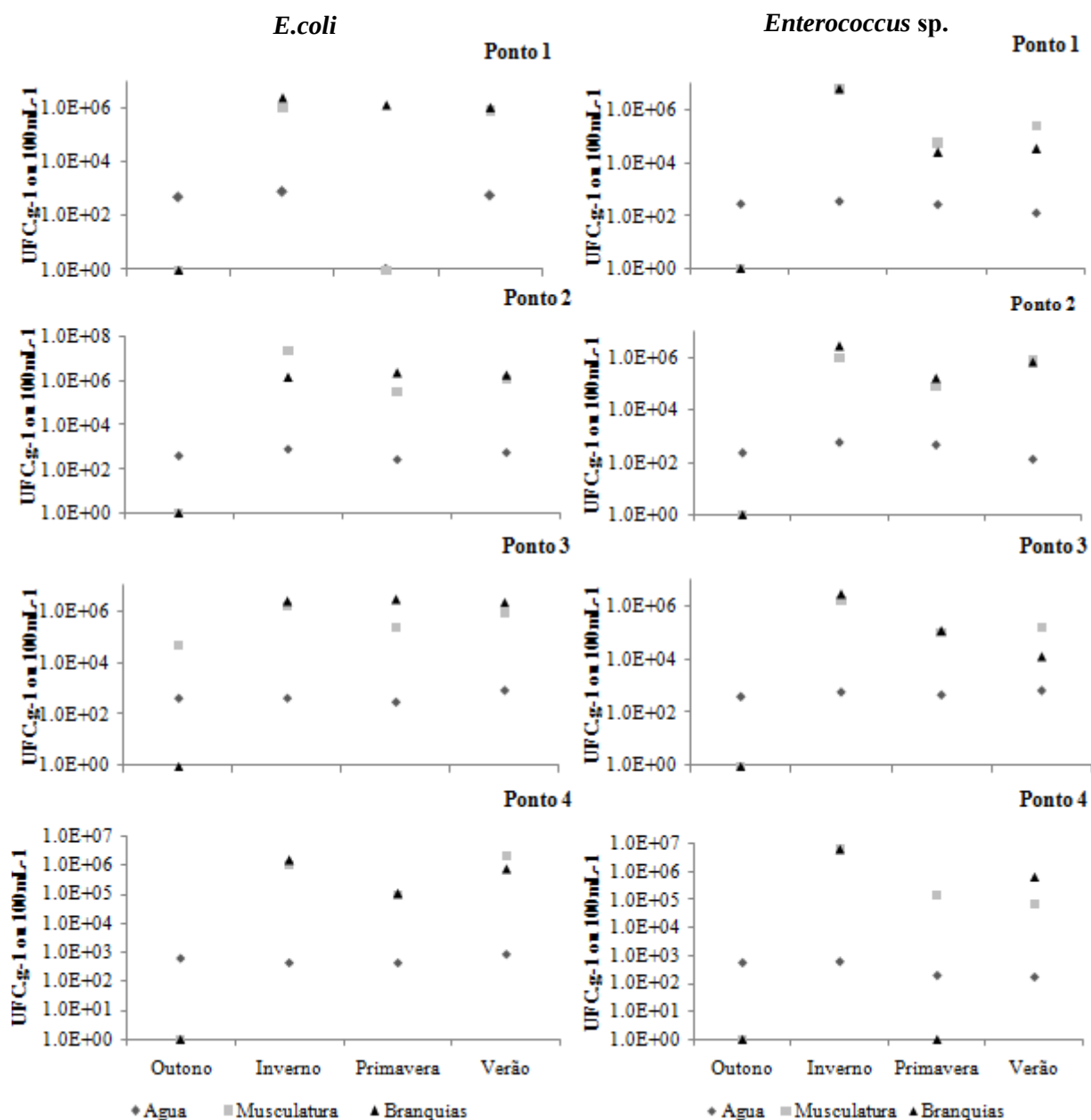


Figura 12. Comparação dos valores de *E.coli* e *Enterococcus sp.* encontrados na água do rio Itanhaém, e músculo e brânquias dos peixes *Eugerres brasilianus* em todos os pontos amostrados (1 a 4), durante todas as estações do ano.

As densidades de *Enterococcus sp.* na água e nas brânquias dos peixes coletados, apresentaram-se durante o Outono e Inverno, extremamente correlacionadas (*coef.* 0,99 e 0,98, respectivamente), já durante a Primavera e o Verão as análises de correlação apresentaram-se negativas e baixas (*coef.* -0,06 e -0,98, respectivamente) (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de correlação de pearson entre a densidade de *Enterococcus* sp. na água e nas brânquias dos peixes coletados em Itanhaém, durante as estações do ano.

	Brânq-Out	Brânq-Inv	Brânq-Pri	Brânq-Ver	Água-Out	Água-Inv	Água-Pri	Água-Ver
Brânq-Out								
Brânq-Inv	0.9851							
Brânq-Pri	-0.1480	-0.1368						
Brânq-Ver	-0.9637	-0.9595	-0.1177					
Água - Out	0.9988	0.9909	-0.1194	-0.9719				
Água - Inv	0.9966	0.9881	-0.0732	-0.9817	0.9989			
Água - Pri	0.9962	0.9828	-0.0615	-0.9830	0.9977	0.9995		
Água - Ver	0.9919	0.9886	-0.0364	-0.9880	0.9963	0.9989	0.9980	

*Brânq=Brânquias, Out=Outono, Inv=Inverno, Pri=Primavera e Ver=Verão

Os resultados da correlação entre as densidades de *Enterococcus* sp. na água e no músculo do peixe, mostraram a existência de correlação alta e positiva no Outono, Inverno e Primavera (*coef.* 0,99; *coef.* 0,97 e *coef.* 0,56, respectivamente), e durante o Inverno a correlação entre a água e músculo dos peixes também foi alta, porém negativa (*coef.* -0,99) (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de correlação de pearson entre a densidade de *Enterococcus* sp. na água e na musculatura dos peixes durante as estações do ano.

	Mus - Out	Mus - Inv	Mus - Pri	Mus - Ver	Água-Out	Água-Inv	Água-Pri	Água-Ver
Mus - Out								
Mus - Inv	0.9597							
Mus - Pri	0.5192	0.7200						
Mus - Ver	-0.9781	-0.9966	-0.6799					
Água-Out	0.9987	0.9721	0.5623	-0.9873				
Água-Inv	0.9979	0.9751	0.5739	-0.9894	0.9999			
Água-Pri	0.9985	0.9735	0.5617	-0.9879	0.9999	0.9998		
Água-Ver	0.9917	0.9878	0.6195	-0.9967	0.9968	0.9977	0.9972	

*Mus=Músculo, Out=Outono, Inv=Inverno, Pri=Primavera e Ver=Verão

6.4 *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*)

Os resultados das densidades de *S.aureus* encontrados na água, na musculatura e nas brânquias dos peixes capturados nos diferentes pontos amostrados durante todo o período de estudo estão apresentados na Tabela 9.

Levando-se em consideração o limite estabelecido pela ANVISA (RDC 12/01) para *Staphylococcus* coagulase positivos em amostras de pescado, as densidades de *S.aureus*

encontradas nas brânquias dos peixes, durante todo o período de estudo, apresentaram valores maiores do que o permitido pela legislação ($< 10^3$ UFC.g⁻¹). Não foram observadas diferenças significativas nas densidades de *Staphylococcus* entre os pontos amostrados (ANOVA - $p=0,90$), porém entre as estações do ano, foram obtidas diferenças significativas entre o Inverno e a Primavera (ANOVA – $p<0,05$).

A bactéria *S.aureus* foi observada em abundância somente na Primavera, no qual variou entre $2,5 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ (Ponto 3) e $8,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ (Ponto 4).

Da mesma forma que foi observado para as brânquias, a densidade de *S.aureus* encontrada nos músculos dos peixes foi maior do que os limites estabelecidos pela legislação vigente (RDC 12/01), durante todo o período de estudo, sendo classificados como impróprios para o consumo.

Em relação as densidades de *S.aureus* na musculatura do exemplares de peixe capturados, não foram observadas diferenças significativas nem entre os pontos amostrados (ANOVA - $p=0,80$), nem entre as estações do ano (ANOVA - $p=0,29$).

No ponto 1, não foi detectada a presença de *S. aureus* na musculatura dos peixes capturados no Outono e no Inverno, sendo que a maior densidade foi obtida nos exemplares coletados na Primavera ($1,3 \times 10^5$ UFC.g⁻¹) e o menor naqueles coletados no Verão ($1,5 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) (Tabela 9). O ponto 2 foi o que apresentou maiores densidades de *S. aureus* na musculatura dos peixes, com o maior valor no Inverno ($1,7 \times 10^5$ UFC.g⁻¹), e o menor no Verão ($1,0 \times 10^4$ UFC.g⁻¹). No ponto 3, a maior densidade de *S. aureus* também foi obtida na musculatura dos peixes coletados no Inverno ($1,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹) e a menor no Outono ($8,2 \times 10^3$ UFC.g⁻¹). Já no ponto 4, a maior densidade foi observada na musculatura dos peixes coletados no Outono ($1,2 \times 10^5$ UFC.g⁻¹) e a menor naqueles coletados no Verão ($1,0 \times 10^4$ UFC.g⁻¹).

Nas amostras de água, a ocorrência de *S.aureus* foi baixa, sendo observada em maior número somente nos pontos 1 e 2 durante todo o período de estudo. No ponto 1, a maior densidade foi observada no Verão (336 UFC.100mL⁻¹) e a menor no Outono (40 UFC.100mL⁻¹). No ponto 2, *S.aureus* foi somente detectada no Verão com densidade de 153 UFC.100mL⁻¹.

Tabela 9. Densidades de *Staphylococcus aureus* encontradas nas diferentes partes do peixe (músculo e brânquias) e na água dos pontos amostrados nas quatro estações do ano.

Amostra	Estação do Ano	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
Brânquias (UFC.g ⁻¹)	Outono/14	< 1	< 1	< 1	< 1
	Inverno/14	< 1	< 1	< 1	6,8 x 10 ³
	Primavera/14	4,8 x 10 ⁴	3,4 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	8,0 x 10 ⁵
	Verão/15	< 1	1,3 x 10 ⁴	< 1	< 1
Músculo (UFC.g ⁻¹)	Outono/14	< 1	1,2 x 10 ⁴	8,2 x 10 ³	1,2 x 10 ⁵
	Inverno/14	< 1	1,7 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁵	< 1
	Primavera/14	1,3 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	5,8 x 10 ⁴	6,4 x 10 ⁴
	Verão/15	1,5 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	< 1	1,0 x 10 ⁴
Água (UFC.100mL ⁻¹)	Outono/14	40	Não Detectada	< 1	< 1
	Inverno/14	144	Não Detectada	5	< 1
	Primavera/14	66	Não Detectada	< 1	< 1
	Verão/15	336	153	< 1	< 1

Foi possível observar que, na maior parte das amostras do presente estudo, a densidade de *S.aureus* no músculo foi maior do que a encontrada nas brânquias (Figura 13). Porém, somente no ponto 4 foi encontrada diferença significativa entre as duas entretuturas do peixe (ANOVA – $p < 0,05$).

Densidade de *Staphylococcus aureus*

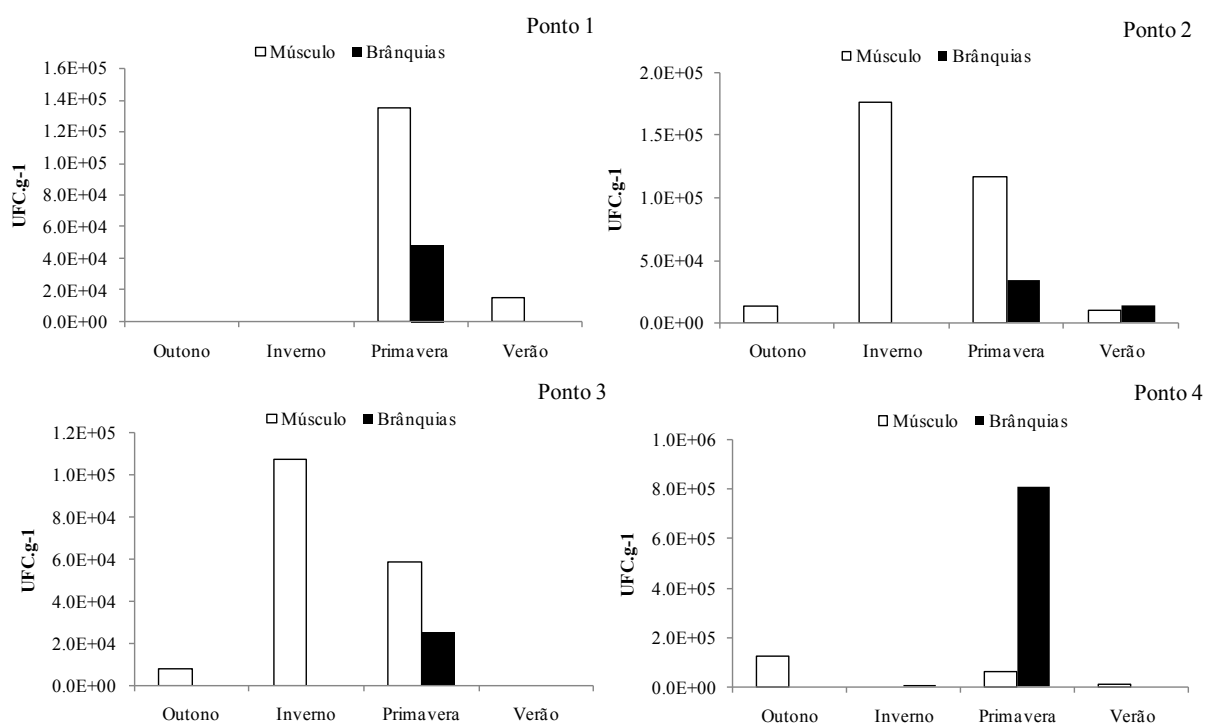


Figura 13. Densidade de *Staphylococcus aureus* no músculo e nas brânquias da Caratinga nos quatro pontos amostrados durante todas as estações do ano (Outono ao Verão).

Apesar da baixa ocorrência, as densidades de *S.aureus* na água e nas brânquias dos peixes coletados, apresentaram alta correlação positiva durante o Outono, Inverno e Primavera (*coef.* 0,99; *coef.* 0,98 e *coef.*0,99, respectivamente). Já no Verão a densidade de *S.aureus* na água e nas brânquias foram altas, porém a correlação foi negativa (*coef.* -0,99) (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de correlação de pearson entre a densidade de *S.aureus* na água e nas brânquias dos peixes durante as estações do ano.

	Brânq-Out	Brânq-Inv	Brânq-Pri	Brânq-Ver	Água-Out	Água-Inv	Água-Pri	Água-Ver
Brânq-Out								
Brânq-Inv	0.9857							
Brânq-Pri	0.9995	0.9866						
Brânq-Ver	-0.9994	-0.9867	-1.0000					
Água - Out	0.9998	0.9841	0.9998	-0.9997				
Água - Inv	0.9989	0.9802	0.9994	-0.9993	0.9996			
Água - Pri	0.9996	0.9829	0.9997	-0.9997	0.9999	0.9998		
Água - Ver	0.9883	0.9615	0.9911	-0.9914	0.9909	0.9944	0.9923	

*Brânq=Brânquias, Out=Outono, Inv=Inverno, Pri=Primavera e Ver=Verão

Já as correlações entre as densidades de *S.aureus* na água e no músculo dos peixes coletados durante o Outono e o Inverno foram baixas e negativas (*coef.* - 0,22 e -0,62, respectivamente). No Verão e na Primavera foram observadas correlações altas e positivas entre as densidades de *S.aureus* nos músculos dos exemplares de peixes e nas amostras de água (*coef.* 0,92 e 0,86, respectivamente) (Tabela 11).

Tabela 11. Matriz de correlação de pearson entre a densidade de *S.aureus*. na água e na musculatura dos peixes durante as estações do ano.

	Mus - Out	Mus - Inv	Mus - Pri	Mus - Ver	Água-Out	Água-Inv	Água-Pri	Água-Ver
Mus - Out								
Mus - Inv	-0.5984							
Mus - Pri	-0.4441	-0.4506						
Mus - Ver	0.0750	-0.8302	0.8536					
Água-Out	-0.2221	-0.6227	0.9277	0.8624				
Água-Inv	-0.2236	-0.6217	0.9284	0.8624	1.0000			
Água-Pri	-0.2229	-0.6224	0.9282	0.8627	1.0000	1.0000		
Água-Ver	-0.2331	-0.6174	0.9349	0.8661	0.9998	0.9998	0.9998	

*Mus=Músculo, Out=Outono, Inv=Inverno, Pri=Primavera e Ver=Verão

6.5 Densidades microbianas e as variáveis ambientais

No ponto 1, as correlações entre a densidade de *Enterococcus* sp. na água com o teor de Oxigênio Dissolvido e, a densidade de *Enterococcus* sp. nas brânquias dos peixes com o teor de Oxigênio Dissolvido, foram altas e positivas (*coef.* 0,96 e 0,71, respectivamente) bem como aquelas correlações entre as densidades bacterianas do músculo e das brânquias com a salinidade (*coef.* 0,84 e 0,82).

Em relação a *E.coli*, a densidade nas brânquias dos peixes coletados, apresentou correlação positiva com os valores de pH e de salinidade da água (*coef.* 0,77 e 0,92, respectivamente). Já a densidade de *E. coli* nos músculos dos peixes mostrou correlação positiva e alta apenas com a salinidade (*coef.* 0,92).

A densidade de *S.aureus* na água apresentou correlação positiva com a temperatura (*coef.* - 0,94), porém negativa em relação ao O.D (*coef.* - 0,73) (Tabela 12).

Tabela 12. Matriz de Correlação (Pearson) entre os parâmetros ambientais e as densidade bacterianas encontradas no ponto 1.

	O.D	Temp.	pH	Sal.	E.C-B	E.C-M	E.C-A	E.T-B	E.T-M	E.T-A	S.A-B	S.A-M	S.A-A
O.D													
Temp.	-0.78												
pH	-0.01	0.63											
Sal.	0.32	0.22	0.76										
E.C-B	0.57	0.03	0.77	0.92									
E.C-M	0.01	0.38	0.63	0.92	0.70								
E.C-A	0.03	-0.02	0.01	0.58	0.29	0.78							
E.T-B	0.71	-0.37	0.31	0.82	0.82	0.69	0.65						
E.T-M	0.69	-0.34	0.33	0.84	0.83	0.71	0.66	1.00					
E.T-A	0.96	-0.91	-0.27	0.17	0.38	-0.07	0.14	0.67	0.65				
S.A-B	0.25	-0.04	0.24	-0.26	0.08	-0.57	-0.93	-0.33	-0.34	0.07			
S.A-M	0.16	0.07	0.30	-0.25	0.07	-0.54	-0.93	-0.38	-0.39	-0.04	0.99		
S.A-A	-0.73	0.94	0.60	0.41	0.13	0.63	0.33	-0.12	-0.09	-0.82	-0.36	-0.26	

*O.D-Oxigênio Dissolvido, Temp.-Temperatura, Sal-Salinidade, E.C-*E.coli*, E.T-*Enterococcus* sp., S.A-*S.aureus*, A-Água, M-Músculo, B-Brânquias.

No ponto 2, as densidades de *E.coli* nas brânquias apresentaram correlação positiva com o pH (*coef.* 0,89), as densidades no músculo mostraram correlação com o OD e a salinidade (*coef.* 0,72 e 0,77), e as densidades bacterianas na água apresentaram correlação alta e positiva com a salinidade (*coef.* 0,95).

Já em relação a *Enterococcus* sp., as densidades nas brânquias apresentaram correlação positiva com a salinidade (*coef.* 0,87), as densidades no músculo estiveram correlacionadas com o pH e com a salinidade (*coef.* 0,71 e 0,99, respectivamente) e as densidades nas amostras de água mostraram correção alta e positiva com o OD (*coef.* 0,97). A

densidade de *S.aureus* no músculo apresentou correlação positiva em relação ao oxigênio dissolvido (*coef.* 0,92), e na água com a temperatura (*coef.* 0,96) (Tabela 13).

Tabela 13. Matriz de Correlação (Pearson) entre os parâmetros ambientais e as densidade bacterianas encontradas no ponto 2.

	O.D	Temp.	pH	Sal.	E.C-B	E.C-M	E.C-A	E.T-B	E.T-M	E.T-A	S.A-B	S.A-M	S.A-A
O.D													
Temp.	-0.73												
pH	0.10	0.60											
Sal.	0.14	0.31	0.66										
E.C-B	0.09	0.55	0.89	0.24									
E.C-M	0.72	-0.33	0.39	0.77	0.06								
E.C-A	0.27	0.03	0.40	0.95	-0.05	0.86							
E.T-B	0.60	-0.15	0.51	0.87	0.15	0.98	0.92						
E.T-M	0.03	0.44	0.71	0.99	0.31	0.68	0.90	0.80					
E.T-A	0.97	-0.56	0.31	0.21	0.32	0.71	0.27	0.62	0.12				
S.A-B	-0.06	0.35	0.40	-0.43	0.77	-0.48	-0.67	-0.46	-0.35	0.11			
S.A-M	0.92	-0.41	0.48	0.39	0.43	0.78	0.40	0.73	0.31	0.98	0.10		
S.A-A	-0.83	0.96	0.44	0.36	0.31	-0.32	0.13	-0.14	0.48	-0.71	0.10	-0.55	

*O.D-Oxigênio Dissolvido, Temp.-Temperatura, Sal-Salinidade, E.C-*E.coli*, E.T-*Enterococcus* sp., S.A-*S.aureus*, A-Água, M-Músculo, B-Brânquias.

No ponto 3, as densidades de *E.coli* nas brânquias também apresentaram correlação positiva com o pH (*coef.* 0,88), as densidades no músculo mostraram correlação com a salinidade (*coef.* 0,92), e a água apresentou correlação alta e positiva com a temperatura (*coef.* 0,86), porém correlação negativa com o OD (*coef.* -0,83).

Já em relação a *Enterococcus* sp., nas brânquias e no músculo apresentaram correlação positiva com a salinidade (*coef.* 0,85 e 0,88, respectivamente), e a água com o pH (*coef.* 0,84). A densidade de *S.aureus* nas brânquias apresentou correlação positiva com o OD (*coef.* 0,79), porém negativa com a salinidade (*coef.* -0,71), o músculo apresentou correlação positiva também com o OD (*coef.* 0,96) e na água com a Salinidade (*coef.* 0,87) (Tabela 14).

Tabela 14. Matriz de Correlação (Pearson) entre os parâmetros ambientais e as densidade bacterianas encontradas no ponto 3.

	O.D	Temp.	pH	Sal.	E.C-B	E.C-M	E.C-A	E.T-B	E.T-M	E.T-A	S.A-B	S.A-M	S.A-A
O.D													
Temp.	-0.48												
pH	0.09	0.75											
Sal.	-0.22	-0.04	0.23										
E.C-B	0.56	0.38	0.88	0.13									
E.C-M	0.00	0.15	0.57	0.92	0.51								
E.C-A	-0.83	0.86	0.48	0.27	0.00	0.27							
E.T-B	0.32	-0.37	0.18	0.85	0.35	0.86	-0.22						
E.T-M	0.27	-0.28	0.26	0.88	0.39	0.90	-0.14	1.00					
E.T-A	-0.37	0.77	0.84	0.59	0.54	0.75	0.78	0.31	0.39				
S.A-B	0.79	-0.05	0.20	-0.71	0.52	-0.43	-0.55	-0.30	-0.32	-0.36			
S.A-M	0.74	-0.47	0.22	0.49	0.57	0.63	-0.56	0.87	0.85	0.06	0.20		
S.A-A	0.28	-0.37	0.17	0.87	0.32	0.86	-0.20	1.00	1.00	0.31	-0.33	0.85	

*O.D-Oxigênio Dissolvido, Temp.-Temperatura, Sal-Salinidade, E.C-*E.coli*, E.T-*Enterococcus* sp., S.A-*S.aureus*, A-Água, M-Músculo, B-Brânquias.

No ponto 4, a densidade de *E.coli* no músculo e na água apresentaram correlação positiva com a temperatura (*coef.* 0,83 e 0,75), e a água apresentou correlação negativa com a salinidade (*coef.* - 0,87). *Enterococcus* sp. na água apresentou correlação positiva com o OD (*coef.* 0,99), e negativa com a temperatura (*coef.* -0,79). A densidade de *S.aureus* no músculo apresentou correlação negativa com o pH (*coef.* -0,86) (Tabela 15).

Tabela 15. Matriz de Correlação (Pearson) entre os parâmetros ambientais e as densidade bacterianas encontradas no ponto 4.

	O.D	Temp.	pH	Sal.	E.C-B	E.C-M	E.C-A	E.T-B	E.T-M	E.T-A	S.A-B	S.A-M
O.D												
Temp.	-0.85											
pH	-0.57	0.55										
Sal.	0.04	-0.33	0.59									
E.C-B	0.25	0.10	0.55	0.30								
E.C-M	-0.44	0.83	0.55	-0.30	0.60							
E.C-A	-0.46	0.75	-0.11	-0.87	-0.12	0.67						
E.T-B	0.54	-0.28	0.36	0.46	0.93	0.25	-0.43					
E.T-M	0.58	-0.36	0.33	0.52	0.88	0.15	-0.52	0.99				
E.T-A	0.99	-0.79	-0.52	0.02	0.34	-0.34	-0.41	0.60	0.64			
S.A-B	-0.46	-0.06	0.35	0.65	-0.46	-0.48	-0.51	-0.37	-0.31	-0.53		
S.A-M	0.28	-0.52	-0.86	-0.33	-0.86	-0.79	-0.07	-0.65	-0.59	0.18	0.17	

*O.D-Oxigênio Dissolvido, Temp.-Temperatura, Sal-Salinidade, E.C-*E.coli*, E.T-*Enterococcus* sp., S.A-*S.aureus*, A-Água, M-Músculo, B-Brânquias.

No geral, entre todos os parâmetros analisados, a salinidade apresentou forte correlação com a densidade de *E.coli* e de *Enterococcus* sp. em todos os pontos e, as densidades de *S.aureus* mostraram alta correlação com o oxigênio dissolvido. Também foi possível observar que a temperatura mostrou maior correlação com a densidade de *E.coli*, principalmente no ponto 4. Em relação ao pH, as correlações encontradas se apresentaram em grande parte da análise altas e positivas.

7 DISCUSSÃO

Os ecossistemas estuarinos representam um dos mais heterogêneos ambientes costeiros em relação às variações dos fatores físicos e químicos, sendo eles influenciados tanto pelas águas do rio como pelas do mar, além da interferência da climatologia local, que pode ocasionar rápidas flutuações nos parâmetros hidrológicos e biológicos (GREGO *et al.*, 2004).

Em regiões tropicais e subtropicais o regime pluviométrico parece ser um dos principais fatores que define as variações de um sistema estuarino, além das condições fisiográficas e hidrográficas reinantes em cada área (SASSI, 1991).

No estuário de Itanhaém, Quiñones (2000) verificou que os aspectos climatológicos da região influenciam diretamente o corpo d'água, e que a distribuição das chuvas parece ser influenciada pela sazonalidade, com uma precipitação mais intensa nos meses de verão e um período de baixa ocorrência no inverno.

Os resultados de temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido da água, encontrados durante este estudo, apresentaram variações influenciadas pela sazonalidade. As maiores temperaturas foram observadas durante o verão e as menores durante o período de outono/inverno. A salinidade mostrou-se mais relacionada com o regime de chuvas, com os maiores registros observados durante o inverno, período de baixa precipitação, e os menores registros durante o verão, período de alta precipitação. De fato, segundo Souza-Pereira e Camargo (2004) no estuário do rio Itanhaém, os maiores valores de salinidade, no inverno, estão relacionados à maior influência marinha devido aos menores valores de precipitação pluviométrica nesta época do ano.

Já o oxigênio dissolvido pareceu ter sido influenciado pelas altas temperaturas, com os menores registros no verão, e os maiores no inverno. Semelhante ao que foi observado por Sartori e Nogueira (1998), que perceberam uma flutuação sazonal em que os valores de oxigênio são mais baixos no período do verão, e mais elevados no outono e inverno.

O pH tende a elevar-se com a subida da maré, uma vez que o pH da água do mar em Itanhaém, é da ordem de 8,5. Com a maré baixa, o pH desce por influência do próprio rio, que atravessa áreas de densa vegetação, que por decomposição, o enriquece em ácidos húmicos. Assim o pH dos diversos pontos do estuário está, primariamente, na dependência do grau de

mistura proporcionado pela maré (QUINONES, 2000). Além disso, o lodo do manguezal é um ambiente de alta atividade biológica, produzindo gás carbônico, ácido sulfídrico, ácidos orgânicos, tendendo a baixar o pH na maré baixa. Justificando os valores baixos encontrados durante o Outono/14, no qual as coletas ocorreram na maré vazante (baixa).

A sobrevivência de bactérias fecais no ambiente aquático é determinada pela variação destes parâmetros ambientais, e além dessas variantes, a maré também tem grande influência da hidrodinâmica local, provocando a dispersão desses microrganismos e consequentemente variando a sua densidade no ambiente (DOI *et al.*, 2014).

No outono e no inverno, estações do ano nas quais a precipitação é baixa, a salinidade é maior, e não ocorrem aumentos significativos da carga orgânica lançada nos corpos hídricos, a relação direta entre as densidades bacterianas da água e das estruturas de peixes fica mais evidente. Nas estações do ano com maior precipitação e aumento da descarga de efluentes orgânicos (verão), os interferentes tanto químicos quanto biológicos estão em grandes concentrações, o que desequilibra o sistema alterando a relação direta entre a contaminação da água e a contaminação do pescado que nela vive, tornando-se muito menos evidente, “mascarando os resultados”.

De modo geral, quanto mais poluído o ambiente aquático, maior a diversidade da microbiota que pode ser encontrada nos peixes, incluindo espécies patogênicas para humanos. Por serem uma fonte de alimento amplamente consumida pela população, a contaminação de peixes pode trazer grandes problemas de saúde pública (BURAS *et al.*, 1987; EL-SHAFAI *et al.*, 2004). Contudo, diversos estudos já relataram encontrar números mais elevados de bactérias nos peixes do que no ambiente aquático onde estavam inseridos, não encontrando relação direta da contaminação aquática com a contaminação dos peixes (BURAS *et al.*, 1985; OGBONDEMINU e OKOYE, 1992; EL-SHAFAI *et al.*, 2004; LOREZON, 2009; ALEXOPOULOS *et al.*, 2011).

No presente estudo, à semelhança do que foi observado nos trabalhos listados acima, as densidades bacterianas nos peixes foram mais elevadas do que aquelas obtidas para a água. Enquanto a concentração média para as três bactérias analisadas na água (*E.coli*, *Enterococcus* sp. e *S.aureus*) variou entre $4,0 \times 10^1$ e $8,0 \times 10^2$ UFC.100mL⁻¹ enquanto que, nas brânquias e no músculo, as concentrações desta bactéria variaram de $4,6 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ a $8,8 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, respectivamente. As análises de correlação demonstraram que a densidade

bacteriana nos peixes está diretamente correlacionada com as densidade de bactérias na água circundante, principalmente nas estações de outono-inverno.

De maneira geral, entre as três bactérias encontradas na água, a *E.coli* foi a mais abundante em praticamente todo o período de estudo, mesmo nos pontos nos quais a salinidade foi maior, principalmente no verão e no outono. Depois da *E. coli*, as maiores densidades obtidas foram, em ordem decrescente, de *Enterococcus* sp. e de *S.aureus*. Densidades de *E. coli* foram maiores que a de *Enterococcus*, em todos os pontos de coleta no Verão e na maioria dos pontos no Outono. Apenas na primavera as densidades de *Enterococcus* foram superiores que as de *E. coli*. Na primavera e no verão, a *E.coli* se apresentou mais abundante, em comparação as demais estações analisadas, o que pode estar relacionado com o período chuvoso e com o aumento populacional na alta temporada no caso do verão. Densidades superiores de *E. coli* durante o verão, inclusive nos pontos com maior salinidade, demonstram que a adaptação desta bactéria em meio salino pode proporcionar um aumento da sobrevivência delas em águas mais salinas (MUNRO *et al.*, 1987).

As densidade de *E. coli* obtidas no presente estudo, analisadas de acordo com a legislação vigente (CONAMA 357/05), que utiliza a densidade de *E.coli* para avaliar a qualidade microbiológica da água, mostrou que as águas do Rio Itanhaém estiveram dentro do limite estabelecido, ou seja, não apresentaram valores superiores a 800 UFC.100mL⁻¹ (CETESB, 2013), durante todo o período de estudo.

Embora na legislação pertinente a qualidade e a classificação dos corpos hídricos (CONAMA 357/05), considere como parâmetros microbiológicos apenas a determinação das densidades de coliformes termotolerantes e de *E. coli*, a legislação que diz respeito a avaliação da qualidade das águas recreacionais (CONAMA 274/00) considera como indicador microbiológico da qualidade de águas marinhas, a densidade de bactérias do gênero *Enterococcus*. Deste modo, como no caso deste estudo as coletas foram feitas em águas salobras e salinas, se considerarmos o limite da densidade de *Enterococcus* sp., estabelecido pela CONAMA 274/00 (< 400 UFC 100ml⁻¹) para avaliar a qualidade das águas salobras e salinas, os valores obtidos neste estudo ultrapassariam os valores permitidos, e, neste caso, o rio seria classificado como impróprio, diferentemente da classificação obtida com base nas densidades de *E. coli*.

A presença de *E.faecium* e *E.faecalis* durante todo o estudo confirmam a contaminação de origem fecal, não só do peixe como também da água, pois estas duas espécies de bactérias fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de humanos (USEPA, 2000).

De fato, diversos estudos apontaram o gênero *Enterococcus* como o melhor indicador microbiológico para classificação de corpos hídricos (FATTAL *et al.*, 1987; CABELLI *et al.*, 1982; OLIVEIRA e PINHATA, 2007; DUARTE, 2011), uma vez que as bactérias deste gênero apresentam maior tempo de sobrevivência e maior resistência à salinidade, quando comparado com *E.coli*. Além disso, alguns destes estudos demonstraram a existência de uma correlação positiva maior entre as densidades de *Enterococcus* sp. e a ocorrência de doenças gastrointestinais, comparativamente às densidades de coliformes termotolerantes (CABELLI *et al.*, 1982; DUARTE, 2011).

A legislação brasileira também não determina o uso de microrganismos de origem não-fecal, como é o caso da bactérias *Staphylococcus aureus*, para avaliar a qualidade microbiológica da água (BRASIL, 2005). Porém, alguns estudos tem relatado a importância do uso destes microrganismos na avaliação da qualidade da água, sendo a determinação de suas densidades, complementares à determinação das densidades de bactérias de origem fecal, uma vez que bactérias da espécie *S. aureus* podem causar graves problemas de saúde em humanos (TOOD, 1977; VERHOEF, 1981; HAGLER, 1986,1990). *S.aureus* é um importante patógeno humano, sendo considerado o principal agente etiológico de doenças transmitidas por águas contaminadas por animais, pessoas doentes, portadores assintomáticos e descarte de efluentes domésticos, podendo ser um ótimo indicador microbiológico da contaminação aquática (GONZALES e PARANHOS, 2010).

Neste estudo, por mais que não tenham apresentado densidades elevadas, a presença de *S.aureus* nas águas do rio Itanhém deve ser considerada de suma importância, uma vez que podem contaminar não somente as pessoas que entram em contato direto com a água, mas também os peixes e outros organismos que serão consumidos pelo homem. Os maiores valores observados ocorreram durante o verão e podem ser explicados pelo aumento populacional na época de alta temporada, que leva ao aumento da quantidade de carga orgânica lançada nos corpos hídricos e, conseqüentemente ao aumento da inserção deste patógeno na água.

Em relação aos pontos amostrados, apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas entre eles, para todas as bactérias analisadas, os valores das densidades de *E.coli* e de *Enterococcus* sp., apontaram o ponto 4 como o mais contaminado durante o estudo, o que pode estar relacionado com a sua localização próxima à foz do estuário e a jusante de vários pontos de contaminação ao longo do rio, podendo, sob a influência da maré, receber poluentes provenientes tanto do rio quanto das águas marinhas.

Já *S.aureus* foi mais abundante no ponto 1, o que pode estar relacionado com a sua proximidade a ETE-Anchieta, e ao fato desta bactéria ser mais resistente aos tratamentos realizados no esgoto comparativamente a *E. coli* e a *Enterococcus* sp. (HAGLER, 1990; GONZALES e PARANHOS, 2010).

As densidades de bactérias obtidas nas amostras de água, no presente estudo, por mais que tenham permanecido dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente (CONAMA 357/05 para Águas Salobras de classe II), tiveram grande influência nas densidade de bactérias encontrada nas diferentes estruturas dos peixes da espécie analisada (*Eugerres brasiliensis*, Curvier 1830), uma vez que a água é considerada como a principal veiculadora de bactérias não só aos humanos, mas também aos peixes (BROWN e DORN, 1977; CABELLI *et al.*, 1982; PAL e DASGUPTA, 1992; GOMES, 2007; MARQUES *et al.*, 2011).

O peixes podem albergar naturalmente uma vasta gama de bactérias, principalmente na pele, que também podem ser comumente encontradas na água. Porém, as bactérias de origem fecal, como *E.coli* e *Enterococcus*, não são habitantes comuns da flora intestinal dos peixes, sendo sua presença atrelada a contaminação por fezes humanas ou de outros animais de sangue quente na água de captura (EL-SHAFAI *et al.*, 2004; GUZMÁN *et al.*, 2004). Deste modo é possível afirmar que, as bactérias *E. coli* e a maioria das espécies do gênero *Enterococcus* sp. (*E. faecalis* e *E. faecium*), presentes nas estruturas dos peixes estudados, vieram com certeza da água.

A legislação da ANVISA que trata da qualidade microbiológica de alimentos (RDC 12/01) não utiliza bactérias de origem exclusivamente fecal, como é o caso da *E. coli* e de algumas espécies de *Enterococcus*, para avaliar a qualidade microbiológica do pescado, sendo utilizados como parâmetros microbiológicos apenas as densidades de *Salmonella* sp. e de Estafilococos coagulase positivos, cujos limites são de ausência para *Salmonella* e de até 10^3g^{-1} de pescado para Estafilococos. Contudo, diversos estudos já tem relatado a importância

da avaliação dos microrganismos indicadores de contaminação fecal, principalmente em produtos de pesca, que são retirados de ambientes possivelmente contaminados (CABELLI *et al.*, 1982; INGHAM e SCHMIDT, 2000; EL-SHAFAI *et al.*, 2004; GUZMÁN *et al.*, 2004; CUNHA E SILVA, 2006; AMARAL, 2007; GOMES, 2007; GONZALES e PARANHOS, 2010; MARTINEZ e OLIVEIRA, 2010). Tendo em vista que, a presença de bactérias indicadoras de contaminação fecal em água e alimentos, indica a possibilidade também da presença de microrganismos patogênicos, o consumo de alimentos contaminados com microrganismos de origem fecal pode provocar graves problemas a saúde do consumidor.

Dentre as estruturas internas do peixe, as brânquias e o trato intestinal são comumente encontrados como os mais contaminados (BURAS *et al.*, 1985,1987; EL-SHAFAI *et al.*, 2004; GUZMÁN *et al.*, 2004; LOREZON, 2009; GONZALES e PARANHOS, 2010). El-Shafai *et al.* (2004), em seus estudos com tilápias criadas em diferentes viveiros contaminados com efluente, encontraram a contaminação das bactérias de origem fecal nos peixes ordenadas em trato gastrintestinal > brânquias > pele > músculo. Lorezon (2009) também encontrou ordenação semelhante, trato gastrintestinal > pele > músculo, em seu trabalho com carpas também expostas a cargas de efluentes domésticos.

Ogawa e Maia (1999), Guzmán *et al.* (2004), El-Shafai *et al.* (2004) e Lorezon (2009) em seus estudos com carpas e tilápias expostas a efluentes tratados e não tratados, detectaram que o músculo, órgãos e líquido corporal de peixes vivos saudáveis estavam livres de microrganismos, enquanto que a pele e as brânquias, por estarem em contato direto com a água, apresentaram um razoável nível de contaminação. Porém Buras *et al.* (1985, 1987) e Gonzales e Paranhos (2010), observaram que, a partir de um certo limiar, que representa o limite dos mecanismos de defesa imunológica do peixe, os patógenos eram capazes de penetrar no músculo, e esta capacidade é dependente da espécie bacteriana, da espécie de peixe e tempo de exposição (BURAS *et al.*, 1985,1987; GUZMÁN *et al.*, 2004).

Grande parte dos estudos foram realizados com carpas e tilápias provenientes de tanques de criação (BURAS *et al.*, 1985,1987; OGBONDEMINU e OKOYE, 1992; PAL e DASGUPTA, 1992; EL-SHAFAI *et al.*, 2004; GUZMÁN *et al.*, 2004; LOREZON, 2009), as quais foram expostas a variáveis controladas em laboratório, bem como a descarga de poluentes. Pouquíssimos estudos foram realizados com os peixes em seus ambientes naturais, não sendo possível prever o limiar de concentração do patógeno que poderia afetar o músculo do peixe.

Neste estudo, apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as densidades bacterianas detectadas nas brânquias e detectadas nos músculos, foi possível observar que as brânquias em grande parte do período analisado, apresentaram maior contagem de bactérias em relação ao músculo, ordenação semelhante aos estudos já citados. De acordo com Arellano *et al.* (1999), a alta contaminação bacteriana das brânquias em relação aos demais órgãos deve-se primeiramente ao fato destas estruturas estarem em contato direto e contínuo com a água, e também por apresentarem alta razão superfície/volume, o que favorece a fixação de bactérias. Este autor ainda considera que as brânquias, em pouco tempo de exposição podem albergar altas taxas de microrganismos, sendo consideradas ótimas estruturas indicadoras de contaminação.

No presente estudo contudo, as densidades de bactérias nas brânquias e nos músculos apresentaram-se bastante correlacionados e, as diferenças encontradas, podem estar relacionadas com o fato das brânquias acumularem mais rapidamente as bactérias, já que são estruturas filtradoras. Buras *et al.* (1987), verificaram em seus estudos, que os picos na concentração de bactérias na água foram detectados após duas semanas, no rim e no fígado dos peixes, e, após cinco semanas no músculo, sugerindo que as concentrações bacterianas nas águas irão refletir nas estruturas corporais dos peixes apenas algumas semanas depois.

As análises de correlação também foram utilizadas para determinar as relações existentes entre as densidades bacterianas da água e das estruturas dos peixes com as variáveis ambientais e estas demonstraram que a Salinidade esteve diretamente correlacionadas com as densidades bacterianas. O pH também apresentou correlação positiva em relação as densidades bacterianas da água e das estruturas dos peixes, confirmando que os baixos valores encontrados durante o Outono influenciaram na densidade de bactérias, principalmente na água. Segundo Maier (1987), a diminuição no pH pode estar relacionada ao aumento no teor de matérias orgânica que leva, conseqüentemente, queda na quantidade de oxigênio dissolvido no corpo d'água, influenciando no crescimento bacteriano.

No geral, a densidade de bactérias foi maior nos peixes do que na água, e as diferenças encontradas entre as brânquias e os músculos comprovaram que o acúmulo de bactérias no corpo da espécie *Eugerres brasiliensis* é semelhante as carpas e tilápias, ou seja, maior nas brânquias do que no músculo.

Neste estudo, embora de acordo com a Resolução CONAMA 357/05 (que considera as densidades de *E. coli*) as densidades bacterianas estivessem dentro dos limites estabelecidos pela legislação, o peixe retirado dela não atendeu aos critérios estabelecidos pela ANVISA (RDC 12/01), sendo classificado com impróprio ao consumo. Já se fossem considerados os limites para as densidades de *Enterococcus* sp., estabelecidos pela Resolução CONAMA 274/00, não só os peixes, mas também as águas estariam acima dos limites aceitáveis.

Os resultados obtidos tornam evidente a importância da utilização das bactérias do gênero *Enterococcus* como indicadores, tanto da qualidade microbiológica de águas marinhas e salobras, quanto para os organismos retirados destes ambientes e utilizados para o consumo humano. Do mesmo modo, ficou evidente também a importância do uso de outras bactérias, de origem não fecal, como é o caso de *S. aureus*, para complementar a avaliação e os estudos da qualidade microbiológica da água e de alimentos provenientes delas.

8 CONCLUSÕES

Com os resultados encontrados durante o estudo ficou evidente que:

- Durante todo ano as variações ambientais foram semelhantes as observadas em ambientes estuarinos e semelhante ao que já foi observado para estuário do rio Itanhaém;
- Durante o ano de 2014 e início de 2015, a água do estuário não se apresentou acima dos limites estabelecidos pela legislação vigente, a partir da contagem de *E.coli*;
- A contagem das outras bactérias na água também mostrou, assim como outros estudos relatados neste trabalho, a importância delas quanto a contaminação microbiológica de qualidade da água;
- A densidade microbiológica de *S.aureus* nos peixes mostrou que a espécie do estudo está inapta para consumo, de acordo com a legislação vigente;
- Que para a espécie *Eugerres brasiliensis*, a contaminação de suas estruturas seguem padrão normalmente observado para outros peixes, com as brânquias apresentando maior concentração bacteriana em relação ao músculo;
- Com as concentrações encontradas no peixe, também ficou evidente a importância da contagem de microrganismos de origem fecal nos produtos alimentares, principalmente nos provenientes da água;
- O estuário do rio Itanhaém, possui alta capacidade de dispersão dos microrganismos de origem fecal e não-fecal na água, porém o acúmulo nos peixes aponta que este ambiente, sofre algum prejuízo de certa forma.
- A importância na atualização da legislação quanto aos microrganismos utilizados para avaliação de qualidade da água e de alimentos provenientes da mesma, bem como seus limites.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESSA, D. M. S. ; PINNA, F. V. ; ROMANO, P. ; SERIANI, R. ; SILVEIRA, F. L.; MAGINI, C. 2006. Water quality at the Estuary of the Itanhaém River, SP, Brazil. **In: Proceedings of Environmental and Health World Congress**, 2006. Santos, SP, Brasil. p: 42-45.
- AGNESE, A.P.; OLIVEIRA, V.M.; SILVA, P.P.O.; SILVA, P.P.O.; OLIVEIRA, G.A. 2001. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais, em peixes frescos comercializados no município de Seropédica - RJ. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88, p. 67-70.
- ALEXOPOULOS, A., PLESSAS, S., VOIDAROU, C., NOUSSIAS, H., STAVROPOULOU, E., MANTZOURANI, I., TZORA, A., SKOUFOS, I. and BEZIRTZOGLU, E., 2011. Microbial ecology of fish species on-growing in Greek sea farms and their watery environment. **Anaerobe**, vol. 17, p. 264-266.
- AMARAL, A.L.P. 2007. Microrganismos indicadores de qualidade de água. Programa de Pós-graduação Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (**Título de especialista**), Belo Horizonte, 37p.
- ANDRE, P., METZGER, C.; PETEY, S.; MULLER, D.; VIDON, D. J. M. 2005. Chemiluminescence of enterococci isolates from freshwater. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 245, p. 123-129.
- APHA - American Public Health Association. 2001. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4aed. 676 p.
- APHA - American Public Health Association. 2013. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. APHA / AWWA/ WEF.
- ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. 1999. Histological Changes and Copper Accumulation in Liver and Gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 62-72.
- BARBOSA, R.T. 2012. Dieta e sobreposição de nichos de duas espécies de gerreídeos, *Eugerres brasiliensis* (Cuvier, 1830) e *Diapterus rhombeus* (Cuvier, 1829) capturadas no canal de Santa Cruz, Itamaracá, Pernambuco. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco: Departamento de Pesca e Aquicultura. Recife, 56p.

- BARROS, G. C. 2003. Perda de qualidade do pescado, deteriora e putrefação. **Revista CFMV**, ano IX, v.30, p: 59-64.
- BATRES, V.S.K. 1978. A foz do rio Itanhaém e área adjacentes. Estudo da Geomorfologia Costeira. **Dissertação de Mestrado**. Fac. de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, 134p.
- BIUDES, J. F. V.; CAMARGO, A. F. M. 2006. Changes in biomass, chemical composition and nutritive value of *Spartina alterniflora* due to organic pollution in the Itanhaém River Basin (SP, Brazil). **Braz. J. Biol.**, v. 66(3), p: 781-789.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução 274 de 29 de Novembro de 2000**. Dispõem sobre a Balneabilidade das águas. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 30/05/14.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov/legis/resol./1201redc.htm>>. Acesso em: 27 maio. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº518, de 25 de março de 2004**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 27/07/2014.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Comissão Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 23/05/14.
- BROWN, L.D.; DORN, C.R. 1977. Fish, selfish and human health. **Jornal of food Protect.** v.40(10), p: 712-717.
- BURAS N.; DUEK L.; NIV S. 1985. Reaction of fish to microorganisms in wastewater. **Appl Environ Microbiol**, (50): 989–95.
- BURAS N.; DUEK L.; NIV S.; HEPHER B.; SANDBANK E. 1987. Microbiological aspects of fish grown in treated wastewater. **Water Res**, (21) p:1–10.
- CABELLI, V.J.; DUFOUR, A.P.; MCCABE, L.J.; LEVIN, M.A. 1982. Swimming-associated gastroenteritis and water quality. **Am. J. Epidemiol.**, v.115(4), p:606-616.

- CALLISTO, M; GONÇALVES, J. F. Jr; MORENO, P. 2003. *Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores-Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Ecologia de Bentos*, Belo Horizonte, MG.
- CAMARGO, A.F.M.; BIUDES, J.F.V. 2006. Influence of limnological characteristics of water in the occurrence of *Salvinia molesta* and *Pistia stratiotes* in rivers from the Itanhaém River basin (SP, Brazil). **Acta. Limnol. Bras**, v.18(3), p: 239-246.
- CAMARGO, A.F.M.; FLORENTINO, E.R. 2000. Population dynamics and net primary production of the aquatic macrophyte *Nymphaea rudgeana*. C F. Mey in lotic environment of the Itanhaém River basin (SP, Brazil). **Rev. Bras. Biol**, v.60(1), p: 83-92.
- CAMARGO, A.F.M.; NUCCI, P.R.; BINI, L.M.; SILVA JR., U.L. 1997. **The influence of the geology on the limnological characteristics of some lotic ecosystems of the Itanhaém river basin, SP-Brazil**. Verh. Internat. Verein. Limnol., 26: 860-864.
- CASTRO, M.M.V.; IARIA, S.T. Staphylococcus aureus enterotoxigênico no vestibulo nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de hospitais do município de João Pessoa, PB. Revista de Saúde Pública, v. 18, p. 235-245, 1984.
- CAZZOLI, S.V. 1997. Dinâmica sedimentar atual das praias de Cibratel e Itanhaém-suarão, município de Itanhém, Estado de São Paulo. **Dissertação de Mestrado**. Instituto Oceanografico, Universidade de São Paulo, 188p.
- CERVIGÓN, F., CIPRIANI, R., FISCHER, W., GARIBALDI, L., HENDRICKX, M., LEMUS, A.J., MÁRQUEZ, R., POUTIERS, J.M., ROBAINA, G. & RODRIGUEZ, B. 1992. Fichas FAO de identificación de especies para los fines de la pesca: guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América. **FAO**, Rome, p. 1-513.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 2001. **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo**. São Paulo, CETESB, 352p.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 2013. **Relatório de qualidade das águas Salinas e Salobras no Estado de São Paulo, 2ª parte - Relatório de Águas superficiais**. São Paulo, 140p.
- CHOI, S.; CHU, W.; BROWN,.; BECKER, S.J.; HARWOOD, V.J.; JIANG, S.C. 2003. Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. **Marine Pollution Bulletin**, v.6, p: 748-755.

- CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. 2005. Primer Version 6. Primer-E, Plymouth, UK.
- CONCEIÇÃO, J.M. 2011. Biomonitoramento espacial e temporal da qualidade da água de uma bacia hidrográfica do corredor da Mata Atlântica. **Dissertação (Mestrado)** – Centro Universitario Vila Velha: Departamento de ecologia de Ecossistemas, Vila Velha, ES. 2011.
- COSTA, A.B. 1998. **Ictiopatologia e manejo sanitário em piscicultura intensiva**. In: Simpósio sobre manejo e nutrição de peixes, 2, Anais. Campinas: CBNA, p: 73-96.
- CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. 2002. Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 3.
- CUNHA, M.A.; SILVA, M.R. 2006. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.1 (1), p: 9-13.
- DEVRIESE, L.A.; POT, B.; DAMME, L.V.; KERSTERS, K.; HAESBROUCK, F. 1995. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.26,p: 187-197.
- DIEGUES, A.C. 1999. Sócio-antropologia das comunidades de pescadores marítimos no Brasil. **Etnográfica**, v.3, p: 361-375.
- DOI, S.A.; BARBIERI, E.; MARQUES, H.L.A. 2014. Densidade colimétrica das áreas de extrativismo de ostras em relação aos fatores ambientais em Cananéia (SP). **Eng Sanit Ambient**. v.19 (2),p: 165-171.
- DUARTE, P. B. 2011. Microrganismos indicadores de poluição fecal em recursos hídricos. **Monografia (Especialização em Microbiologia)**–Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 52p.
- EL-SHAFI, S.A.; GIJZEN, H.J.; NASR, F.A; EL-GOHARY, F.A. 2004. Microbial quality of tilapia reared in fecal-contaminated ponds. **Environmental Research**, v. 95, p. 231-238.
- ESCHRIQUE, S.A.; COELHO, L.H.; OLIVEIRA, E.N.; BRAGA, E.S. 2011. **Qualidade da água como ferramenta na gestão ambiental de Estuários – Exemplo do Litoral Sul de São Paulo**. In: Oceanografia e Políticas Públicas. Publicação Especial do V Simpósio Brasileiro de Oceanografia – Santos, SP. p: 1-6.

- FACKLAM, R.R.; COLLINS, M.D. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **J. Clin. Microbiol.** v. 27 (4), p: 731–734.
- FATTAL B.; DOTAN A.; TCHORSH Y. 1992. Rates of experimental microbiological contamination of fish exposed to polluted water. **Water Res**, (26):1621–7.
- FATTAL, B.; et al. 1987. *The association between morbidity among bather and microbial quality of sea water*. **Water Sci. Tech.** vol. 18, p.59-69.
- FATTAL, B.; PUYESKY, Y.; EITAN, G.; DOR, I. 1993. Removal of indicator microorganisms in wastewater reservoir in relation to physico-chemical variables. **Water Science and Technology**. 27,p: 321-329.
- FELDHUSEN, F. 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infections**, v.2, p: 1651–1660.
- FERREIRA, FC.; PETRERE, M. 2009 The fish zonation of the Itanhaém river basin in the Atlantic Forest of southeast Brazil. **Hydrobiologia**, v. 636, p:11-34.
- FLOETER, S. R.; FERREIRA, C. E. L.; DOMINICI-AROSEMENA, A.; ZALMON, I. 2003. Latitudinal gradients in Atlantic reef fish communities: a functional approach. **J. Fish Biol**, 64: 1680–1699.
- FRANCO, B.D.G.M. 2003. **Microbiologia dos Alimentos**, 2º edição – São Paulo: Editora Atheneu.
- FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. 1988. **Food Microbiology**. Ed. New York: Mc Graw - Hill, 681 p.
- FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; BARGA, I. D.; NIGRO, M.; FORLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbour. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. 552, 187-195.
- GOIS, J.S. 2004. Análise da evolução morfológica da linha de costa com a técnica de traçadores em modelo de fundo fixo de obras costeiras. **Dissertação (Mestrado)**. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. 126p. São Paulo.
- GOMES, B.C. 2007. Enterococos em amostras de alimentos e águas: avaliação da virulência e do desempenho como indicadores de higiene. **Tese (Doutorado)**, Faculdade de

Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, São Paulo, 151p.

GONZALEZ, A.M.; PARANHOS, R. 2010. Relationships between fecal indicators and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil. **Environ Monit Assess.** n.164: 207-219.

GONZALEZ, R. G; TAYLOR. M, L; ALFARO, G. 1982. *Estudo bacteriano del agua de consumo en una comunidad Mexicana.* **Bol Oficina Sanit Panam**, v.93, p.127-40.

GUZMÁN, M.C.; BISTONI, M.A.; TAMAGNINI, L.M.; GONZÁLEZ, R.D. 2004. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, v. 38, p: 2368-2374.

HAGLER, A. N., MENDONÇA-HAGLER, L. C. S., GUIMARÃES, V. F., ARAÚJO, M. A. 1990. Staphylococcus aureus and fecal streptococci in fresh and marine surface waters of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Microbiol.** São Paulo, 21(2): 141-147.

HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SANTOS, E.; FARAGE, S.; SILVA FILHO, J.B.; SCHRANK, A.; DE OLIVEIRA, R.B. 1986. Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surfaces waters. **Sci. total Environ.**, v.12, n.58, p. 151-160.

HAJDENWURCEL, J. R. 2004. **Atlas de microbiologia de alimentos.** Fonte :Comunicação e Editora, São Paulo, v.1, p: 55-57.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 9^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 787p.

INGHAM, S.C.; SCHMIDT, D. 2000. Alternative indicator bacteria analyses for evaluating the sanitary condition of beef carcasses. **Journal of Food Protection**, v.63, p: 52-55.

ITANHAÉM. 2010. **Relatório R3-Abastecimento de água e esgotamento sanitário.** Versão revisada com incorporação dos comentários do GEL e da SSE. v(2), p: 1-152.

JAY, J.M. 1992. **Modern food microbiology.** Van Nostrand Reinhold, New York. 4ed. vol.2, p:222.

LAMERS C.H.J.; DE HASS M.J.H. 1985. Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). **Cell Tissue Res**, 242, p:491-8.

- LAMPARELLI, C.C. 1999. **Mapeamento dos ecossistemas costeiros do Estado de São Paulo**. Secr. Meio Ambiente, CETESB, São Paulo, 108 p.
- LEBOFFE, M. J.; PIERCE, B. E. 2005. **A photographic atlas for the microbiology laboratory**. Englewood: Morton Publishing Company. 3 ed.
- LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M. 2010. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Rev. Acad, Ciênc. Agrar Ambiental**, Curitiba, v.8 (4) p: 469-484.
- LOREZON, C.S. 2009. Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do estado de São Paulo. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP. 41p.
- MACHADO, T.M.; FURLAN, E.F.; NEIVA, C.R.P.; CASARINI, L.M.; ALEXANDRINO DE PÉREZ, A.C.; LEMOS NETO, M.J.; TOMITA, R.Y. 2010. Fatores que afetam a qualidade do pescado na pesca artesanal de municípios da costa sul de São Paulo, Brasil. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v.36(3), p: 213-223.
- MAIER, M.H. 1987. Ecologia da bacia do rio Jacaré Pepira (47°55" - 48°55"W; 22°30" - 21°55"S - Brasil): qualidade da água do rio principal. **Ciência e Cultura**, 39(2): 164-185.
- MARQUES, M.K.; FERNANDES, B.L.; GUILHERME, D.D.; OLINDA, R.G.; LIMA, J.T.A.X. 2011. Pescado contaminado por *Escherichia coli* na área urbana do Rio Apodi-Mossoró, Rio Grande do Norte. **Revista Centauro**, v.2 (2), p: 50-56.
- MARTINEZ, D.I.; OLIVEIRA, A. J.F.C. 2010. Faecal bacteria in *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) for biomonitoring coastal waters and seafood quality. **Braz. j. oceanogr.**, v.58 (3), p:29-35.
- MASCARENHAS, A.; MARTINS, J.; NEVES, M. 2002. **Avaliação de tratamento de águas superficiais efectuado na ETA de Alcantarilha com base na análise de indicadores de poluição fecal**. Universidade do Algarve. Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Faro, junho.
- MASON, C. 1996. **Biology of Freshwater Pollution**. 3rd edition. Longman, Harlow.
- MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. 1985. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil**. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 105p.

- MIRANDA, A. L. C. 2006. Bioacumulação de poluentes organopersistentes (POPs) em traíra (*Hoplias malabaricus*) e seus efeitos in vitro em células do sistema imune de carpa (*Cyprinus caprio*). **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 66p.
- MOLLERKE, R.O.; WIEST, J.M.; CARVALHO, H.H.C. 2002. Colimetrias como indicadores de qualidade de pescado artesanal do lago Guaíba, em Porto Alegre, RS. **Higiene Alimentar**, v. 16(99), p: 102-106.
- MOTTA, F.S.; ROSA, M.R.; NAMORA, R.C.; GADIG, O.B.F. 2014. Bony fishes (Teleostei) caught by small-scale fisheries off central to south coast of São Paulo State, Southeastern Brazil. **Biota Neotropica**. 14 (4), p: 1-7.
- MUNRO, P.M.; LAUMOND, F.M.; GAUTHIER, M.J. 1987. A previous growth of enteric bacteria on a salted medium increases their survival in seawater. *Letters of Applied Microbiology*, v.4, p.121-124.
- MURATORI, M. C. S.; COUTO FILHO, C. C. C.; ARARIPE, M. N. B. A.; LOPES, J. B.; COSTA, A. P. R. 2007. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em manipuladores da piscicultura. **Revista Científica de Produção Animal**. v. 9(2), p: 120-126.
- MURATORI, M.C.S. 2000. Consorcio suino peixe: riscos ambiental e sanitario. Proposta alternativa pela descontaminação. **Tese (Doutorado em Ciencia Animal)**. Belo Horizonte: UFMG, 71p.
- NASCIMENTO, A.R.; MOUCHREK FILHO, J.E.; CARVALHO, P.A.B.; COSTA, A.C.; CAVALCANTE, P.R.S.; VIEIRA, R.H.S.F. 2001. Colimetria das águas do rio Bacanga (S. Luís, Maranhão), de peixes e sururus capturados em suas águas. **Higiene Alimentar**, v.15, n. 84, p. 59-66.
- NOGUEIRA, S. M. B. 2001. Análise da suscetibilidade ambiental e diretrizes para o zoneamento do Núcleo Curucutu do Parque Estadual da Serra do Mar (SP). 2 vol. **Dissertação (Mestrado)** - Instituto de Geociências e Ciências Exatas de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- NOVOTNY, L.; DVORSKA, L.; LORENCOVA, A.; BERAN, V.; PAVLIK, I. 2004. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. **Vet. Med. Czech**, v.49 (9), p: 343-358.
- OGAWA, M.; MAIA, E.L. 1999. **Manual de Pesca – Ciência e Tecnologia do Pescado**. Livraria Varela. São Paulo. 430p.

- OGBONDEMINU, F.S.; OKOYE, F.C. 1992. Microbiological evaluation of an untreated domestic wastewater aquaculture system. **J. Aquacult. Trop.** 7, 27–34.
- OLIVEIRA, A.J.F.C., WATANABE PINHATA, J.M. 2007. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. **Water Res.** 42(8-9):2242-2250.
- PAGANI, F.W. 2003. Estação de tratamento de esgoto sanitário- ETE Itanhaém. **Trabalho de Conclusão de curso**, Departamento de engenharia Civil, Anhembí Morumbi, São Paulo. 71p.
- PAIVA, A.C.G.; CHAVES, P.T.C.; ARAÚJO, M.E. 2008. Estrutura e organização trófica da ictiofauna de águas rasas em um estuário tropical. **Revista Brasileira de Zoologia**, 24(2): p. 647-661.
- PAL D.; DASGUPTA C.H. 1991. Interaction of some city sewage bacteria with an Indian Major Carp, *Cirrhinus mrigala*. **J Aquat Anim Health**, 3:124–9.
- PAL, D.; DASGUPTA, C. 1992. Microbial pollution in water and its effect on fish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 4, p:32–39.
- PELCZAR, M. J. JR.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. 1996. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books. 2ª ed. v.2.
- PEREIRA, L.A. 2002. Análise ambiental da bacia do rio Itanhaém baseada na relação entre os aspectos limnológicos com fisiografia, uso da terra e sistema hidrológico. IGCE-Unesp, Rio Claro, SP, 78p (**Ph.D. Thesis**).
- QUINONES, E.M. 2000. Relações água-solo no sistema ambiental do estuário de Itanhaém (SP). **Tese (Doutorado)** – Universidade Estadual de Campinas : Faculdade de Engenharia Agrícola. 185p.
- RANKIN, J. C.; STAGG, R. M.; BOLIS, L. 1982. **Effects of pollutants on gills**. In: HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C.; SHUTTLEWORTH, T. J. Gills. Cambridge : Cambridge University Press, p: 207-220.
- RIBEIRO, E. N. 2002. **Avaliação de indicadores microbianos de balneabilidade em ambientes costeiros de Vitória/ES**. Avaliação de indicadores microbianos de balneabilidade em ambientes costeiros de Vitória/ES.

- SANTOS, C.A.M.L.; VIEIRA, R.H.S.F. 2013. Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo. v. 55(04),p : 219-228.
- SARTORI, L.P.; NOGUEIRA, M.G. 1998. Estudo limnológico na região estuarina dos rios Fazenda e Picinguaba, Parque Estadual da Serra do Mar (Ubatuba-SP), com ênfase na dinâmica dos nutrientes químicos. In: IV SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS BRASILEIROS, 1998, Águas de Lindóia, SP. **Anais.** v. 1, Manguezal, p. 296-310.
- SASSI, R. 1991. Phytoplankton and environmental factors in the Paraíba do Norte river estuary, northeastern Brazil: composition, distribution and qualitative remarks. **Bolm. Inst. Oceanogr.**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 93-115.
- SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. 2002. **Microbiologia – mecanismo das doenças infecciosas.** Ed. Guanabara Koogan, 3.ed, Rio de Janeiro/RJ, 2002).
- SERIANI, R.; ABESSA, D. M. S.; MAGINI, C.; PINNA, F. V.; SILVEIRA, F. L.; ROMANO, P. 2008. Using bioassays and benthic community to evaluate the sediment quality at the estuary of Itanhaém River, SP, Brazil. **O Mundo da Saúde São Paulo**, v.32, p: 294-301.
- SERIANI, R.; SILVEIRA, F.L.; ROMANO, P.; PINNA, F.V.; ABESSA, D.M.S. 2006. Toxicidade de água e sedimentos e comunidade bentônica do estuário do rio Itanhaém, SP, Brasil: bases para a educação ambiental. **O Mundo da Saúde São Paulo**, v. 30(4), p: 628-633.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H. 1994. Limnologia Aplicada à Aquicultura. **Boletim Técnico do CAUNESP** n.1, Jaboticabal: FUNEP, 70p.
- SOUZA-PEREIRA, P.E.; CAMARGO, A.M. 2004. Efeito da salinidade e do esgoto orgânico sobre a comunidade zooplancônica, com ênfase nos copépodos, do estuário do rio Itanhaém, Estado de São Paulo. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.26(1), p: 9-17.
- SVS-Secretaria de Vigilância em Saúde. 2010. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos.** Ministério da Saúde, Brasília. 160p.
- TOOD, E.C.D. 1977. Food borne and water borne disease in Canada. Ann Sum. T. **Food Prot.**, 45:865.

- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. 2006. **Microbiologia**. 8^aed. São Paulo: Artmed.
- TRUST, T.J. 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. **Ann Rev Microbiol**, 40:479–502.
- UGADIM, Y. 1973. Algas marinhas bentônicas do litoral sul do Estado de São Paulo e do Litoral do Estado do Paraná. I. Divisão Chlorophyta. **Bol. Botânica**, Univ. S.Paulo, v.1, p: 11-17.
- USEPA - STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2000. DRAFT Implementation Guidance for Ambient Water Quality Criteria for Bacteria – 1986. U. S. Environm. Protect. Age. Washington, DC, EPA-823-D-00-001.
- VERHOEF, J.; VERBRUGH, S. 1981. Host determinants in staphylococcal disease. **Am. Rev. Med.**, 32:107-122.
- VIEIRA R.H.S.F., RODRIGUES D.P., GOCALVES F.A., MENEZES F.G.R., ARAGAO J.S., SOUSA O.V. 2001. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. **Rev. Inst. Med. Trop.** S. Paulo, 43, 145–148.
- VIEIRA, R. H .S .F. 2004. **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado**. Livraria Varela, São Paulo, 380p.
- WINKALE, E.U. SILVA, A. das G. GALINDO, C. H. MARTINEEZ. C. B. dos R. 2001. **Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná**. Maringá, vol 23, n° 2. p 507-514.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 1996. **Biological monitoring of chemical exposure in the workplace**. Geneva: ONU, v. 1-2.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2003. **Guidelines for safe recreational water environmental**. v.1: coastal and freshwater. Geneva: WHO.
- ZAR, J. H. 1999. **Biostatistical analysis** (2nd ed.). New Jersey: Prentice-Hall.