

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PERFIL MICROBIOLÓGICO DE PEIXES E ÁGUA DE CULTIVO EM
PESQUE-PAGUES SITUADOS NA REGIÃO NORDESTE DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Cíntia Sobue Lorenzon
Bióloga

JABOTICABAL – SP
Maio – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PERFIL MICROBIOLÓGICO DE PEIXES E ÁGUA DE CULTIVO EM
PESQUE-PAGUES SITUADOS NA REGIÃO NORDESTE DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Cíntia Sobue Lorenzon

Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral
Orientador

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

JABOTICABAL – SP
Maio – 2009

Aos meus pais João e Cazue e ao meu marido Diego pelo amor, incentivo
e apoio nos momentos difíceis e alegres

Dedico e ofereço

"Dê-me tua mão e não importarei com a distância a ser percorrida.
Seguiremos juntos até onde existir vida..."

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral pela orientação, dedicação, amizade e também pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos funcionários Diba e Lila, pela amizade e ajuda nas análises microbiológicas.

Aos membros da banca pelas valiosas sugestões.

Aos pesque-pagues pela receptividade e enorme ajuda oferecida durante os experimentos.

Aos meus amigos(as) Ana Paula, Fernanda, Cláudia, Pedro, Suzana, Ana Lígia, Ângela e Maira pela amizade, dedicação e ajuda imprescindível na realização deste trabalho.

Ao Gustavo (Sumô) pela amizade, companheirismo e ajuda na captura dos peixes.

À Profa. Dra. Ludmilla Santana Soares Barros pelo auxílio e pela amizade e ensinamentos.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP que me permitiu a realização dessa Pós-Graduação.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação pela amizade e pelo companheirismo.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram de alguma forma na execução deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Local, colheita e transporte das amostras de água e de peixe.....	13
3.2 Análises microbiológicas.....	15
3.2.1 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes na água e no peixe.....	15
3.2.2 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos.....	16
3.2.3 Pesquisa da presença de bactérias do gênero <i>Salmonella</i>	17
3.3 Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
6. CONCLUSÕES.....	33
7. REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Média dos resultados dos números mais prováveis (NMP) de coliformes totais (CT), termotolerantes (CTer) e contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. nas diferentes partes do peixe e na água do viveiro dos pesque-pagues localizados na região nordeste do Estado de São Paulo, no período de abril a junho de 2008.....	21
2. Média dos resultados dos números mais prováveis (NMP) de coliformes totais (CT), termotolerantes (CTer) e contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. nas diferentes partes do peixe e na água de cultivo dos cinco pesque-pagues localizados na região nordeste do Estado de São Paulo, no período de abril a junho de 2008.....	22

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Localização dos cinco pesque-pagues situados na microbacia do Córrego Rico, região nordeste do Estado de São Paulo no período de abril a junho de 2008.....	14
2. Média logarítmica dos números mais prováveis (NMP) de coliformes totais (CT), termotolerantes (CTer) e contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. (STA) nas diferentes partes do peixe e na água de cultivo dos cinco pesque-pagues localizados na região nordeste do Estado de São Paulo, no período de abril a junho de 2008.....	22

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o número de coliformes totais, termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positivo e a presença de bactéria do gênero *Salmonella* no músculo, no tecido superficial, no trato gastrointestinal de peixes e na água de cultivo de pesque-pagues situados na microbacia do Córrego Rico, região nordeste do estado de São Paulo. Não foi detectado *Staphylococcus* coagulase positivo em nenhuma amostra de água e peixe. Na contagem de *Staphylococcus* sp. a água de enxaguadura da pele apresentou números que variam de $1,0 \times 10^2$ a $3,3 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹; no músculo de $1,0 \times 10^2$ a $6,7 \times 10^3$ UFC.g⁻¹; no trato gastrointestinal de $1,0 \times 10^3$ a $2,9 \times 10^5$ UFC.g⁻¹; e na água de cultivo de < 20 a $3,3 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹. O número mais provável (NMP) de coliformes totais na pele variou de $1,5 \times 10^3$ a $> 1,1 \times 10^4$ NMP.100mL⁻¹; no músculo variou de $2,0 \times 10$ a $> 1,1 \times 10^3$ NMP.g⁻¹; no trato gastrointestinal variou de $2,6 \times 10^3$ a $> 1,1 \times 10^4$ NMP.g⁻¹; e na água de cultivo variou de $4,2 \times 10^4$ a $> 2,4 \times 10^5$ NMP.100mL⁻¹. Para coliformes termotolerantes a água de enxaguadura da pele variou de $< 3,0 \times 10$ a $1,4 \times 10^3$ NMP.100mL⁻¹; no músculo variou de < 3 a 6 NMP.g⁻¹; no trato gastrointestinal variou de $1,2 \times 10^3$ a $5,1 \times 10^3$ NMP.g⁻¹; e na água de cultivo variou de $3,8 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^4$ NMP.100mL⁻¹. Não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre as populações de microrganismos pesquisados na água, pele e trato gastrointestinal o que reflete a relação direta entre a presença dos microrganismos na água e nesses dois locais analisados. No que se refere à musculatura verifica-se que existe diferença ($P<0,05$) entre a população de microrganismos na água e na musculatura, sendo na musculatura sempre menor. Foi isolada *Salmonella* sp. em uma amostra de músculo e em duas amostras de trato gastrointestinal. O pescado pode ser veículo de contaminação cruzada, tendo como fonte dos

microrganismos a pele e o trato gastrintestinal para sua própria musculatura e outros alimentos direta ou indiretamente. Portanto a qualidade da água deve ser monitorada e medidas de controle da contaminação da mesma aplicadas, no sentido de minimizar o risco de doenças transmitidas pelo consumo do peixe produzido nos pesque-pagues.

Palavras chave: pesque-pague, coliformes totais e termotolerantes, *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positivo.

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the number of total coliforms, thermotolerant, *Staphylococcus* coagulase positive and the presence of bacteria of the genus *Salmonella* in the muscle, in the surface tissue, in the gastrointestinal tract of fish and pond water of fee-fishing located in Córrego Rico microwatershed, northeast region of São Paulo state. *Staphylococcus* coagulase positive was not detected in any sample of pond water and fish. In the *Staphylococcus* sp. counts the surface tissue ranged from $1,0 \times 10^2$ to $3,3 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹; in the muscle from $1,0 \times 10^2$ to $6,7 \times 10^3$ UFC.g⁻¹; in the gastrointestinal tract of fish from $1,0 \times 10^3$ to $2,9 \times 10^5$ UFC.g⁻¹; and in pond water from < 20 to $3,3 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹. The most probable number (NMP) of total coliforms in the surface tissue ranged from $1,5 \times 10^3$ to $> 1,1 \times 10^4$ NMP.100mL⁻¹; in the muscle from $2,0 \times 10$ to $> 1,1 \times 10^3$ NMP.g⁻¹; in the gastrointestinal tract of fish from de $2,6 \times 10^3$ to $> 1,1 \times 10^4$ NMP.g⁻¹; and in pond water from $4,2 \times 10^4$ to $> 2,4 \times 10^5$ NMP.100mL⁻¹. In thermotolerant coliforms the surface tissue ranged from $< 3,0 \times 10$ to $1,4 \times 10^3$ NMP.100mL⁻¹; in the muscle from < 3 to 6 NMP.g⁻¹; in the gastrointestinal tract of fish from de $1,2 \times 10^3$ to $5,1 \times 10^3$ NMP.g⁻¹; and in pond water from $3,8 \times 10^2$ to $2,0 \times 10^4$ NMP.100mL⁻¹. There was no statistical difference ($P > 0,05$) among the studied populations of microorganisms in water, skin and gastrointestinal tract that reflects the relationship between the presence of microorganisms in water and in these two tissues analyzed. Concerning the muscle there is difference ($P < 0,05$) among the population of microorganisms in water and muscle, in which muscles were always smaller. *Salmonella* sp. was isolated in a sample of muscle and in two samples of gastrointestinal tract. The fish can be a vehicle of cross contamination, and the gastrointestinal tract and skin as a source of microorganisms to the muscles and other foods directly or indirectly.

Thus the water quality should be monitored and control measures of contamination applied, to minimize the risk of diseases transmitted by consumption of fish produced in fee-fishing.

Key words: fee-fishing, total and thermotolerant coliforms, *Salmonella* and *Staphylococcus* coagulase positive.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui condições hidrográficas e climáticas favoráveis para o desenvolvimento da piscicultura. No Estado de São Paulo, ocorreu um aumento expressivo no número de propriedades que se dedicam a essa atividade. Além de pólos de produção, tornaram-se também áreas de lazer para a população, já que muitos deles promovem a atividade da pesca. São os chamados “pesque-pagues”, muito difundidos na região.

O sucesso econômico dessa atividade recreativa depende de boa manutenção da qualidade da água. No entanto, em muitas situações, estes estabelecimentos não têm o aporte tecnológico adequado e vem gerando diversos problemas, notadamente ambientais e até mesmo de saúde pública.

A qualidade microbiológica da água dos viveiros pode influenciar na qualidade microbiológica do peixe e de seus produtos (PAL & DASGUPTA, 1992). Esses alimentos têm sido associados a doenças humanas e são veículo de transmissão de microrganismos patogênicos e intoxicações, constituindo-se em problema de saúde pública.

Os coliformes apontam a possibilidade da presença de poluição fecal, ou seja, ocasionada por organismos que ocorrem em grande número na microbiota intestinal humana ou de animais homeotérmicos.

Os coliformes não são habitantes normais da microbiota intestinal dos peixes, no entanto tem sido isolado do trato gastrointestinal desses animais. Esse fato indica que a microbiota bacteriana do peixe pode revelar as condições microbiológicas da água onde o peixe se encontra.

Em alimentos crus, a presença de *Staphylococcus aureus* é comum e pode não estar relacionada com contaminação humana, as enterotoxinas produzidas por *S. aureus* são

outra causa séria de intoxicações após o consumo de peixe e seus produtos e representam um risco para a saúde pública.

Registros epidemiológicos em todo o mundo mostram a importância da *Salmonella* spp. como a maior causadora de doenças bacterianas de origem alimentar no ser humano, o qual se infecta mediante a ingestão de alimentos contaminados.

A presença de diversas bactérias entéricas, tais como coliformes termotolerantes, *Salmonella* e *Staphylococcus*, nos tanques de aquicultura sugerem a necessidade de um controle rígido de higiene durante o manejo e a evisceração do peixe, a fim de prevenir a transferência de bactérias da água ou do trato gastrointestinal dos animais para a musculatura dos peixes.

Pouco se conhece a respeito do tipo de manejo realizado em muitos pesque-pagues e suas consequências sobre a qualidade da água e sanidade dos peixes pescados e destinados ao consumo. Estes problemas indicam a necessidade de estudos que possam assegurar a sustentabilidade desta atividade.

Diante desta situação o presente trabalho teve como objetivo determinar o número de coliformes totais, termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positivo e a presença de bactéria do gênero *Salmonella* no músculo, no tecido superficial, no trato gastrointestinal de peixes e na água de cultivo de pesque-pagues situados na microbacia do Córrego Rico, região nordeste do estado de São Paulo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O surgimento e expansão dos pesque-pagues no estado de São Paulo ocorreram paralelamente ao crescente desenvolvimento da piscicultura no Brasil, principalmente a partir dos anos 90, trazendo novas oportunidades de negócio e lazer (VENTURIERI, 2002).

O Estado de São Paulo contribui com mais de 45% de peixes de água doce do País (CASTAGNOLLI, 1995), estima-se que existam de 1000 a 2000 pesque-pagues no estado, dificultando a avaliação de prejuízos causados por esses empreendimentos (VENTURIERI, 2002).

A atividade traz oportunidade de novas fontes de renda e de trabalho, além da pesca amadora e do lazer proporcionado, a combinação entre aquicultura e outras práticas agrícolas são consideradas efeitos positivos dessa atividade (ELER et al, 2006).

A aquicultura é considerada um dos sistemas de produção de alimentos que mais cresce no mundo e que poderá contribuir para a demanda mundial de pescado (SOUZA, 2002).

O pescado é uma importante fonte de nutrientes de alto valor biológico e baixos níveis calóricos. No entanto é necessário controle e garantia da qualidade destes produtos para suprir as exigências crescentes no mercado consumidor.

O manejo inadequado empregado nas atividades voltadas à aquicultura podem provocar rápida deterioração dos corpos d'água, causando impactos ambientais e problemas para a saúde pública (MERCANTE et al. 2005). Essas práticas podem levar a um processo de eutrofização artificial, com a quebra da estabilidade do sistema (ARANA, 1997).

A captura e transporte de peixes atuam como agentes estressantes ao ficarem expostos a baixos valores de oxigênio dissolvido na água, alta concentração de amônia, variações bruscas de temperatura e pH. Tais fatores propiciam um aumento da

susceptibilidade às enfermidades parasitárias e infecciosas. Algumas doenças de peixes podem ser transmitidas ao ser humano, constituindo-se em problema de saúde pública (SCHALCH, 2002).

Os agentes patogênicos transmitidos pelos peixes para o ser humano, frequentemente, não causam prejuízos na produção e criação animal. Entretanto a utilização indiscriminada de produtos para o controle e prevenção de doenças, pode ter consequências diretas e indiretas no ambiente e para a saúde pública. É importante a preocupação para que o peixe não sirva de veículo de perigos, de natureza química, tais como metais pesados, resíduos industriais, ou de natureza biológica, com destaque para agentes patogênicos (LIUSON, 2003).

É comum a utilização de microrganismos indicadores de contaminação dos alimentos (coliformes totais e termotolerantes) para monitorar a qualidade das águas classificando e restringindo seu uso (MOLLERKE et al., 2002).

A microbiota do peixe vivo está diretamente relacionada à microbiota da água onde ele vive, podendo sofrer variações influenciada pelas propriedades químicas, físicas e biológicas da água (MOLLERKE et al., 2002).

Devido ao íntimo contato dos peixes com a água, a microbiota presente em sua superfície corporal, brânquias e no trato gastrintestinal, está relacionada qualitativamente e quantitativamente com aspectos microbiológicos do ambiente. Assim, peixes capturados em ambientes poluídos por esgotos, dejetos e fezes, podem albergar microrganismos patogênicos e indicadores de poluição fecal (GUZMÁN, et al., 2004).

Os contaminantes presentes no pescado podem ser classificados como microrganismos deteriorantes, microrganismos indicadores de higiene ou de processamento, microrganismos indicadores de manipulação inadequada, microrganismos

indicadores de contaminação fecal, microrganismos potencialmente capazes de provocar doenças transmitidas pelo consumo de pescado e microrganismos capazes de liberar toxinas causadoras de intoxicações ao consumidor. (PIMENTEL & PANETTA, 2003).

Entre os gêneros que fazem parte da microbiota natural do pescado podem ser citados *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio* e *Micrococcus*. Os mais importantes deteriorantes são os gêneros *Pseudomonas* e *Shewanella*, principais responsáveis pelas alterações organolépticas do pescado devido à formação de trimetilamina, ésteres, substâncias voláteis redutoras e outros compostos (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Os exames laboratoriais efetuados no pescado devem estar de acordo com os parâmetros de qualidade exigidos na legislação, os quais podem ser físico-químicos, microbiológicos, microscópicos e toxicológicos.

Os parâmetros microbiológicos adotados pela resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) para o pescado *in natura* compreendem a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo e a pesquisa de *Salmonella* em 25 g de amostra.

Para águas destinadas à aquicultura e à atividade de pesca (classe 2), a concentração de coliformes termotolerantes não deverá exceder 10^3 NMP.100mL⁻¹, de acordo com a resolução 357/05 do CONAMA (BRASIL, 2005).

2.1 BACTÉRIAS DO GRUPO COLIFORMES

Segundo Silva et al. (1997), o grupo dos coliformes totais inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou aeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Apresenta-

se cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se tanto bactérias originárias do trato intestinal de humanos quanto de outros animais homeotérmicos. Sua presença não indica necessariamente poluição de origem fecal, já que este grupo de microrganismos é encontrado naturalmente no ambiente como no solo, insetos e vegetais.

Quanto ao grupo dos coliformes totais, a legislação não indica limites em pescado, mas, é importante analisar a presença deste grupo de microrganismos em alimentos, por estarem relacionados à sua qualidade higiênica. Segundo Agnese et al. (2001), valores de coliformes totais acima de 50 a 100 NMP por grama de carne de pescado, é motivo suficiente para realizar um controle mais rígido relacionado a higiene de elaboração e comercialização deste produto nos estabelecimentos comerciais.

Os coliformes termotolerantes são capazes de fermentar a lactose com produção de gás e aldeídos ácidos, em 24h a $44,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Este grupo atua como indicador de poluição fecal, devido à sua ocorrência restrita às fezes do ser humano e dos animais homeotérmicos. Sua presença evidencia o risco da presença de organismo patogênicos de origem fecal. Fazem parte deste grupo três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (SILVA et al.,1997).

A incidência de infecções por esse grupo é mais frequente nas regiões tropicais, onde predominam aglomerações populacionais, condições sanitárias precárias e a contaminação dos suprimentos aquíferos por material de origem fecal (KONEMAN et al., 2001).

Por não fazer parte da microbiota do pescado, a presença dos coliformes, está sempre associada à contaminação fecal da água do local de captura ou manuseio inadequado do pescado fresco pelo manipulador (FRAZIER & WESTHOFF, 1988).

Morita (2005), em estudo realizado em 30 pesque-pagues localizados na região metropolitana de São Paulo detectou *E. coli* em cerca de 23% dos pesqueiros na época de seca e 7% na época chuvosa, além de correlacionar a presença desse patógeno com bactérias do gênero *Salmonella* spp.

Pal & Dasgupta (1992) e Gúzman et al. (2004) verificaram que a concentração de *E. coli* nos diferentes órgãos do peixe está relacionado com a concentração dessa bactéria na água.

Antoniolli (1993), ao realizar trabalho sobre a qualidade da carne de carpa comum alimentadas com dejetos de suínos e Easa et al. (1996), ao estudarem tilápias do Nilo tratadas com efluentes domésticos, observaram que a água influencia na condição microbiológica dos peixes. No entanto, Pilarski et al. (2004) ao analisarem amostras de músculo de carpa comum e água de viveiros fertilizados com dejetos de suíno, não verificaram relação entre a qualidade microbiológica da água e o músculo do peixe.

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

Sendo assim, o pescado oriundo tanto de sistemas de criação intensiva ou extensiva passa a ser importante veículo de grande número de microrganismos possivelmente patogênicos para o ser humano, dado ao crescimento de ações poluidoras e contaminadoras do ambiente, por lançamentos de esgotos, nos vários sistemas aquáticos disponíveis (PÁDUA, 2003).

2.2 SALMONELLA

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, composta por duas espécies *Salmonella enterica*, com seis subespécies e *Salmonella bongori*, sendo no total, mais de 2324 sorotipos (YAN et al., 2003). As salmonelas são gram-negativas, anaeróbia facultativas e multiplicam-se em temperatura entre 7°C e 49°C, sendo 37°C o valor ideal para sua multiplicação e, como não formam esporos, podem ser destruídas a 60°C por 15 a 20 minutos. A faixa de pH para seu desenvolvimento é entre 3,7 a 9,0, sendo o valor ótimo próximo de 7,0 (FRANCO & LANDGRAF 2003).

Salmonelas são consideradas a principal causa de doença entérica de origem bacteriana no ser humano, tendo produzido grandes surtos. Novos veículos de infecção estão sendo descobertos, mas sabe-se que os principais são os de origem alimentar (D'AOUST, 1995).

O principal habitat das salmonelas é o trato intestinal de aves, répteis e seres humanos. Geralmente, os alimentos são contaminados direta ou indiretamente pelas fezes dos animais no momento do abate, fezes de pessoas portadoras da bactéria, fômites, utensílios utilizados na preparação de alimentos, equipamentos e/ou pelo contato com águas poluídas (CARVALHO, 2006).

Em 1888, na Alemanha, Gurtner descreveu o primeiro surto de salmonelose, quando adoeceram 59 pessoas após terem ingerido carne crua (EVANGELISTA, 2002). A infecção por *Salmonella* spp. se dá pela transmissão fecal-oral que ocorre por meio de água e alimentos contaminados, e a grande incidência é encontrada em populações com grande densidade populacional, vivendo em precárias condições higiênicas sanitárias e socioeconômicas (CONNOR & SCHWARTZ, 2005).

No Brasil, são vários os relatos de surto alimentar por salmonelose, entre eles o ocorrido em Araraquara, SP, por *Salmonella bredeney*, afetando 561 funcionários de uma empresa com 42 hospitalizações (7,5%) (LANDGRAF et al., 1985). No surto de salmonelose ocorrido no Paraná, em 1981, dos 181 afetados, 40 foram hospitalizados (22,1%) (MOTA et al 1983). Em Pontalinda, Noroeste do estado de São Paulo, um surto de salmonelose de origem alimentar em escola afetou 211 pessoas, sendo na sua maioria crianças de 6-10 anos (KAKU et al., 1995).

O sorotipo predominante causador de infecções alimentares mudou nas últimas décadas de *S. agona*, *S. hadar* e *S. typhimurium* para *S. enteritidis*, sendo a *S. enteritidis* a causa predominante de salmoneloses em diversos países (SILVA & DUARTE, 2002).

Salmonella tem sido frequentemente associada ao trato intestinal de animais homeotérmicos, mas também isolada em animais pecilotérmicos, no qual são capazes de sobreviver e multiplicar no intestino, muco e tecidos do peixe. Portanto, tornam os peixes em um potencial veículo de transmissão de doenças humanas (AMPOFO & CLERK, 2003).

Em pesqueiros, estes microrganismos têm sido isolados em peixes, no sedimento e na água de cultivo (LINDER, 2002; LIUSON, 2003; ELER et al., 2006; MORITA et al., 2006).

De modo geral a presença de *Salmonella* no ambiente e nos animais desperta o interesse para a pesquisa e o monitoramento, uma vez que a contaminação por fezes de hospedeiros infectados ou outras fontes do meio ambiente pode colocar em risco a saúde pública.

2.3 STAPHYLOCOCCUS

São bactérias pertencentes à família Micrococcaceae, possuem células esféricas (0,5 – 1,5 μm), gram-positivas que podem ser encontradas isoladas, aos pares e em grupamentos irregulares. São imóveis e não esporuladas, anaeróbias facultativas, quimiorganotróficas com metabolismo fermentativo e respiratório. A temperatura ótima de crescimento é de 30 – 37°C. Estão associadas à pele e membranas mucosas de animais vertebrados homeotérmicos, podendo ser, eventualmente, isolados de produtos alimentares, poeira e água. Muitas espécies são patogênicas para o ser humano e animais, uma vez que produzem toxinas extracelulares, dentre elas podemos citar: *Staphylococcus intermedius*, *S. hycus*, *S. chleiferi subsp. coagulans*, *S. delphhini*. Entretanto, *S. aureus* é a espécie coagulase positivo de maior importância (HOLT et al., 1994).

O *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos de intoxicação de origem alimentar. Seu habitat é amplo tornando a sua presença largamente distribuída na natureza. É comum sua presença na superfície e mucosa humana. Sob condições apropriadas podem ser causa de infecções oportunistas. (CASTRO & IARIA, 1984),

A intoxicação alimentar provocada por este microrganismo é devido à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento e representando um risco para a saúde pública. A enterotoxina estafilocócica é termoestável e está presente no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar. Sendo o agente responsável por, aproximadamente, 45% das toxinfecções no mundo (CUNHA NETO et al., 2002).

Alguns autores relacionam testes bioquímicos como a produção de coagulase, termonuclease, hemólise e fermentação de manitol com a capacidade das cepas de

Staphylococcus spp e *S. aureus* em produzirem enterotoxinas. Estes são testes indiretos, úteis para detecção de cepas potencialmente enterotoxigênicas, embora autores tenham verificado que características fisiológicas podem ou não diferenciar cepas enterotoxigênicas das não enterotoxigênicas (CUNHA NETO et al., 2002).

A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada por náuseas, vômito, dores abdominais e diarreia, e por um curto período de incubação, de 1 a 6 horas após a ingestão do alimento responsável (PASSOS & KUAYE, 1996).

Em alimentos crus, especialmente os produtos de origem animal, a presença de *S. aureus* é comum e pode não estar relacionada com contaminação humana. Contaminação estafilocócica de couro animal, penas e pele são comuns e podem ou não ser o resultado de lesões ou tecidos contundidos (LANCETTE & TATINI, 1992).

Em estudos realizados na África, *Staphylococcus* sp. foram isolados de água de aquário e encontrados em águas de viveiros de aquicultura, sendo os membros desse gênero relacionados como patógenos de organismos aquáticos (NEMETZ & SHOTTS, 1992).

Em 3 de 10 amostras de peixe fresco, grande quantidade de *S. aureus* foram detectados acima do permitido pela legislação brasileira (VIEIRA et al., 2001). No sul do Brasil, *S. aureus* foi isolado em 20% das amostras de peixe fresco e no filé do peixe (AYULO et al., 1994). Segundo Martin et al. (1978), a presença de *S. aureus* é considerada evidência de manuseio inadequado, equipamento contaminado ou de contaminação de fontes humanas ou animais.

Pouco se sabe sobre a multiplicação de estafilococos coagulase negativo em alimentos. Essas bactérias, por produzirem muito pouca enterotoxina, raramente foram implicadas em intoxicações alimentares, pois não se multiplicam rapidamente nesse meio. No entanto, estafilococos coagulase negativo podem contaminar o alimento uma vez que os

seres humanos são portadores desses microrganismos e alguns destes podem estar relacionados a determinadas infecções humanas (PEREIRA & PEREIRA, 2005; CUNHA et al., 2006).

Algumas das espécies coagulase negativa relatadas como produtoras de enterotoxinas são: *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* (PEREIRA & PEREIRA, 2005; CUNHA et al., 2006; LANCELLOTTI, 2006). Estas espécies são associadas a uma série de outras infecções em seres humanos e animais. *Staphylococcus* coagulase negativo pode produzir quantidades menores de enterotoxinas quando comparados com *S. aureus*, mas não devem ser excluídos quando presentes em alimentos envolvidos em surtos de intoxicações alimentares (PEREIRA & PEREIRA, 2005; SANTANA et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL, COLHEITA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E DE PEIXE

As amostras de água do viveiro e os peixes foram colhidos entre abril e junho de 2008, no período da manhã, durante a semana, sendo utilizados para este fim cinco pesque-pagues situados na microbacia do Córrego Rico, região nordeste do Estado de São Paulo (Figura 1). As amostras de água do viveiro foram colhidas, em cinco pontos distintos dos mesmos (total de amostras de água foi de 25), em frascos estéreis para as análises microbiológicas. E transportadas em caixa isotérmicas com gelo reciclável para o Laboratório de Microbiologia localizado no Departamento de Engenharia Rural da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (UNESP-FCAV).

Foram colhidos aleatoriamente dez exemplares de peixes adultos no tanque com o auxílio de tarrafas e/ou varas de pescas (total de amostras de peixe foi de 50). Em seguida os peixes capturados foram colocados em sacos plásticos esterilizados e colocados em imersão em gelo para serem sacrificados e analisados as diferentes partes.



Figura 1. Localização dos cinco pesque-pagues situados na microbacia do Córrego Rico, região nordeste do Estado de São Paulo no período de abril a junho de 2008.
Fonte: Google Earth, 2009.

a) Água de enxaguadura da pele (APHA, 2001)

Foram adicionados 200 mL de água peptonada 0,1% esterilizada no saco plástico contendo o peixe. Em seguida o peixe foi massageado durante um minuto para transferir os microorganismos da pele para a água peptonada. Desta maneira foi obtida uma amostra da água de enxaguadura que foi utilizada nas análises microbiológicas.

b) Tecido muscular (APHA, 2001)

Antes de serem dissecados, a pele dos peixes foi lavada com álcool 70% para evitar contaminação do seu interior. Em seguida foram dissecados com o auxílio de instrumentos esterilizados, tomando o devido cuidado para que não ocorresse rompimento do trato gastrointestinal. Foram utilizados 25 g de músculo de cada peixe, que foram pesados em placas de petri estéreis, procedendo então a diluição da mesma com a adição de 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1% que foi homogeneizado por um minuto, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . A partir dessa solução foram realizadas diluições até 10^{-3} e em seguida realizado as análises.

c) Trato gastrointestinal (APHA, 2001)

Todo o conteúdo do trato gastrointestinal do peixe foi retirado e pesado. Foi adicionada a quantidade de água peptonada 0,1% em volume proporcional para obtenção da diluição 10^{-1} . Novas diluições decimais foram realizadas transferindo-se 1 mL da diluição anterior para tubos contendo 9 mL do diluente até obter a diluição 10^{-4} .

3.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

3.2.1 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes na água e no peixe (APHA, 1998).

Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos (série de 5 tubos para a água do viveiro e série de 3 tubos para o peixe). Para a avaliação dos coliformes totais, 1 mL da amostra de água e das diluições (água de enxaguadura da pele, musculatura e trato gastrointestinal) foram inoculadas em tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio e tubos de Durham invertidos e a incubação realizada a 35°C durante 24-48 horas. Após a incubação foi verificada a presença de gás nos tubos de Durham, quando isto ocorreu foi considerada

prova presuntiva positiva. Alíquotas dos tubos positivos foram transferidas para tubos contendo caldo lactose bile 2% verde brilhante e tubos de Durham invertidos que foram incubados a 35°C por 24-48 horas. A presença de gás nos tubos de Durham indicou prova confirmatória positiva para coliformes totais. A partir do número de tubos com gás e com o auxílio de uma tabela de NMP, foi obtido o número mais provável de coliformes totais por 100 mL ou grama da amostra.

Para coliformes termotolerantes, alíquotas dos tubos de caldo lauril sulfato triptose com produção de gás, foram transferidas para tubos com caldo EC (*Escherichia coli*) e tubos de Durham e a incubação realizada em banho-maria a 44,5°C por 24 horas. A presença de gás nos tubos de Durham indicou prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes. Por meio da tabela de NMP e baseado no número de tubos de caldo EC com produção de gás foi obtido o NMP de coliformes termotolerantes por 100 mL ou grama da amostra (APHA, 1998).

3.2.2 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivos (APHA, 1998).

Volumes de 100 mL das amostras de água e suas diluições decimais foram filtrados em membrana com porosidade de 0,45 µm e transferidas para placas de Petri contendo Ágar Baird Parker. Para as diferentes partes do peixe, foi transferido 0,1 mL das diluições obtidas das amostras da água de enxaguadura da pele, do músculo e trato gastrointestinal para placas de Petri, contendo Ágar Baird Parker. O inóculo foi espalhado com auxílio da alça de Drigalsky. As placas de Baird Parker foram incubadas a 36°C por 48 horas.

As colônias características do gênero *Staphylococcus* (negras brilhantes), assim como colônias atípicas, foram quantificadas e coradas pelo método de Gram. As colônias

que se apresentaram como microrganismos em forma de cocos, agrupados em cachos e Gram positivos, foram transferidas para tubos contendo ágar TSA (“Tryptone Soy Agar”) inclinado e incubados a 37°C por 24 horas.

Posteriormente essas colônias foram submetidas ao teste da catalase e uma alíquota do cultivo em TSA foi transferida para uma placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. A formação de bolhas indicou prova positiva para catalase.

No teste da coagulase (MaC FADDIN, 1976) alíquotas do cultivo em TSA foram transferidas para tubos com caldo BHI (“Brain Heart Infusion”) e foram incubados a 36°C por 24 horas. Foram transferidos 0,3 mL do cultivo em BHI para tubos de hemólise (10x100mm). Foram adicionados em cada tubo 0,5 mL de plasma de coelho ressuspenso com solução salina estéril. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C e examinada a formação de coágulo após 1, 2, 3, 4 e 24 horas de incubação. Foram considerados coagulase positivos os *Staphylococcus* que coagularam o plasma de coelho dentro desse período de tempo.

3.2.3 Pesquisa da presença de bactérias do gênero *Salmonella* (APHA, 2001).

a) Pré-enriquecimento

Foi feito um pré-enriquecimento primário, diluindo 450 mL da amostra de água em 50 mL de água peptonada tamponada 1%, e a incubação foi realizada a 37°C por 24 horas. As amostras do músculo, do trato gastrointestinal e da água de exaguadura dos peixes obtidas em água peptonada a 0,1% foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

b) Enriquecimento seletivo

Duas alíquotas de 1 mL cada, da cultura do pré-enriquecimento foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de caldo selenito cistina e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, adicionados de 0,1 mL de uma solução de novobiocina a 0,4%, originando uma concentração de 40 µg do princípio ativo por mililitro de meio. A incubação foi realizada a 37°C por 24 horas.

c) Plaqueamento seletivo

Com auxílio de alça de níquel-cromo cada cultura em caldo de enriquecimento foi semeada, pela técnica de esgotamento, em ágar verde brilhante e ágar MacConkey, seguido de incubação a 37°C por 24 horas.

d) Identificação Presuntiva

Das culturas obtidas no plaqueamento seletivo foram tomadas, com auxílio de uma agulha de níquel-cromo, de cada uma das placas semeadas, três a cinco colônias com características sugestivas do gênero *Salmonella* e inoculadas em tubos contendo ágar TSI (“Triple Sugar Iron”) com incubação realizada a 37°C por 24 horas. As colônias que se presumiram serem de *Salmonella* foram semeadas em tubos contendo ágar TSA inclinado, incubados a 37°C por 24 horas para comprovação sorológica.

e) Confirmação sorológica do gênero *Salmonella*

Da cultura em ágar TSA foi transferida uma alçada para lâminas de vidro contendo gotas de solução salina estéril. Após homogeneização foi adicionada uma gota de soro anti-salmonela polivalente somático-O, a lâmina foi movimentada e foi feita a leitura. Ocorrendo

a aglutinação da mistura a prova foi considerada positiva. O mesmo procedimento foi realizado para o soro polivalente flagelar-H. Foi considerada como de *Salmonella* sp. a cultura que apresentou positividade em ambas as provas, que sempre foram acompanhadas de provas com padrão positivo e negativo.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados microbiológicos foram analisados utilizando valores em logaritmo e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (SAS, 1991).

Foram feitas comparações de médias de coliformes (totais e termotolerantes) e *Staphylococcus* coagulase entre os tecidos nos peixes e na água de cultivo dentro de cada pesque-pague.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos números mais prováveis (NMP) de coliformes totais, termotolerantes e contagem de *Staphylococcus* sp. nas diferentes partes do peixe e na água de cultivo dos cinco pesque-pagues analisados estão apresentados na Tabela 1.

Na Tabela 2 é apresentada a média dos resultados dos NMP de coliformes totais, termotolerantes e contagem de *Staphylococcus* sp. nas diferentes partes do peixe e na água de cultivo dos cinco pesque-pagues analisados.

O gráfico com a média logarítmica do NMP de coliformes totais, termotolerantes e contagem de *Staphylococcus* sp. nas diferentes partes do peixe e na água de cultivo dos cinco pesque-pagues está apresentado na Figura 1.

Não foi detectado *Staphylococcus* coagulase positivo em nenhuma amostra de peixe e de água. Para a contagem de *Staphylococcus* sp. não houve diferença significativa entre as diferentes partes do peixe e na água de cultivo ($P > 0,05$), com exceção do pesque-pague 1 (Tabela 1) onde a contagem de *Staphylococcus* sp. na água do viveiro diferiram significativamente quando comparado com aquelas encontradas nas amostras de peixe ($P < 0,05$).

A contagem de *Staphylococcus* sp. a água de enxaguadura da pele apresentou média de NMP que variam de $1,0 \times 10^2$ a $3,3 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹; no músculo de $1,0 \times 10^2$ a $6,7 \times 10^3$ UFC.g⁻¹; no trato gastrintestinal de $1,0 \times 10^3$ a $2,9 \times 10^5$ UFC.g⁻¹; e na água do viveiro de < 20 a $3,3 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹.

Em Zâmbia (África), tanques de pisciculturas apresentaram contagens de *Staphylococcus* spp. na ordem de 10^6 UFC.mL⁻¹ (NTENGWE & EDEMA, 2008), ou seja, maiores que os encontrados neste trabalho.

Tabela 1. Média dos resultados dos números mais prováveis (NMP) de coliformes totais (CT), termotolerantes (CTer) e contagem de *Staphylococcus* sp. nas diferentes partes do peixe e na água do viveiro dos pesque-pagues localizados na região nordeste do Estado de São Paulo, no período de abril a junho de 2008.

Pesque-pague	Amostras	CT (NMP.100mL ⁻¹ ou g ⁻¹)	CTer (NMP.100mL ⁻¹ ou g ⁻¹)	<i>Staphylococcus</i> sp. (UFC.mL ⁻¹ ou g ⁻¹)
1	Pele	1,5 x 10 ³ b*	1,2 x 10 ³ ab	3,3 x 10 ⁵ a
	Músculo	2,0 x 10 ³ c	0,6 x 10 ³ b	6,7 x 10 ³ a
	Trato gastrintestinal	5,8 x 10 ³ b	5,1 x 10 ³ a	2,9 x 10 ⁵ a
	Água do viveiro	4,2 x 10 ⁴ a	0,8 x 10 ³ a	2,0 x 10 ³ b
2	Pele	1,8 x 10 ³ b*	< 3,0 x 10 ³ b	1,0 x 10 ⁴ a
	Músculo	4,9 x 10 ³ c	< 0,3 x 10 ³ b	5,5 x 10 ² a
	Trato gastrintestinal	2,6 x 10 ³ b	2,9 x 10 ³ a	2,5 x 10 ⁴ a
	Água do viveiro	5,3 x 10 ⁴ a	4,4 x 10 ² a	< 2,0 x 10 ³
3	Pele	3,1 x 10 ³ b*	9,5 x 10 ² a	2,2 x 10 ⁴ a
	Músculo	2,4 x 10 ³ c	0,7 b	1,0 x 10 ² a
	Trato gastrintestinal	5,0 x 10 ³ ab	2,1 x 10 ³ a	2,0 x 10 ³ a
	Água do viveiro	5,1 x 10 ⁴ a	3,8 x 10 ² a	< 2,0 x 10 ³
4	Pele	> 1,1 x 10 ⁴	1,4 x 10 ³ a*	1,0 x 10 ² a
	Músculo	> 1,1 x 10 ³	0,6 x 10 ³ b	3,7 x 10 ² a
	Trato gastrintestinal	> 1,1 x 10 ⁴	1,2 x 10 ³ a	1,0 x 10 ³ a
	Água do viveiro	> 2,4 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁴ a	3,3 x 10 ² a
5	Pele	> 1,1 x 10 ⁴	3,6 x 10 ³ b*	3,3 x 10 ³ a
	Músculo	> 1,1 x 10 ³	0,1 x 10 ³ c	1,0 x 10 ² a
	Trato gastrintestinal	> 1,1 x 10 ⁴	2,5 x 10 ³ a	3,4 x 10 ⁴ a
	Água do viveiro	> 2,4 x 10 ⁵	2,5 x 10 ³ a	< 2,0 x 10 ³

* Médias seguidas da mesma letra, em cada coluna e dentro do mesmo pesque-pague, não diferem estatisticamente, a nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Tabela 2. Média dos resultados dos números mais prováveis (NMP) de coliformes totais (CT), termotolerantes (CTer) e contagem de *Staphylococcus* sp. nas diferentes partes do peixe e na água de cultivo dos cinco pesque-pagues localizados na região nordeste do Estado de São Paulo, no período de abril a junho de 2008.

Amostras	CT (NMP.100mL ⁻¹ ou g ⁻¹)	CTer (NMP.100mL ⁻¹ ou g ⁻¹)	<i>Staphylococcus</i> sp. (UFC.mL ⁻¹ ou g ⁻¹)
Pele	2,1 x 10 ³	7,2 x 10 ²	7,3 x 10 ⁴
Músculo	3,0 x 10	0,2 x 10	1,5 x 10 ³
Trato gastrointestinal	4,4 x 10 ³	2,8 x 10 ³	7,2 x 10 ⁴
Água do viveiro	4,9 x 10 ⁴	4,8 x 10 ³	1,7 x 10 ²

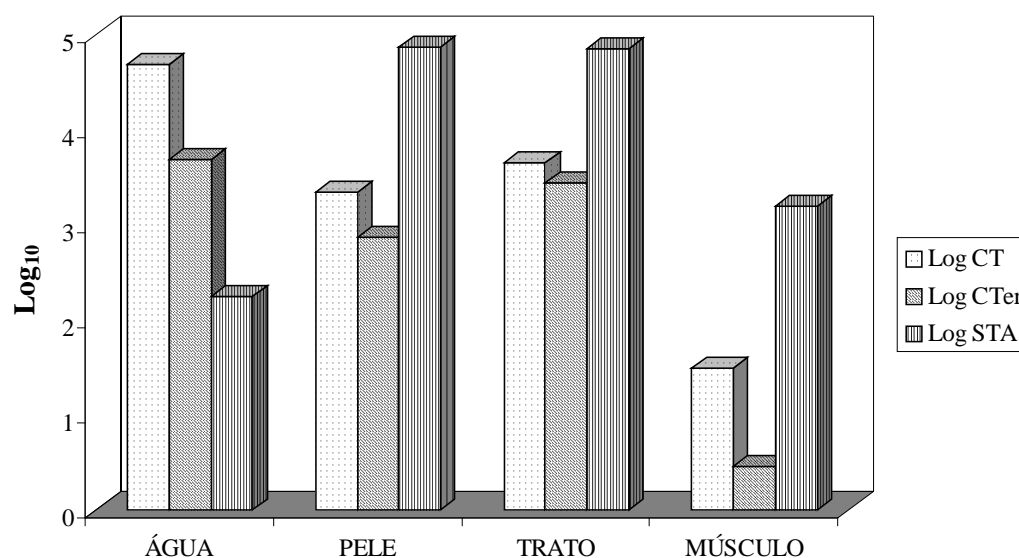


Figura 2. Média logarítmica dos números mais prováveis (NMP) de coliformes totais (CT), termotolerantes (CTer) e contagem de *Staphylococcus* sp. (STA) nas diferentes partes do peixe e na água de cultivo dos cinco pesque-pagues localizados na região nordeste do Estado de São Paulo, no período de abril a junho de 2008.

A ausência de *Staphylococcus* coagulase positivo pode ser explicada pelo fato de que essas bactérias geralmente são encontradas no corpo humano (trato respiratório, mucosas nasais e pele) e transferida ao alimento por pessoas com precários hábitos de higiene durante o manuseio e/ou armazenamento do produto. No presente estudo, os peixes foram coletados diretamente dos viveiros, ou seja, não receberam nenhum tipo de manipulação.

Resultados semelhantes foram obtidos por Costa et al. (2007) ao analisar amostras de *sushi* de salmão comercializados na cidade de Sobral – CE. Também não detectaram *Staphylococcus* coagulase positivo, sendo que a contagem de *Staphylococcus* spp. variou de $<10^2$ a $3,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹.

Porém, pesquisas indicam que *Staphylococcus* coagulase negativo pode produzir enterotoxinas, contribuindo para a intoxicação alimentar. A esse respeito Cunha et al. (2006) verificaram a capacidade toxigênica de linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo e identificaram por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) os genes responsáveis pela produção de enterotoxinas. Dentre os alimentos analisados 22,7% foram positivos para *Staphylococcus* coagulase negativo com crescimento entre 10^2 a 10^6 UFC.g⁻¹. Vale ressaltar que esses alimentos foram processados, portanto ficaram sujeitos à contaminação pelos manipuladores.

Em Taiwan, *S. epidermidis* foi responsável pela morte de várias tilápias (*Oreochromis* spp.) entre 1992 e 1996. Este foi o primeiro relato sobre o isolamento de estafilococos patogênico em tilápias (HUANG et al., 1999). Nos pesque-pagues, várias pessoas ficam em contato direto com os peixes. Isto se torna um fator de risco tanto para o peixe como para o ser humano, uma vez que o *S. epidermidis* é responsável por 50 a 80% das infecções causadas por estafilococos coagulase negativo (LANCELLOTTI, 2006).

Nos pesque-pagues 3, 4 e 5 (Tabela 1) o NMP de coliformes totais e termotolerantes no músculo foi menor ($P < 0,05$) quando comparado com o NMP obtido em outros órgãos e na água do viveiro.

Nos cinco pesque-pagues o número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes na água de cultivo e no trato gastrointestinal não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$). Nos pesque-pagues 1 e 2 (Tabela 1) o NMP dessas bactérias não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) na pele e no músculo.

Nos pesque-pagues o NMP de coliformes totais na pele variou de $1,5 \times 10^3$ a $> 1,1 \times 10^4$ NMP.100mL⁻¹; no músculo variou de $2,0 \times 10$ a $> 1,1 \times 10^3$ NMP.g⁻¹; no trato gastrointestinal variou de $2,6 \times 10^3$ a $> 1,1 \times 10^4$ NMP.g⁻¹; e na água de cultivo variou de $4,2 \times 10^4$ a $> 2,4 \times 10^5$ NMP.100mL⁻¹.

A grande concentração de coliformes totais na água dos pesque-pagues não representa necessariamente problemas para a saúde uma vez que não é um indicativo de contaminação fecal. Porém, de acordo com El-Shafai et al. (2004) a composição microbiológica da água de cultivo reflete na variedade de bactérias presentes na pele do peixe.

No presente estudo, a pele e o trato gastrointestinal dos peixes apresentaram contagens de coliformes totais semelhantes entre si, enquanto que no músculo a concentração permaneceu baixa, com exceção dos pesque-pagues 4 e 5. A sua presença nas diferentes partes do peixe não indica diretamente a presença de patógenos, no entanto serve como indicativo da qualidade higiênica e informa sobre o grau de poluição microbiana a que está exposto o alimento em estudo (LIUSON, 2003).

Martins et al. (2002) verificaram uma variação de $4,0 \times 10$ até $2,3 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ de coliformes totais em filés de carpas (*Cyprinus carpio*) e tilápias (*Oreochromis niloticus*) evisceradas provenientes de pesque-pagues em Toledo – PR.

Liuson (2003) analisou tilápias (*Oreochromis* spp.) inteiras oriundas de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo – SP, os resultados obtidos apresentaram uma variação de $< 0,3$ até $4,6 \times 10^7$ NMP.g⁻¹ de coliformes totais, bem superiores aos números encontrados no presente estudo. O autor atribuiu essa constatação como preocupante pois o peixe, que também foi colhido diretamente do tanque de produção, estava com cargas microbianas bastante elevadas.

Para coliformes termotolerantes a água de enxaguadura da pele variou de $< 3,0 \times 10$ a $1,4 \times 10^3$ NMP.100mL⁻¹; no músculo variou de < 3 a 6 NMP.g⁻¹; no trato gastrointestinal variou de $1,2 \times 10^3$ a $5,1 \times 10^3$ NMP.g⁻¹; e na água de cultivo variou de $3,8 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^4$ NMP.100mL⁻¹.

De acordo com a resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) para águas destinadas à aquicultura e à atividade de pesca (classe 2), a concentração de coliformes termotolerantes não deverá exceder 10^3 NMP.100mL⁻¹. De acordo com os resultados do presente estudo, três pesque-pagues (pesque-pague 1, 3 e 5) estavam em desacordo com a legislação vigente. Segundo Boyd & Tanner (1998) a contaminação dos viveiros por coliformes termotolerantes pode ocorrer pelo aporte de fezes humanas e de animais homeotérmicos.

Durante o experimento foi possível observar vários animais, tais como caprinos, bovinos, cães e aves circulando no entorno dos viveiros. Outra possível via de contaminação por coliformes termotolerantes é na água de abastecimento. Fato observado por Gatti Junior (2008) que encontrou variação de 2,19 a 4,14 log NMP.100mL⁻¹ de

Escherichia coli na água de abastecimento dos viveiros dos pesque-pagues estudados no presente trabalho.

Outro fator relevante que pode ter contribuído para a alta concentração de coliformes termotolerantes na água é o fluxo de renovação de água nos viveiros. No pesque-pague 4, onde ocorreu a maior concentração de coliformes termotolerantes, o proprietário realizava a renovação de água entre viveiros três vezes por semana, sendo que a vazão média foi de $0,75 \text{ L.s}^{-1}$ (GATTI JUNIOR, 2008). A vazão média de água encontrada no pesque-pague 1 foi 5 L.s^{-1} , no 2 foi de $1,3 \text{ L.s}^{-1}$, no 3 foi de $3,9 \text{ L.s}^{-1}$, no 4 foi de $0,75 \text{ L.s}^{-1}$ e no 5 foi de $0,70 \text{ L.s}^{-1}$.

Vale ressaltar que a má qualidade da água, além de contaminar os peixes e gerar risco aos consumidores, pode resultar na queda de imunidade do peixe, aumentando a suscetibilidade desses animais à infecção por microrganismos patogênicos (ESCHER et al., 1999). Esse fato resulta na utilização indiscriminada de produtos para o controle e prevenção de doenças, que pode ter consequências diretas e indiretas no ambiente e para a saúde pública. É importante a preocupação para que o peixe não sirva de veiculador de perigos, de natureza química, tais como metais pesados, resíduos industriais, ou de natureza biológica (LIUSON, 2003).

Como a qualidade microbiológica da água dos viveiros influencia na qualidade microbiológica do peixe (PAL & DASGUPTA, 1992), pode-se observar que a concentração de coliformes termotolerantes na água foi similar ao encontrado no trato gastrointestinal do peixe. Esses resultados corroboram com os achados de Guzmán et al. (2004) na qual sugerem que a maioria das bactérias entéricas presentes na água geralmente é recuperada no trato gastrointestinal dos peixes.

Resultados similares encontrados neste experimento foram obtidos por Al-Harbi (2003), onde ao estudar tilápias híbridas (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*) verificou que coliformes termotolerantes na água e no trato gastrintestinal do peixe, que variaram de $2,87 \times 10^2$ a $\geq 1,6 \times 10^3$ NMP.100mL⁻¹ e $2,37 \times 10^2$ a $\geq 1,1 \times 10^3$ NMP.g⁻¹ respectivamente, estavam correlacionados.

No presente estudo as altas concentrações de coliformes termotolerantes na água dos viveiros foram relacionadas com os altos números de coliformes no trato gastrintestinal e na pele dos peixes. Ordenando os níveis de contaminação de coliformes termotolerantes nos diferentes órgãos dos peixes em ordem decrescente temos: trato gastrintestinal > pele > músculo.

Resultados semelhantes foram obtidos por El-Shafai et al. (2004) na qual tilápias criadas em diferentes viveiros contaminados com efluente obtiveram uma contaminação dessa bactéria ordenada em trato gastrintestinal > brânquias > pele > fígado, enquanto no músculo não foram detectados coliformes termotolerantes. Nesse experimento o NMP de coliformes termotolerantes na água do viveiro variou de $1,7 \times 10^2$ a $9,4 \times 10^3$ UFC.100mL⁻¹, o trato gastrintestinal variou de $5,3 \times 10^3$ a $3,8 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ e a pele variou de $6,0 \times 10^2$ a $6,5 \times 10^3$ UFC.cm⁻¹.

Com relação aos músculos dos peixes, todos apresentaram contagem de coliformes termotolerantes abaixo de 10^2 NMP.g⁻¹.

Lira et al. (2001) ao estudar peixe-serra (*Pristis pectinata*) comercializado em Maceió – AL encontraram desde a ausência até 43 NMP.g⁻¹ de coliformes termotolerantes. Rall et al. (2008) ao analisarem peixe fresco comercializado na cidade de Botucatu – SP verificaram variações de < 3 a 93 NMP.g⁻¹ de coliformes termotolerantes. Tavares et al. (2008) verificaram uma variação de < 3 a 3,6 NMP.g⁻¹ de coliformes termotolerantes em

tilápias cultivadas em sistemas de reúso de efluentes domésticos. Todos os resultados citados anteriormente corroboram com os achados do presente trabalho.

Ogawa & Maia (1999) citam que músculos, órgãos e líquido corporal de peixes vivos saudáveis são livres de microrganismos, enquanto que a pele e brânquias, por estarem em contato com a água, apresentam um razoável nível de contaminação.

Porém a partir de um certo limiar, que representa o limite dos mecanismos de defesa natural do peixe, patógenos são capazes de penetrar o músculo (BURAS et al., 1985; EL-SHAFI et al., 2004).

De acordo com Strauss (1985), a invasão da musculatura dos peixes por bactérias pode ocorrer quando estes são produzidos em viveiros contendo concentrações de coliformes termotolerantes maiores que 10^4 por 100 mL. O potencial de invasão do músculo aumenta com a duração da exposição do peixe à água contaminada.

Com exceção do pesque-pague 4, as águas dos viveiros permaneceram com população abaixo de 10^4 NMP.100mL⁻¹ de coliformes termotolerantes. No entanto, mesmo em baixos níveis de contaminação pode haver alta concentração de patógenos no trato gastrointestinal do peixe podendo assim contaminar a carne, no momento da evisceração do animal, constituindo um fator de risco ao consumidor (ESPOSTO et al., 2007).

Essa contaminação foi observada por Buras et al. (1985) e Ogbondeminu & Okoye (1992) que ao estudarem tilápia e carpa comum verificaram contaminação dos músculos por coliformes termotolerantes mesmo quando a concentração na água foi menor que 10^4 por 100 mL.

Apesar da baixa concentração de coliformes termotolerantes no músculo dos peixes (< 3 a 6 NMP.g⁻¹) encontrados neste experimento, a sua presença indica um risco potencial à saúde do consumidor, uma vez que esses peixes ainda não foram processados.

O risco envolvido no consumo de peixe contaminado não é necessariamente associado apenas a presença de bactérias no tecido utilizado para alimentação humana. A infecção humana pode ocorrer quando a parte comestível é contaminada durante o manuseio do pescado, veiculando microrganismos para musculatura do peixe, equipamentos, outros alimentos, ambiente de preparo por microrganismos presentes em outras partes do peixe (contaminação cruzada), geralmente vísceras, pele e brânquias (ESPOSTO et al., 2007). Esses autores advertem para o cuidado na manipulação no momento da retirada das vísceras e no preparo do produto, pois esta é uma via potencial de transmissão de bactérias patogênicas.

Ao analisar branquinhas (*Curimatus ciliatus*) comercializados em Teresina – PI, Muratori et al. (2004) verificaram que 67,6% dos peixes apresentavam coliformes termotolerantes acima de 10^2 NMP.g⁻¹. Falhas ocorridas durante a manipulação deste pescado tais como: captura, armazenamento e transporte, podem ter causado os elevados índices de contaminação fecal.

Em pesque-pagues, Martins et al. (2002) verificaram que 67% e 50% das amostras dos filés de tilápia e de carpa, respectivamente, estavam acima de 10^2 NMP.g⁻¹ de coliformes termotolerantes. Os autores acreditam que estes valores excessivos podem ter ocorrido devido a uma manipulação inadequada do filetador/eviscerador, permitindo o contato do músculo com as vísceras.

Vieira et al. (2000) estudou a influência das condições higiênico-sanitárias do processo de produção de filés de tilápias em Campina Grande – PB. Os resultados mostraram contaminação crescente de coliformes totais e termotolerantes ao longo da cadeia produtiva. Peixes coletados no açude apresentaram 3 NMP.g⁻¹ de coliformes totais e termotolerantes, enquanto que no filé congelado coletado no frigorífico encontraram

valores de $4,6 \times 10^3$ NMP.g⁻¹. Os autores concluíram que houve deficiências higiênicas por parte dos manipuladores e que o local de processamento dos peixes eram inadequados.

No pesque-pague 2, ocorreu presença de *Salmonella* sp. em 25 gramas de músculo em um peixe e também foi isolada em uma amostra de trato gastrintestinal. No pesque-pague 5, houve presença de *Salmonella* sp. em apenas uma amostra de trato gastrintestinal.

A presença de *Salmonella* sp. na musculatura do peixe encontrada no presente estudo está em desacordo com o parâmetro preconizado pela RDC nº 12 (BRASIL 2001), que prevê ausência deste agente em 25 gramas de pescado *in natura*. Sabe-se que, em alguns casos, são necessárias poucas células infectantes de *Salmonella* (1-10 células para alguns sorotipos) para causar sintomas clínicos no ser humano (LINDER, 2002; MARTINS, 2006).

Segundo Ekperigin & Nagajara (1998), vários sorotipos de *Salmonella* são potencialmente patogênicos para o ser humano, podendo causar desde leves sintomas, como também levar o indivíduo até a morte. A cocção do alimento elimina o risco deste patógeno, porém a maior preocupação é quando este é consumido cru, como nos casos de *sushi* e *sashimi* (MARTINS, 2006).

Vieira et al. (2000) verificaram que *Salmonella* spp. esteve presente ao longo da cadeia de produção de filés de tilápias. Foi isolada desde o peixe capturado no açude até no filé congelado coletado no posto de venda. Este fato indica uma maior resistência da *Salmonella* spp. às condições adversas encontradas ao longo da cadeia de produção.

A presença de *Salmonella* sp. em duas amostras do trato gastrintestinal (4,44%) é preocupante pois essa bactéria pode contaminar a carne durante sua manipulação. Como a maioria dos frequentadores dos pesque-pagues leva para casa o peixe eviscerado pelos

funcionários, Martins et al. (2002) advertem para a má manipulação e o baixo nível de processamento dos pescados nesses estabelecimentos.

No Egito, Youssef et al. (1992) verificaram em tilápias a presença de *Salmonella* em 3,9% das amostras de trato gastrintestinal. Em Botucatu – SP, Linder (2002) analisou o conteúdo intestinal de peixes provenientes de pesqueiros e obteve presença desse patógeno em 5,66% das amostras. Liuson (2003) também relatou a presença de *Salmonella* em peixes oriundos de pesqueiros e encontrou 7,8% das amostras positivas.

Salmonella spp. são geralmente encontradas em altas concentrações no sedimento do que na coluna d'água (MOORE et al., 2003). Isto tem sido atribuído a sedimentação, adsorção bem como na maior sobrevivência desse patógeno no sedimento (BURTON et al., 1987). As provas apresentadas por estes estudos sugerem que os sedimentos aquáticos são reservatórios para os patógenos, o que representa um risco potencial para o ser humano e animais.

Em pesqueiros, Linder (2002) verificou que 38,46% das amostras de sedimento foram positivas para *Salmonella* sp. Com base nesses resultados o autor concluiu que a contaminação do sedimento e do peixe foi devido a uma série de fatores tais como a presença de várias espécies de animais no entorno dos tanques, o uso não controlado de vários tipos de iscas e alimentos para a ceva e o retorno das vísceras dos peixes aos tanques.

Como no presente estudo não foi isolado *Salmonella* sp. nas águas dos viveiros, a presença desta bactéria nos peixes pode ser atribuída pelo sedimento contaminado por fezes de mamíferos e aves presentes no entorno dos viveiros.

Observa-se que não houve diferença estatística entre os números de microrganismos pesquisados na água, pele e trato gastrintestinal o que reflete a relação direta entre a presença dos microrganismos na água e nesses dois locais analisados. No que se refere à

musculatura verifica-se que houve diferença significativa entre os números de microrganismos na água e na musculatura, sendo que na musculatura os valores foram sempre menores. Este fato se relaciona com a proteção da musculatura à contaminação, o que não ocorre na pele e no trato gastrintestinal.

Uma análise, do ponto de vista sanitário, da relação direta entre presença de microrganismos na água e na pele e trato gastrintestinal, partes geralmente não comestíveis no pescado, colocam o pescado como veículo de contaminação cruzada, tendo como fonte dos microrganismos a pele e trato gastrintestinal para sua própria musculatura e outros alimentos direta ou indiretamente. Assim a qualidade da água deve ser monitorada e medidas de controle da contaminação da mesma aplicadas, no sentido de minimizar o risco de doenças transmitidas pelo consumo do peixe produzido nos pesque-pagues.

Diante do exposto nesse trabalho, é evidente que a presença de enterobactérias nos diferentes órgãos dos peixes representa um risco potencial à saúde do consumidor. É certo também que estas bactérias são eliminadas pelo cozimento, porém é importante frisar que a contaminação cruzada e o consumo de peixe cru podem ocorrer, e que constituem fatores importantes na infecção e/ou intoxicação alimentar. Portanto, o monitoramento da qualidade da água é de suma importância, pois além de garantir a produção de peixes seguros e de boa qualidade, garante também a preservação do ecossistema local.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a execução do trabalho foi observado que não há um controle efetivo da qualidade da água de entrada dos viveiros e muito menos de sua saída (efluente). Uma maneira de reduzir os impactos gerados pelos pesque-pagues seria o tratamento dos

efluentes, além de um manejo mais adequado dos viveiros, através da utilização de rações de melhor qualidade e do controle da quantidade fornecida aos peixes.

Além disso, é necessário melhorar o controle da vazão de água entre viveiros a fim de manter adequada a qualidade da água.

Outro fator relevante é a necessidade de implantar cursos de Educação Ambiental para os proprietários bem como para os frequentadores, pois durante o trabalho foi possível observar lixo espalhado no chão mesmo com a presença de lixeiras próximas aos viveiros.

A presença de animais deve ser controlada, para evitar que esses animais se tornem fontes de contaminação de enterobactéria da água e do peixe.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que:

- ✓ Ordenando os níveis de contaminação de coliformes totais e termotolerantes nos diferentes órgãos dos peixes e na água de cultivo temos: água > trato gastrintestinal > pele > músculo;
- ✓ Os peixes produzidos nos pesque-pagues podem ser potencial veículos de transmissão de salmonela;
- ✓ A pele e o trato gastrintestinal dos peixes podem ser fontes de contaminação cruzada para alimentos e equipamentos quando manipulados de forma inadequada, representando em risco potencial à saúde do consumidor.

7. REFERÊNCIAS

AGNESE, A.P.; OLIVEIRA, V.M.; SILVA, P.P.O.; SILVA, P.P.O.; OLIVEIRA, G.A. 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, 2001.

AL-HARBI, A.H. Faecal coliforms in pond water, sediments and hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus* in Saudi Arabia. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 517-524, 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20 ed., Washington, DC: Apha, 1998.

_____. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4^aed. 676 p. 2001.

AMPOFO, J.A.; CLERK, G.C. Diversity of bacteria in sewage treatment plant used as fish culture pond in southern Ghana. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 667-675, 2003.

ANTONIOLLI, M.A. **Perfil microbiológico da carpa comum (*Cyprinus carpio*) in natura e da água dos viveiros procedentes de cultivo integrado com suínos**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1993. 32 p. Relatório de estágio supervisionado para habilitação em tecnologia de alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, 1993.

ARANA, L.V. **Princípios químicos de qualidade de água em aquíicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Florianópolis: Ed. UFSC, 166 p., 1997.

AYULO, A.M.; MACHADO, R.A.; SCUSSEL, V.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 171-178, 1994.

BOYD, C.E.; TANNER, M. Coliform organisms in waters of channel catfish ponds. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 29, p. 74-78, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2001). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em 15 de dez. 2008.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (2005). Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/>>. Acesso em 15 dez. 2008.

BURAS, N.; DUEK, L.; NIV, S. Reactions of Fish to Microorganisms in Wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 989-995, 1985.

BURTON, G.A.; GUNNISON, D.; LANZA, G.R. Survival of pathogenic bacteria in various freshwater sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 633-638, 1987.

CARVALHO, F.C.T. **Influências exógenas na qualidade bacteriológica da água, solo e camarão (*Litopenaeus vannamei*), em quatro fazendas de camarão do estado do Ceará.** 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará – Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza, CE, 2006.

CASTAGNOLLI, N. Status of Aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, v.26, n.4, p.35-39, 1995.

CASTRO, M.M.V.; IARIA, S.T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico no vestíbulo 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.

CONNOR B.A.; SCHWARTZ E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 10, p.623-628, 2005.

COSTA, R.A.; VIEIRA, G.H.F.; SILVA, G.C.; PEIXOTO, J.R.O.; BRITO, M.V. Bactérias de interesse sanitário em *sushi* comercializado em Sobral – Ceará. **Boletim Técnico-Científico do CEPENE**, v. 15, n. 1, p. 15-19, 2007.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, 2002.

CUNHA, M.R.L.S.; PERESI, P.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO Jr., J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 70-74, 2006.

D'AOUST, J. Y. Methods for the detection of foodborne *Salmonella* spp: a review. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.26, Suppl. 2, p.195-208, 1995.

EASA, M.E.S.; SHEREIF, M.M.; SHAABAN, A.I.; MANCY, K.H. Public health implications of waste water reuse for fish production. **Water Science Technology**, v. 22, n. 11, p. 145-152, 1996.

EKPERIGIN, H.E.; NAGAJARA, K.V. Microbial foodborne pathogens. Salmonella. **Veterinary Clinical North American Food Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 17-29, 1998.

EL-SHAFI, S.A.; GIJZEN, H.J.; NASR, F.A.; EL-GOHARY, F.A. Microbial quality of tilapia reared in fecal-contaminated ponds. **Environmental Research**, v. 95, p. 231-238, 2004.

ELER, M.N.; ESPÍNDOLA, E.L.; ESPÍNDOLA, E.A.; BRIGANTE, J.; NOGUEIRA, M. M.; MENEZES, A.; MILANIN, T.J. Avaliação da qualidade da água e sedimento do pesque-pague: Análises físicas, químicas biológicas e bioensaios de toxicidade. In: ELER, M.N.; ESPÍNDOLA, E.A. **Avaliação dos impactos de pesque-pague: Uma análise da atividade na bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima. 2006, p. 101-144.

ESCHER, M.; WAHLI, T.; BUTTNER, S.; MEICR, W.; BURKHARDT-HOLM, P. The effect of sewage plant effluent on brown trout (*Salmo trutta* *Fabrio*): a cage experiment. **Aquatic Sciences**, v. 61, p. 93–110, 1999.

ESPOSTO, E.M.; SILVA, W.C.P.; REIS, C.M.F.; REIS, E.M.F.; RIBEIRO, R.V.; RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S. Enteropatógenos bacterianos em peixes criados em uma estação de reciclagem de nutrientes e no ecossistema relacionado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 144-148, 2007.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 200 p. São Paulo: Atheneu; 2002.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Food Microbiology**. Ed. New York: Mc Graw - Hill, 1988, 681 p.

GATTI JUNIOR, P. **Qualidade microbiológica e físico-química da água em pesque-pagues durante a estação seca**. 2008. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso – UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

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

HENDRICKS, C. W. Increased recovery rate of salmonellae from stream bottom sediments versus surface waters. **Applied Microbiology**, v. 21, p. 379–380, 1971.

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

HUANG, S.L.; CHEN, W.C.; SHEI, M.C.; LIAO, I.C.; CHEN, S.N. Studies on Epizootiology and Pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* in Tilapia (*Oreochromis spp.*) cultured in Taiwan. **Zoological Studies**, v. 38, n. 2, p. 178-188, 1999.

KAKU, M.; PERESI, J.T.M.; TAVECHIO, A.T.; FERNADES, S.A.; BATISTA, A.B; CASTANHEIRA, I.A.Z.; GARCIA, G.M.P.; IRINO, K.; GELLI, D. S. Surto alimentar por *Salmonella enteritidis* no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, 1995.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WIN, J.R.W.C. **Diagnóstico microbiológico**. 5ª ed. Brasil: Editora MEDSI, 2001.

LaLIBERTE, P.; GRIMES, D.J. Survival of *Escherichia coli* in lake bottom sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 623–628, 1982.

LANCELLOTTI, M. **Estudo epidemiológico de *Staphylococcus spp* em ambientes, água e portadores sadios e determinação da sensibilidade a antimicrobianos**. 2006. 126f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2006.

LANCETTE, G.A.; TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: APHA, 1992. cap. 33. p. 533-550.

LANDGRAF, M.; GONÇALVES, J.A.; FALCÃO, D.P. Surto de toxi-infecção alimentar por *Salmonella bredeney*. **Revista de Saúde Pública**, v. 19, p. 92-93, 1985.

LINDER, C. E. ***Salmonella spp*. em sistema intensivo de criação de peixes tropicais de água doce**. 2002. 61f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – UNESP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 2002.

LIRA, G.M; PEREIRA, W.D; ATHAYDE, A.H.; PINTO, K.P. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 84, p. 67-74, 2001.

LIUSON, E. **Pesquisa de coliformes totais, fecais e *Salmonella spp* em tilápias de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo**. 2003. 94f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP, 2003.

Mac FADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1976. 312p.

MARTIN, R.E.; GRAY, R.J.H.; PIERSON, M.O. Quality assessment of fresh fish and the role of the naturally occurring microflora. **Food Technology**, v. 32, p. 188-198, 1978.

MARTINS, C.V.B.; VAZ, S.K.; MINOZZO, M.G. Aspectos sanitários de pescados comercializados em “pesque-pagues” de Toledo (PR). **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 98, p. 51-56, 2002.

MARTINS, F.O. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (*sushi* e *sashimi*) a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo**. 2006. 142f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – USP – Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, SP, 2006.

MERCANTE, C.T.J.; COSTA, S.V.; SILVA, D.; CABIANCA, M.A.; ESTEVES, K.E. Qualidade da água em pesque-pague da região metropolitana de São Paulo (Brasil): avaliação através de fatores abióticos (período seco e chuvoso). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2005.

MOLLERKE, R.O.; WIEST, J.M.; CARVALHO, H.H.C. Colimetrias como indicadores de qualidade de pescado artesanal do lago Guaíba, em Porto Alegre, RS. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 99, p. 102-106, 2002.

MOORE, B.C.; MARTINEZ, E.; GAY, J.M.; RICE, D.H. Survival of *Salmonella enterica* in freshwater and sediments and transmission by the aquatic midge *Chironomus tentans* (Chironomidae: Diptera). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4556-4560, 2003.

MORINIGO, M.A.; BORREGO, J. J.; ROMERO, P. Comparative study of different methods for detection and enumeration of *Salmonella* spp. in natural waters. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 61, p. 169–176, 1986.

MORITA, M. **Avaliação da qualidade sanitária e ocorrência de *Aeromonas* spp. em lagoas de pesque-pague da Região Metropolitana de São Paulo**. 2005. 119f. Tese (Mestrado) – USP – Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2005.

MORITA, M.; MATTÉ, G. R.; DROPA, M.; MARQUES-AZEVEDO, V.; MATTÉ, M. H. Utilização de indicadores bacterianos e a pesquisa de *Salmonella* spp na avaliação da qualidade sanitária de águas de pesqueiros. In: ESTEVES, K. E; SANT'ANNA, C. L. **Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo**. 1 ed. São Carlos: RiMa, 2006, p. 91-104.

MOTA, C. C. S.; VIEIRA, H. R. A.; PUZYNA, I. P.; KALACHE, J.; KONOLSAISEN, J. F.; CAMARGO, N. J. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella enteritidis*. Relato de um surto ocorrido em Curitiba-PR, Brasil/julho de 1981, **Higiene Alimentar**, v. 2, p. 123-31, 1983.

MURATORI, M.C.S; COSTA, A.P.R.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, P.C.; PODESTÁ Jr., R.L. Qualidade sanitária de pescado “in natura”. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 116/117, p. 50-54, 2004.

NASCIMENTO, A.R.; MOUCHREK FILHO, J.E.; CARVALHO, P.A.B.; COSTA, A.C.; CAVALCANTE, P.R.S.; VIEIRA, R.H.S.F. 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, 2001.

NEMETZ, T. G.; SHOTTS, E. B. Zoonotic diseases. In: STOSKOPF, M. K. (Ed.) **Fish Medicine**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. p. 214-220.

NTENGWE, F.W; EDEMA, M.O. Physico-chemical and microbiological characteristics of water for fish production using small ponds. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 33, p. 701-707, 2008.

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. Microbiological evaluation of an untreated domestic wastewater aquaculture system. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 7, p. 27-34, 1992.

PÁDUA, H. B.; **Informações sobre os Coliformes totais/ fecais e alguns outros organismos indicadores, em sistemas aquáticos**. 20p. 2003. Disponível em: <www.pescar.com.br/helcias>. Acesso em 15 dez. 2008.

PAL, D.; DASGUPTA, C. Microbial pollution in water and its effect on fish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 4, p. 32-39, 1992.

PASSOS, M.H.C.R.; KUAYE, A.Y. Relato de surtos de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus* importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 71-76, 1996.

PEREIRA, K.S.; PEREIRA, J.L. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 19, n.129, p. 32-34, 2005.

PILARSKI, F.; TOMAZELLI JÚNIOR, O.; CASACA, J.M.; GARCIA, F.R.M.; TOMAZELLI, I.B.; SANTOS, I. R. Consórcio suíno-peixe: aspectos ambientais e qualidade do pescado. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 33, n. 2, 2004.

PIMENTEL, L.P.S.; PANETTA, J.C. Condições higiênicas do gelo utilizado na conservação de pescado comercializado em supermercados da grande São Paulo. Parte 1, resultados microbiológicos. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 106, p. 56-63, 2003.

RALL, V.L.M.; CARDOSO, K.F.G.; XAVIER, C. Enumeração de coliformes termotolerantes em pescados frescos e congelados. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v. 2, n. 39, p. 1-8, 2008.

SANTANA, E.H.W; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; MORAES, L.B.; TAMANINI, R.; SILVA, W.P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 639-646, 2006.

SAS INSTITUTE SAS/STAT. **Procedures guide for personal computers**. Version 5 ed. SAS Inst., Cary, NC. 1991

SCHALCH, S.H.C. 2002 **Apreciação da fauna ictioparasitária em pesqueiro tipo pesque-pague do Município de Guariba – SP durante o período de abril de 1997 a março de 1999**. Jaboticabal. 102p. (Dissertação de Mestrado. Centro de Aqüicultura da UNESP).

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, p. 7- 20, 1997.

SILVA, E.M.; DUARTE A. *Salmonella enteritidis* em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

”
SOUZA, M. L. R. Comparação de seis métodos de filetagem, em relação ao rendimento de file e de subprodutos do processamento da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p.1076-1084, 2002.

STRAUSS, M. Health Aspects of Nightsoil and Sludge in Agriculture and Aquaculture. Part II. Pathogen Survival. **International Reference Center of Waste Disposal (IRCWD)**, n. 4/85, Duebendorf, Suíça, 87p., 1985.

TAVARES, F.A.; LAPOLLI, F.R.; BATISTA, C.R.V.; MAIA, I.S.; JUNGLES, M.K. Reuso de efluentes domésticos na produção de tilápias – aspectos sanitários. In: **XXXI Congresso Interamericano AIDIS**, Santiago, Chile, 2008. Anais do XXI Congresso Interamericano, p. 1-6, 2008.

VENTURIERI, R. **Pesque-pague no Estado de São Paulo: eco-associação para estudos do ambiente**, Ipsis Gráfica e Editora, 1 ed. 200p, 2002.

VIEIRA, K.V.M; MAIA, D.C.C.; JANEIRO, D.I.; VIEIRA, R.H.S.F.; CEBALLOS, B.S.O. Influência das condições higiênico-sanitárias no processo de beneficiamento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em filé congelados. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 74, p. 37-40, 2000.

VIEIRA, R.H.S.F.; RODRIGUES, D.P.; GOCALVES, F.A.; MENEZES, F.G.R.; ARAGAO, J.S.; SOUSA, O.V. 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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 145–148, 2001.

YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, V.M.D.; FEDORKO, D.P.; FOLEY, S.L. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. **Clinical Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 189-204, 2003.

YOUSSEF, H.; EL-TIMAWI, A. K. AHMED. Role of pathogens of freshwater fish in transmission of humans diseases. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 9, p. 739-740, 1992.

WARD, D. R. Microbiology of Aquaculture Products. **Food Technology** , v. 43, n. 11, p. 82-85, 1989.