

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Avaliação microbiológica do camarão da  
amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) e  
sua relação com ambiente de criação na  
carcinicultura**

**Suzana Naomi Honda**

**Bióloga**

Jaboticabal, SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Avaliação microbiológica do camarão da  
amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) e  
sua relação com ambiente de criação na  
carcinicultura**

**Suzana Naomi Honda**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, SP  
2012

H771a Honda, Suzana Naomi  
Avaliação microbiológica do camarão da amazônia  
(*Macrobrachium amazonicum*) e sua relação com o ambiente de  
criação na carcinicultura / Suzana Naomi Honda. -- Jaboticabal,  
2012  
xiii, 66 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista – Centro  
de Aquicultura, 2012  
Orientador: Luiz Augusto do Amaral  
Banca examinadora: Ana Maria Centola Vidal Martins,  
Karina Paes Bürger

Bibliografia

1. Carcinicultura. 2. Coliformes totais. 3. Coliformes  
termotolerantes. 4. *Staphylococcus coagulase positiva*. 5. *Salmonella*  
spp. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.512



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** Avaliação microbiológica do camarão da amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) e sua relação com ambiente de criação na carcinicultura

**AUTORA:** SUZANA NAOMI HONDA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL MARTINS

Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Zootecnia e Eng. de Alimentos, USP

Data da realização: 27 de julho de 2012.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Pedro e Lucia por todo amor, dedicação e apoio e aos meus irmãos Fabio, Renata e Yudi, companheiros pra toda minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral pela oportunidade de desenvolver este trabalho junto a ele, confiança, ensinamentos e palavras de incentivo.

Aos membros da banca de qualificação e defesa Prof. Dr. Raul José Silva Girio, Profa. Dra. Karina Paes Bürger e Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal Martins pelas valiosas sugestões, em especial à Karina, pela contribuição essencial no aprimoramento da dissertação.

Ao Prof. Dr. João Ademir de Oliveira pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Msc. Andressa de Souza pelas análises de PCR.

Ao Prof. Dr. Wagner Cotroni Valente por disponibilizar o viveiro do Setor de Carcinicultura para colheita das amostras e ao técnico do Setor de Carcinicultura José Roberto Polachini pelo auxílio nas colheitas.

Aos companheiros de laboratório Liliana Barbosa, Bruno Emerson e Thaíza Costa e aos técnicos do laboratório Liliana Biondi Naka e Waldemar Dibelli Junior, pelo auxílio imprescindível na realização deste trabalho.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp-CAUNESP por permitir a realização dessa Pós Graduação.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa e financiamento do trabalho.

Aos amigos que sempre torceram por mim e estiveram presentes nos bons e maus momentos.

Ao Carlos, por todo amor, companheirismo, carinho e apoio.

## SUMÁRIO

Assunto	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO.....	02
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 LOCAL, COLHEITA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS.....	16
4.2 PREPARO E DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS.....	19
4.2.1. Água.....	19
4.2.2 Sedimento.....	19
4.2.3 Camarão.....	20
a) Água de enxaguadura da superfície externa.....	20
b) Trato gastrointestinal.....	20
c) Tecido muscular.....	21
4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	22
4.3.1 Determinação do número mais provável (NMP) coliformes totais e termotolerantes na água, sedimento e camarão.....	22
4.3.2. Isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i> .....	23
4.3.3 Extração de DNA e PCR multiplex.....	24
4.3.4 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	26
4.3.5 Pesquisa da presença de bactérias do gênero <i>Salmonella</i>	27
a) Pré-enriquecimento.....	27
b) Enriquecimento seletivo.....	27
c) Plaquetamento seletivo.....	27

d) Identificação presuntiva.....	28
e) Confirmação sorológica do gênero <i>Salmonella</i> .....	28
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS.....	50

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1 -	Primers específicos utilizados na diferenciação dos subgrupos de <i>E.coli</i> .....	25
2 -	População de coliformes totais das amostras de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão por amostragem.....	30
3 -	População de coliformes termotolerantes das amostras de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão por amostragem.....	32
4 -	Populações de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva encontrados em cada amostra de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão por amostragem.....	36
5 -	Valores médios das populações de coliformes totais (CT), termotolerantes (CTer) e de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva por amostra de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão.....	40



- 6 - Médias dos números mais prováveis de coliformes totais (CT), termotolerantes (CTer) e população de *Staphylococcus* coagulase positiva (EST) das amostras de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão no período de seca e chuva..... 42
- 7 - Correlação do NMP de coliformes totais entre as amostras de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal do camarão..... 44
- 8 - Correlação do NMP de coliformes termotolerantes entre as amostras de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão..... 46

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1 -	Água (A) e sedimento (B) colhidos no viveiro de camarões localizado no Setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal-SP.....	16
2 -	Camarão ( <i>Machrobrachium amazonicum</i> ) colhido no viveiro de reprodutores localizado no Setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal-SP.....	17
3 -	Viveiro de reprodutores localizado no Setor de Carcinicultura localizado no Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal-SP.....	18
4 -	Amostras da água de enxaguadura da superfície externa do camarão (A), trato gastrointestinal (B) e músculo (C) do camarão.....	21
5 -	Produtos de PCR com os primers <i>stx1</i> , <i>eae</i> , <i>stx2</i> (388, 570, 807 pb) utilizando-se a cepa edl933, primers <i>estA</i> , <i>eltB</i> e <i>etsB</i> (163, 275, 368 pb) utilizando-se a cepa EcL7805 e dos primers <i>aafII</i> e <i>aggR</i> (378 e 457 pb), cepa O42. As amostras 1 e 2 não apresentaram amplificação assim como as demais. PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Fermentas). CN: controle negativo de cada reação (mix sem DNA).....	35

6 -	Números e porcentagens de amostras de água e sedimento do viveiro, água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) de camarão contaminados por coliformes totais, coliformes termotolerantes e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	39
-----	--	----

## RESUMO

A carcinicultura é uma atividade que vem se expandindo, assim como o consumo do camarão, considerado um alimento saudável por sua qualidade nutricional. Nesse contexto é importante garantir a oferta de um produto de qualidade microbiológica, que atenda às exigências do mercado alimentício e não ofereça riscos à saúde do consumidor. Assim, objetivou-se verificar a relação entre a contaminação do camarão *Macrobrachium amazonicum* e o ambiente de criação, além de comparar os resultados obtidos com a legislação vigente. Para tanto, foi verificada a qualidade microbiológica do camarão, sedimento e água do viveiro onde estes foram cultivados, enumerando coliformes totais e termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva, e verificando a presença de *Escherichia coli* patogênica e *Salmonella* spp. Os resultados evidenciaram que as amostras de água encontraram-se em conformidade com os limites estabelecidos pela legislação, enquanto que para camarão uma amostra estava fora do limite exigido para *Staphylococcus* coagulase positiva e para *Salmonella* spp. as demais apresentavam-se de acordo com a legislação. As amostras de camarão apresentaram correlação com a água e sedimento do viveiro, demonstrando que a contaminação microbiológica do viveiro reflete na qualidade do camarão. O monitoramento da qualidade da água e a adoção do manejo correto na carcinicultura assumem grande importância para garantir a produção de camarões de boa qualidade, atendendo às exigências do mercado para comercialização e a segurança na saúde do consumidor.

**Palavras-chave:** carcinicultura, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp.

## ABSTRACT

Shrimp farming is an activity that is expanding, as well as the consumption of shrimp, considered a healthy food due to your nutritional quality. In this context, it is important to ensure the supply of a product of microbiological quality, which meets the requirements of the food market and does not offer risks to consumer health. Thus, this study aim to verify the relationship between contamination of shrimp *Macrobrachium amazonicum* and culture environment and to compare the results obtained with the Brazilian legislation for water and shrimp. Thereunto, we investigated the microbiological quality of the shrimp, sediment and water of the pond where they were grown, enumerating total and thermotolerant coliforms and *Staphylococcus* coagulase positive, and investigating the presence of pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella*. The water samples were obeying the limits established by legislation, while a sample of shrimp was out of range required for *Staphylococcus* coagulase positive and for *Salmonella* all samples were in accordance with the law. Samples of shrimp were correlated with the water and sediment of the pond, showing that the microbiological contamination of the pond reflects the quality of shrimp. The monitoring of water quality and the adoption of the correct management in shrimp farming are very important to ensure that shrimp production of good quality, acording the market requirements and consumer health safety.

**Key words:** shrimp farming, total coliforms, thermotolerant coliforms, *Staphylococcus* coagulase positive, *Salmonella* spp.

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é o sistema de produção de alimentos que mais cresce no mundo. Entre os organismos cultivados, a criação do camarão de água doce destaca-se na contribuição da expansão da aquicultura mundial tanto em termos de volume de produção quanto econômico. Assim como a produção, o consumo de camarões, que tem excelente valor nutritivo, tem crescido devido à procura de uma alimentação saudável por parte do consumidor. O camarão, no entanto, é extremamente perecível, sendo susceptível à autólise e à deterioração microbiana. A rápida deterioração causa perda de qualidade, que se mostra com alterações na aparência e odor do camarão, o que diminui a vida de prateleira, causando perdas econômicas para produtores e comerciantes. Além disso, o camarão pode ser veiculador de diversos microrganismos patogênicos para o ser humano, devido ao ambiente onde o organismo aquático foi criado.

Os corpos d'água estão cada vez mais expostos ao impacto da poluição causado pelas atividades humanas e podem ser fonte de patógenos entéricos. Esses microrganismos encontrados na água passam a estar presentes principalmente na superfície externa e no intestino do camarão que podem, posteriormente, contaminar o músculo do camarão. E nas etapas seguintes à captura, como transporte, armazenamento e beneficiamento podem ocorrer práticas inadequadas de conservação e manipulação que favorecem a contaminação e a multiplicação de bactérias presentes no camarão.

Esse crescimento no consumo do camarão e os riscos de contaminação ao qual está exposto chamam a atenção para discussão do controle microbiológico na produção e comercialização desse produto. Assim, conhecer o modo como o ambiente de criação influencia a contaminação desse produto pode ajudar a tomar medidas que previnam a contaminação microbiológica do mesmo durante seu cultivo, garantindo, assim, uma produção que atenda às exigências do mercado consumidor e consumo.

## 2. REVISÃO

A aquicultura é avaliada como um dos sistemas de produção de alimentos que mais cresce no mundo e que poderá colaborar para suprir a demanda mundial de pescado (SOUZA, 2002). Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2010), a oferta per capita da aquicultura despontou de 0,7 kg em 1970 para 7,8 kg em 2008, o que representa uma taxa média de crescimento anual de 6,6 %. Os mesmos dados mostram que a contribuição da aquicultura para o total de produção da pesca continua a crescer, passando de 34,5 % em 2006 para 39,9 % em 2008, enquanto a captura de peixes se mantém relativamente estável nestes mesmos anos. Entre os organismos cultivados, a criação de camarões de água doce é destaque pela grande contribuição na expansão da aquicultura mundial em termos de volume de produção e econômico (NEW, 2010). A produção mundial de camarões de água doce em 2008 atingiu a marca de 413 mil toneladas, um crescimento de quase 90% se comparado a 2000, onde a produção foi avaliada em 218 mil toneladas. Em termos financeiros, no ano de 2008, a carcinicultura de água doce movimentou ao redor de dois bilhões de dólares (FAO, 2011).

As espécies mais cultivadas mundialmente são o *Macrobrachium nipponense*, produzido principalmente na China, e o *Macrobrachium rosenbergii*, cultivado em vários países, principalmente asiáticos (FAO, 2010a). No Brasil, a carcinicultura de água doce tem como espécie mais cultivada o *Macrobrachium rosenbergii* (MORAES-RIODADES; VALENTI, 2004). Esta espécie procede das regiões tropicais e subtropicais do Indo-Pacífico. Foi introduzida no Brasil no final da década de 70 e demonstrou excelente capacidade de adaptação às condições ambientais (NEW, 2000). Entretanto a introdução de espécies exóticas no meio ambiente tem sido responsável por vários problemas, por exemplo, com a competição e/ou predação em relação às espécies nativas, alterações de habitats e disseminação de patógenos (BRIDGER; GARBER, 2002).

O cultivo de espécies nativas do Brasil é apontado como uma saída para evitar tais problemas. Entre essas espécies destaca-se o *Macrobrachium amazonicum* que possui uma ampla distribuição na América do Sul (MACIEL; VALENTI, 2009), o que elimina os riscos gerados pelo escape acidental dos viveiros de cultivo. Segundo Moraes-Valenti e Valenti (2010) estudos mostram que é uma espécie rústica, resistente a doenças, além de suportar intensificação e apresentar uma alta taxa de sobrevivência ao final do cultivo, demonstrando o grande potencial para abastecer o mercado da aquicultura.

O consumo de pescados tem crescido devido à procura de qualidade de vida por parte da população, o que inclui controle de peso e uma alimentação mais saudável. Os crustáceos são fonte de proteína e lipídeos de qualidade para alimentação humana, apresentando proteínas de alta digestibilidade, baixo conteúdo lipídico, alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, podendo ser incluídos em dietas de restrição a lipídeos e colesterol (ROSA; NUNEZ, 2003).

Mesmo diante das vantagens nutricionais do consumo do camarão, há diversos riscos associados à saúde do consumidor, já que o camarão é um produto altamente perecível devido ao seu conteúdo em proteínas, compostos nitrogenados não protéicos, aminoácidos livres e elevada atividade de água (BRAGA et al., 2000) e pode ser indicado por sinais como odores e sabores desagradáveis, formação de muco, produção de gás, coloração anormal e alterações na textura (FAO, 2008). As enzimas proteolíticas presentes no suco gástrico e nos tecidos promovem a decomposição, acarretando na disseminação de microrganismos endógenos (BRANDÃO, 2007).

As bactérias encontradas em organismos produzidos na aquicultura podem ser divididas em dois grupos: as bactérias naturalmente presentes no ambiente aquático e aqueles que ocorrem como resultado da contaminação de fezes humana ou animal no ambiente aquático. As bactérias presentes naturalmente na água, quando presentes no pescado, são encontradas em níveis baixos e se forem cozidos de maneira adequada apresentam riscos alimentares insignificantes (REILLY; KAFERSTEIN, 1999). Por outro lado, bactérias encontradas no pescado como consequência da contaminação aquática pontual causada pelo lançamento de efluentes ricos em matéria orgânica (esgoto doméstico e agrícola) podem tornar o camarão um agente veiculador de um



número enorme bactérias patogênicas para o ser humano (GERMANO; GERMANO, 2003). A contaminação da água também pode ocorrer por fontes não pontuais, quando os poluentes chegam aos corpos d' água de modo aleatório, dificultando estabelecer qualquer padrão de lançamento, seja em termos de quantidade, frequência ou composição, dificultando também o seu controle em comparação com a poluição pontual (NOVOTNY; OLEM, 1994). A deposição diária de resíduo orgânico animal no solo aumenta o risco da contaminação das águas, pois nos períodos chuvosos ocorre o transporte deste material para os rios e outros corpos d' água (CONBOY; GOSS, 2000). Segundo Geldreich (1998) a água de escoamento superficial, durante o período de chuva, é o fator que mais contribui para a mudança da qualidade microbiológica da água.

Além do uso de água de má qualidade, o manejo incorreto na criação de organismos aquáticos (ração inadequada, falta de cuidados higiênicos com os pescados, tanques, viveiros e equipamentos) tem favorecido o aparecimento de bactérias patogênicas, o que acarreta em perdas na produtividade (ALEXANDRINO, 1998).

Após a captura do camarão, outras fontes de contaminação favorecem a perda da sua qualidade como condições inadequadas de manipulação, armazenamento, transporte e comercialização. No Brasil a situação é bem simbolizada pelas práticas tradicionais onde o pescado fresco passa por vários intermediários, antes de chegar ao consumidor final, e isso tem grande contribuição para a perda da qualidade e a deterioração do produto comercializado em feiras livres, mercados, peixarias e supermercados do país (SANTOS, 2006).

A ingestão de alimentos contaminados por diversos grupos de microrganismos (bactérias, bolores, protozoários e vírus) causam as doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo as bactérias o grupo de microrganismos mais estudado e o mais associado às DTA's devido a sua diversidade e patogenicidade (PINTO, 2005).

O consumo de alimentos contaminados faz parte de um dos problemas de saúde pública mais comum do mundo contemporâneo (NOTERMANS; HOOGENBOOM-VERDEGAAL 1992; AMSON et al., 2006). Os sintomas geralmente incluem dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e febre. Entretanto,

dependendo do agente etiológico, pode haver um quadro clínico mais sério, com desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória (FORSYTHE, 2002).

A quantificação de casos e custos de DTA's apresenta dificuldade, pois são frequentes os casos de subnotificação ou da não notificação de casos, exceto em surtos extensos e/ou graves. No Brasil, é grande o número de subnotificações dos casos e apenas 5 a 10% dos casos são registrados pelas autoridades sanitárias (RANTHUM, 2002).

Mesmo assim, estudos realizados por Giova (1997) demonstram que é grande o valor das perdas econômicas decorrentes de alimentos deteriorados por ação de agentes microbianos. O impacto econômico negativo acarreta grandes perdas para as indústrias, o turismo e a sociedade (NASCIMENTO, 2000). No Brasil, os custos com as internações causadas por DTA, de 1999 a 2004, foram de 280 milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano (CARMO et al., 2005). Nos Estados Unidos da América, os custos médicos e a perda de produtividade gerados pelas DTA's são estimados em mais de 35 bilhões de dólares por ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007).

O importante papel que o camarão desempenha na transmissão de doenças de transmitidas por alimentos mostra a relevância que há para saúde pública no controle da qualidade microbiológica desse alimento para prevenir a ocorrência destas doenças. A detecção de indicadores de contaminação ambiental e fecal, através da enumeração de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva e do gênero *Salmonella* spp., são essenciais para determinação da qualidade do produto (LIMA; REIS, 2002).

## Coliformes totais e termotolerantes

As bactérias do grupo coliformes são consideradas microrganismos indicadores (GEUS; LIMA, 2008). A expressão “microrganismo indicador” é usada para definir qualquer microrganismo ou grupo de microrganismos que apontam que o alimento foi exposto a condições favoráveis a um aumento no risco de contaminação por patógenos ou mantido sob condições que favorecem a multiplicação dos mesmos (JAY, 2005). Sua presença, portanto, indica uma característica particular do histórico da amostra podendo ser indicador de condições higiênicas e sanitárias inadequadas de produção e manipulação de alimentos (MACEDO, 2007).

Os coliformes totais são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37°C, por 48 horas. As bactérias do gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* integram esse grupo, porém apenas a *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal de humanos e animais. Os demais gêneros, além de estarem presentes nas fezes, também podem ser encontrados em outros ambientes como vegetais e solos. Portanto, a presença de coliformes totais no alimento não é um bom indicador de contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008), entretanto a presença deste grupo de microrganismos em alimentos está relacionada à sua qualidade higiênica (SIQUEIRA, 1995).

Coliformes termotolerantes são capazes de fermentar a lactose com produção de gás quando incubadas por 24-48 horas a 44,5-45,5° C. Sua pesquisa nos alimentos fornece com maior segurança informações a respeito das condições higiênicas e sanitárias do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos, porém, quando a análise realizada busca a determinação de coliformes de origem gastrointestinal, sabe-se que cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella*, incluídas nesse grupo, podem apresentar origem não fecal, como solo e vegetais (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Oliveira et al. (2011) pesquisaram camarões congelados adquiridos em supermercados de Aracaju - SE e encontraram valores de coliformes totais  $>1,1 \times 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup> e coliformes termotolerantes entre 9,4 e  $>1,1 \times 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup>. Enquanto que Farias (2006), analisando pescados beneficiados de uma indústria paraense não encontrou coliformes termotolerantes em camarões sem cefalotórax congelados. Camarões secos, salgados e defumados comercializados na Bahia analisados por Trevisan et al. (2011) apresentaram coliformes totais variando entre  $<0,3 \times 10$  NMP. g<sup>-1</sup> a  $4,6 \times 10^2$  NMP. g<sup>-1</sup> e coliformes termotolerantes variando de  $<0,3$  a  $4,3 \times 10$  NMP.g<sup>-1</sup>.

### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é considerada a bactéria indicadora mais específica de contaminação fecal recente e da eventual presença de organismos patogênicos, pois sua presença está restrita apenas ao trato intestinal do ser humano e de outros animais homeotérmicos (LEITÃO, 1988). É um comensal do intestino eliminando bactérias nocivas e participa da síntese de numerosas vitaminas. Representa 80% da microbiota intestinal aeróbia, sendo eliminada nas fezes, o que acarreta na contaminação do solo e das águas (GERMANO ; GERMANO, 2003).

Embora a maioria das linhagens de *E. coli* sejam comensais, algumas podem causar uma variedade de doenças, incluindo diarreia, disenteria, síndrome hemolítica-urêmica, infecções de bexiga e rim, septicemia, pneumonia e meningite (KAPER et al., 2004). Essa diversidade tem sido associada ao fato de diferentes linhagens de *E. coli* terem adquirido diferentes genes de virulência (GILLIGAN, 1999). Estima-se que 10-20% da informação genética encontrada em uma *E. coli* patogênica não está presente na linhagem K-12, não patogênica (KUHNERT et al., 2000).

As linhagens diarreio gênicas de *E. coli* são classificadas em seis categorias de acordo com a categoria de patogenicidade: enteropatogênica clássica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasoras (EIEC) e enterohemorrágica ou produtora de toxina shiga (EHEC), enteroagregativa (EAEC) e difusamente aderente (DAEC) (KAPER et al., 2004).

A *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) é a maior causadora de surtos de diarreia infantil em países subdesenvolvidos (DEAN et al., 2005). A diarreia provocada por esse grupo é clinicamente mais grave do que aquela provocada por outros patógenos, causando dores abdominais, vômito e febre, com duração de seis a três dias, cuja incubação varia entre 17 a 72 horas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A linhagem enterotoxigênica (ETEC) são causadores de diarreia em países subdesenvolvidos onde as condições de saneamento são precárias. O grupo ETEC também é considerado um dos principais agentes etiológicos da chamada “diarreia dos viajantes”, incidindo em indivíduos que se deslocam de áreas desenvolvidas para regiões com problemas de saneamento básico, atingindo pessoas de todas as faixas etárias (MENG et al., 2001).

A *E. coli* enteroinvasora (EIEC) ocorre com maior frequência em adultos e alguns estudos apontam surtos relacionados à ingestão dos alimentos e/ou água contaminados. Entretanto, a via de transmissão mais comum é o contato interpessoal (MENG et al., 2001). Os sintomas provocados por essa bactéria são: diarreia profusa, cólicas abdominais, febre, dor de cabeça e dores musculares (VIEIRA, 2004).

No grupo da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) o sorogrupo mais comum e conhecido é denominado O157. O consumo de alimentos de origem bovina contaminados é o principal responsável por surtos alimentares, já que são os bovinos os principais reservatórios dessa bactéria (MANNING et al., 2008). Entretanto, infecções esporádicas e surtos de diarreias em seres humanos já foram registrados, tendo como fonte alface, brotos de rabanetes, espinafre, maçã, sidra, consumo ou uso recreativo de água, o contato direto com bovinos ou excretas de animais e uso recreativo de pastagens (RANGEL et al., 2005).

A *E. coli* enteroagregativa (EAEC) é uma linhagem com poucos dados disponíveis devido a sua recente descrição e sua ocorrência em alimentos ou em casos de surtos de origem alimentar ainda não foram relatados (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A *E. coli* difusamente aderente (DAEC) está associada à diarreia infantil e os dados disponíveis à sua patogenicidade são raros e nenhum surto associado a alimento foi noticiado (MENG et al., 2001).

Para caracterização das cepas de *E. coli* pode ser usada a sorotipificação do isolado. Esse agente é classificado sorologicamente por sorogrupos e sorotipos baseado na sua composição antigênica; antígenos somáticos (O) para os sorogrupos e antígenos flagelares (H) para os sorotipos. Pode, ainda, expressar antígenos capsulares (K) e fimbriais (F), que são importantes na patogênese (NATARO; KAPER, 1998). Porém essa técnica pode ser limitada, pois somente algumas cepas de *E. coli* possuem anti-soros disponíveis para sorotipificação. Outra técnica utilizada para caracterização da patogenicidade de *E. coli* é a PCR (Polymerase Chain Reaction) pela detecção dos diferentes fatores de virulência e caracterização dos patótipos (BRITO et al., 1999; BEIER et al., 2005). Esta metodologia apresenta como vantagens a rapidez na obtenção dos resultados, alta sensibilidade e especificidade. No entanto, é uma técnica que necessita de padronização, sendo muitas vezes considerada onerosa (STROHL et al., 2004).

Embora exista um grande volume de informação sobre o isolamento de *E. coli* patogênicas em seres humanos e em animais, sua ocorrência no meio ambiente é pouco estudada. Entretanto, a importância da água e alimentos contaminados na veiculação desses patógenos tem sido registrada por vários autores (SHERE et al., 1998). As cepas ETEC, EIEC e EPEC, quando isoladas de alimentos, são oriundas da contaminação fecal veiculada diretamente das mãos dos manipuladores de alimento ou da água (DESMARCHELIER; GRAU, 1997). A água contaminada com despejos de esgoto é uma das mais importantes vias de transmissão do agente na natureza (GERMANO; GERMANO, 2003). Reis et al. (2004) detectaram a presença de *E.coli* em amostras de camarão *Machrobrachium amazonicum* e *Macrobrachium jelskii* integral e descabeçado, colhidos em Penápolis - SP e Mendonça - SP.

## Estafilococos

Os estafilococos são habitantes usuais da pele, membranas mucosas, trato respiratório superior e do intestino do homem e animais. A partir destes, essa bactérias pode chegar até o ar, poeira, esgoto, água, leite, alimentos, superfícies expostas ao ambiente (FORSYTHE, 2002).

O gênero é dividido em dois grupos de acordo com sua capacidade de produzir uma enzima denominada coagulase. O primeiro grupo apresenta capacidade de coagular tanto o plasma de sangue humano, bem com o plasma de outras espécies animais, em graus variados, mesmo na presença de anticoagulantes, tratando-se de *Staphylococcus* coagulase positiva; esta propriedade é um importante marcador de patogenicidade. No segundo grupo, estão os *Staphylococcus* coagulase negativa, que não coagulam o plasma. Trata-se de uma espécie comensal da pele e responsável por infecções hospitalares (VIEIRA, 2004).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das intoxicações alimentares mais frequentes e ocorre devido à ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento contaminado pela bactéria. A formação das enterotoxinas advém do alimento contaminado sem refrigeração adequada, o que favorece a multiplicação microbiana com produção de toxinas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A enterotoxina estafilocócica é termoestável, podendo estar presente no alimento mesmo após o cozimento e apenas uma pequena quantidade da enterotoxina pode causar um caso de intoxicação (CUNHA NETO et al., 2002).

Os sintomas apresentados são náuseas, vômitos, diarreias, dores abdominais, dor de cabeça, sudorese, prostração e sede e aparecem geralmente dentro de quatro horas após a ingestão do alimento contaminado (RIEDEL, 1992; JAY, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). O quadro clínico normalmente é de curta duração (média de 24h), podendo se estender por até três dias, quando o período de incubação é curto e em geral a mortalidade é baixa (RIEDEL, 1992).

Os fatores mais frequentemente associados a surtos por ingestão de alimento contaminado por enterotoxinas são falhas na higiene de manipuladores infectados, de utensílios e bancadas, refrigeração inadequada, alimento preparado com muita antecedência, cozimento ou processamento inadequado e alimentos mantidos sob aquecimento em temperaturas que favorecem a multiplicação microbiana (JAY, 2005).

A presença de *Staphylococcus aureus* foi relatada em 958 casos e 43 surtos ocorridos no Japão, no período de 1987 a 1996, envolvendo pescado e frutos do mar; e em 1068 casos e 28 surtos, envolvendo produtos a base de pescado e frutos do mar. No Brasil, em Florianópolis, estes mesmos produtos apresentaram *S. aureus* em 20% de 175 amostras examinadas, sendo que 60% das amostras contaminadas eram moluscos (VIEIRA, 2004).

Antony et al. (2002) detectaram *Staphylococcus* coagulase positiva variando entre  $4,0 \times 10^2$  a  $7,5 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de camarão em indústrias de beneficiamento na Índia. Segundo os autores, essa alta contaminação pode ter ocorrido devido às falhas no transporte e manipulação do alimento. Nascimento et al. (1999) e Duarte et al. (2010) também detectaram em camarões beneficiados altas contaminações por estafilococos pelos mesmos motivos supra citados.

### *Salmonella* spp.

A pesquisa do gênero *Salmonella* tem grande importância para a saúde pública pelo fato de ser amplamente distribuído na natureza, possuir uma grande variedade de reservatórios, ser extremamente patogênico para o ser humano e para muitas espécies animais e ter sua disseminação favorecida por indivíduos portadores, características que dificultam o controle da enfermidade. A bactéria é considerada por muitos autores como um dos patógenos mais importantes causadores de surtos de infecções alimentares em todo o mundo (BERSOT, 2006).

Infectam humanos e a maioria dos animais domésticos e selvagens pela ingestão de água ou alimento contaminado e passam a habitar o trato intestinal. A sua presença na água, alimentos e no ambiente deve-se à contaminação por fezes de indivíduos doentes ou portadores, sendo que o portador pode excretar



*Salmonella* spp. em suas fezes sem apresentar qualquer sinal ou sintoma da doença (JAY, 2005).

Enfermidades causadas por *Salmonella* spp. têm o período de incubação longo de 12 a 72 horas e duração de um a sete dias; os sintomas são: diarreia, cólicas intestinais e com certa frequência, febre, náuseas e vômitos. A taxa de mortalidade de salmonelose é menor que 1% (FORSYTHE, 2002; RIEDEL, 1992).

*Salmonella* spp. já foi isolada de diferentes tipos de alimentos, no entanto, é mais comumente isolada de carne bovina, ovos e carne de aves, especialmente carne de frango. As infecções humanas geralmente estão ligadas ao consumo de carne de frango ou de ovos mal cozidos ou indevidamente manipulados, que permite a multiplicação do microrganismo no alimento (CAMPOS, 2005; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), essa bactéria é responsável por cerca de 75% do total de doenças transmitidas por alimento (OMS, 2003). Nos Estados Unidos representaram 49,5% de surtos foram causados pela ingestão de alimentos contaminados por *Salmonella* spp. no período de 1998 a 2002 (LYNCH et al., 2006). Ainda naquele país, as salmonelas não tifóides têm sido associadas ao consumo de peixes e crustáceos, sendo *Salmonella* paratyphi e *Salmonella* enteritidis encontradas em camarão e moluscos bivalves e *Salmonella* typhi a principal bactéria associada a doenças veiculadas por moluscos (FELDHUSEN, 2000).

No Japão, onde o consumo de pratos à base de frutos do mar crus é muito habitual, cerca de 70% das doenças transmitidas por alimentos estão relacionadas a esta bactéria, com relatos de 3.145 casos e 57 surtos, envolvendo pescado e frutos do mar; e de 806 casos e 37 surtos, envolvendo alimentos à base desses produtos, no período de 1987 a 1996 (HOFFMANN et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2001).

Santos (2011) encontrou *Salmonella* spp. em 70% das amostras de camarão comercializadas em um mercado de peixes em Niterói - RJ. A contaminação dessas amostras foi atribuída à manipulação inadequada do camarão, além disso, a multiplicação da bactéria teria sido favorecida pela temperatura próxima da ambiente nos casos em que a quantidade de gelo era insuficiente nas barracas onde eram comercializados os camarões.

Do ponto de vista da Saúde Pública, o consumidor deve ter à sua disposição alimentos de boa qualidade, dentro dos padrões regularizados tanto em valores nutricionais como também em boas condições higiênico-sanitárias, livres de agentes microbianos nocivos que possam de alguma forma, afetar a saúde do consumidor (CORREIA; RONCADA, 1997). Garantir a disponibilidade de alimentos seguros para o consumidor tem sido uma constante preocupação dos setores governamentais que tem fomentado a elaboração de regulamentos técnicos e normatizações, aplicáveis a todo tipo de indústria de alimentos e serviços alimentares, objetivando estabelecer procedimentos operacionais em todas as etapas da cadeia produtiva ou de manipulação de alimentos, visando prevenir, minimizar e ou eliminar os fatores e agentes responsáveis pelas DTA's (ALMEIDA-MURADIAN, 2007).

No Brasil, 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* apresentam o máximo tolerado de  $10^3 \cdot g^{-1}$  de *Staphylococcus* coagulase positiva e a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de amostra e para águas destinadas à aquicultura e à atividade de pesca (classe 2), a concentração de coliformes termotolerantes não deverá exceder  $10^3$  NMP.100mL<sup>-1</sup>, de acordo com a Resolução 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2005).

Além do mercado interno, o camarão deve também atender às especificações do comprador e ser elaborado de acordo com os requisitos regulamentares do país importador (DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA, 2001). Ao atender a um conjunto de normas legais e econômicas, a aquicultura oferece ao mercado um produto com elevado valor agregado (CRUZ; SÁNCHEZ, 2003). Caso a microbiota contaminante não esteja

dentro dos limites impostos pela legislação pode haver a penalização de não ser comercializado ou exportado (GUIMARÃES et al., 2001; MOURA et al., 2003).

A qualidade microbiológica do camarão está exposta a mudanças durante o seu cultivo, abate, transporte, beneficiamento e comercialização. Para tornar mínima a contaminação microbiana e multiplicação indesejada de microrganismos no produto é necessário que sejam tomadas medidas preventivas durante toda a cadeia produtiva. No caso da carcinicultura, atividade em crescimento no mundo, é necessário conhecer a maneira como ocorre a contaminação microbiológica do camarão em seu ambiente de cultivo e, assim sendo, discutir medidas preventivas. Desse modo os produtores podem oferecer um alimento seguro, ou seja, que não oferece riscos à saúde do consumidor e de qualidade que traz vantagens econômicas através da diminuição das barreiras para o comércio internacional, menos perdas na produção e maior competitividade.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade microbiológica do camarão da amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) e sua relação com ambiente de criação.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Verificar a qualidade higiênica e sanitária da água e sedimento do viveiro e do camarão *Macrobrachium amazonicum* por meio da colimetria;
- Pesquisar a presença de microrganismos patogênicos e potencialmente patogênicos nas amostras da água, do sedimento e dos camarões através do isolamento de *Escherichia coli* patogênica, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp;
- Comparar os resultados obtidos com a legislação brasileira para água e para o camarão;
- Comparar os resultados obtidos no período de seca e período de chuva;
- Verificar a relação existente entre os microrganismos isolados da água e sedimento do viveiro e o camarão *Macrobrachium amazonicum*;
- Fornecer subsídios em relação à produção para que criadores de camarão de água doce obtenham um produto de boa qualidade microbiológica.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL, COLHEITA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

Para realização do estudo foram adquiridas amostras de água de viveiros de carcinicultura; sedimento, composto por uma parte líquida e outra sólida (Figura 1) e camarões *Macrobrachium amazonicum* adultos (Figura 2).

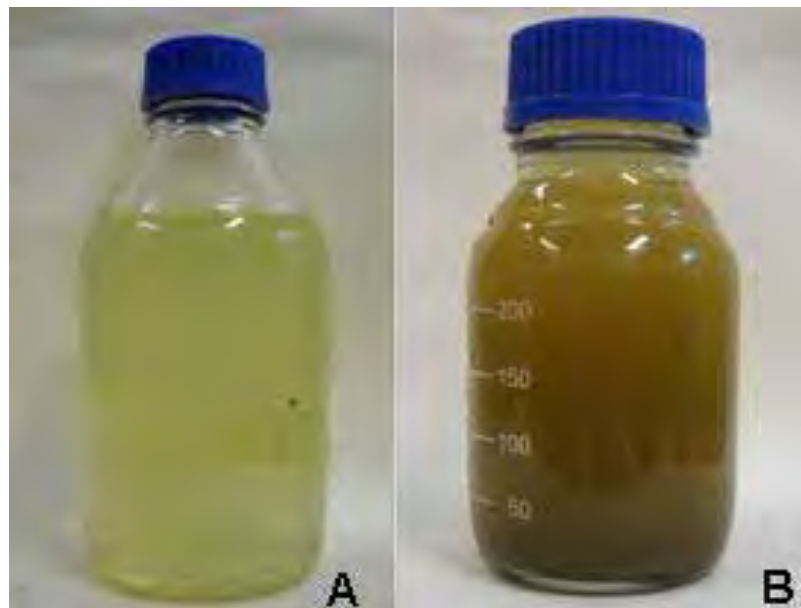


Figura 1. Água (A) e sedimento (B) colhidos no viveiro de camarões localizado no Setor de Carcinicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal - SP.



Figura 2. Camarão (*Machrobrachium amazonicum*) colhido no viveiro de reprodutores localizado no Setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal – SP.

As amostras foram colhidas no viveiro de reprodutores (Figura 3) do Setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP (21° 15'S e 48° 19'W) localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal - SP (UNESP-FCAV). O clima na região é caracterizado por duas estações, com inverno seco e verão úmido, sendo que as chuvas se concentram entre outubro e março e o período seco de abril e setembro (FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS/UNESP, 2012).

Foram realizadas seis colheitas, sendo cada amostragem composta por amostras de água e sedimento em cinco pontos do viveiro isoladamente e cinco camarões, totalizando 30 amostras de cada material. As colheitas foram feitas aleatoriamente durante o ano de 2011 sempre no período da manhã entre 08:30 e 9:30 horas. Foram realizadas quatro colheitas no período de seca e duas colheitas no período de chuva.



Figura 3. Viveiro de reprodutores localizado no Setor de Carcinicultura localizado no Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal - SP

Primeiramente foram feitas as colheitas de água e sedimento e por último do camarão, pois o uso da rede de arrasto causava a ressuspensão do sedimento, alterando as características da coluna d'água, o que prejudicaria os resultados do estudo. Para ter acesso aos pontos de colheita foi necessário entrar no viveiro. Foi colhido 1 litro de amostra de água, utilizando um frasco estéril foi mergulhado com a boca virada para baixo a cerca de dez centímetros da superfície e, após retirar a tampa, o frasco foi inclinado para permitir a entrada da água, fechado ainda dentro da água e posteriormente teve o ponto de colheita identificado no frasco. Posteriormente era feita a colheita de sedimento mergulhando uma garrafa de Van Dorn horizontal até o fundo do viveiro e arrastando-a delicadamente para possibilitar a entrada do sedimento e após esse procedimento a garrafa de Van Dorn era fechada e trazida à superfície. O conteúdo foi transferido para um balde e em seguida para um frasco estéril, com o ponto de colheita identificado. Para captura dos camarões foi utilizada uma rede de arrasto que foi introduzida em toda largura do viveiro e deslocada para a margem, onde cinco camarões foram colhidos aleatoriamente, colocados em sacos plásticos esterilizados e colocados em imersão em gelo para serem abatidos.

As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmicas com gelo reciclável e transportadas para o Laboratório de Análise de Água e Alimentos, localizado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus da UNESP de Jaboticabal - SP (UNESP - FCAV) onde foram realizadas as análises.

## 4. 2 PREPARO E DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

### 4.2.1 Água

A água e suas diluições foram utilizadas para as análises microbiológicas. Para obtenção a diluição  $10^{-1}$  foi transferido 1 mL da amostra de água em tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, o mesmo procedimento foi realizado, utilizando 1 mL da diluição anterior, e assim sucessivamente, até obter a diluição  $10^{-3}$ .

### 4.2.2 Sedimento

Para preparar as amostras, os frascos foram homogeneizados e para a obtenção da diluição  $10^{-1}$  foi transferido 1 mL da amostra de sedimento para tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, o mesmo procedimento foi realizado, utilizando 1 mL da diluição anterior, e assim sucessivamente, até obter a diluição  $10^{-3}$ .



### 4.2.3 Camarão

Todos os camarões foram analisados em três partes: superfície externa, trato gastrointestinal e tecido muscular.

#### a) Água de enxaguadura da superfície externa (APHA, 2001)

Foram adicionados 100 mL de água peptonada 0,1% esterilizada no saco plástico contendo o camarão. Em seguida o camarão foi massageado durante um minuto para transferir os microrganismos da superfície externa para a água peptonada. Desta maneira foi obtida uma amostra da água de enxaguadura (Figura 4) que foi utilizada nas análises microbiológicas. Para obtenção da diluição  $10^{-1}$  foi transferido 1 mL da amostra de água de enxaguadura da superfície externa para tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, o mesmo procedimento foi realizado, utilizando 1 mL da diluição anterior, e assim sucessivamente, até obter a diluição  $10^{-3}$ .

#### b) Trato gastrointestinal (APHA, 2001)

Para retirar o trato gastrointestinal do camarão foram feitos dois cortes dorsais, um de cada lado, paralelos aparelho digestivo do camarão, com auxílio de tesoura esterilizada. O exoesqueleto que revestia a região do corte foi descartado e o trato gastrointestinal do camarão foi retirado com auxílio de pinça esterilizada e transferido para tubo de ensaio onde foram adicionados 10 mL de água peptonada 0,1%, obtendo-se a amostra de trato gastrointestinal do camarão (Figura 4) para análise. Para obtenção da diluição  $10^{-1}$  foi transferido 1 mL da amostra do trato gastrointestinal para tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, o mesmo procedimento foi realizado, utilizando 1 mL da diluição anterior, e assim sucessivamente até obter a diluição  $10^{-3}$ .

c) Tecido muscular (APHA, 2001)

Antes de ser dissecado, foi feita assepsia da superfície externa do camarão com água destilada esterilizada para evitar contaminação do seu interior. Com auxílio de tesoura e pinça esterilizadas foram retirados o restante do exoesqueleto e o cefalotórax do camarão. A musculatura de cada camarão foi retirada e pesada. Foi adicionada a quantidade de água peptonada 0,1% (na proporção de 9 mL de água peptonada para cada grama de camarão) para obtenção da diluição  $10^{-1}$  (Figura 4). Novas diluições decimais foram realizadas transferindo-se 1 mL da diluição anterior para tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, e assim sucessivamente, até obter a diluição  $10^{-3}$ .

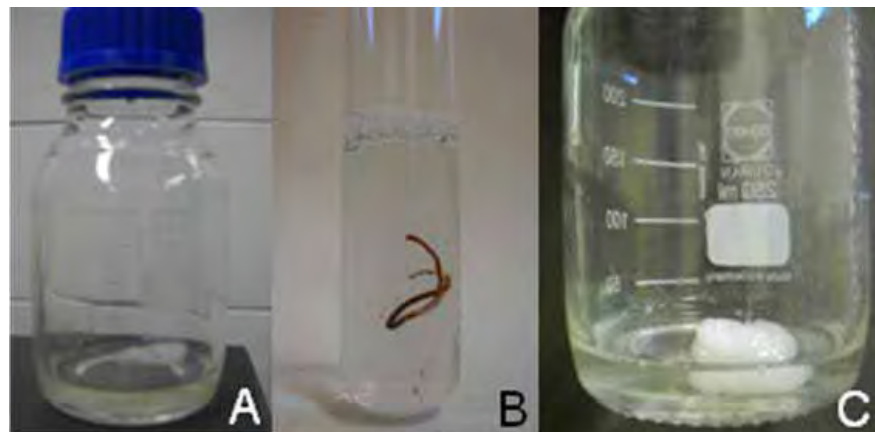


Figura 4. Amostras da água de enxaguadura da superfície externa (A), trato gastrointestinal (B) e músculo (C) do camarão.

### 4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.3.1 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes na água, sedimento e camarão (APHA, 1998).

Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos com uma série de 5 tubos para a água do viveiro e série de 3 tubos para o sedimento e camarão. Para a avaliação dos coliformes totais, 1 mL da amostra de água, do sedimento, água de enxaguadura da superfície externa, musculatura e trato gastrointestinal dos camarões e suas respectivas diluições 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 verde brilhante 2% 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 da água, mL de sedimento, mL da água de enxaguadura, grama de músculo e por trato gastrointestinal.

Para coliformes termotolerantes, alíquotas dos tubos de caldo Lauril sulfato triptose com turvação e 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 da água, mL de sedimento, mL da água de enxaguadura, grama de músculo e por trato gastrointestinal (APHA, 1998).

#### 4.3.2. Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

Alíquotas das culturas, das diferentes amostras, em caldo lauril sulfato de sódio, foram semeadas em Ágar EMB (Eosina Azul de Metileno). Colônias características de *E. coli* foram semeadas em tubos com meio TSA (Tryptone Soy Agar) inclinado e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, para confirmar se os isolados tratavam-se de *E. coli*, foram realizados os testes de Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato.

No teste do indol, foi retirada uma alíquota da cultura crescida em TSA e inoculada em tubos contendo 4 mL de água peptonada 1% que foi incubado a 35°C por 24 horas. Posteriormente, foram adicionadas ao meio de cultura cinco gotas do reagente de Kovac's para observar se houve a degradação do aminoácido Triptofano e produção de Indol, o que se observa pelo desenvolvimento de um anel vermelho na superfície do meio (teste positivo) ou se o anel permanecerá amarelo da mesma cor do reagente (teste negativo).

Para a realização dos testes de Vermelho de Metila e Voges-Proskauer, foi retirada uma alíquota da cultura crescida em TSA e inoculada em dois tubos com o Caldo MR-VP que foram incubados a 35°C por 48h. Para o teste de Voges-Proskauer, foi adicionado nos tubos 0,6mL de solução de  $\alpha$  – naftol 5% e agitou-se, adicionando em seguida 0,2mL de KOH 40%, onde deveria ser observado por até trinta minutos o desenvolvimento de uma cor rosa no meio de cultura (teste positivo), a permanência do meio na cor do reagente marrom indicaria teste negativo. Para o teste de Vermelho de Metila foram adicionadas cinco gotas de solução de vermelho de metila, sendo observada imediatamente uma coloração vermelha do meio sendo o teste positivo.

Na prova do citrato, foi retirada uma alíquota da cultura crescida em TSA com uma alça de níquel cromo previamente flambada e então, foi realizado um estriamento sobre o meio inclinado de Ágar Citrato de Simmons. Após 48 horas em estufa a 35°C, a mudança da cor verde para uma coloração azul indica a presença de produtos alcalinos no meio e uma prova da utilização do citrato como única fonte de carbono. Quando isto acontecia a prova foi considerada positiva, sendo que a manutenção da cor verde indicaria negatividade da prova.

O perfil bioquímico compatível com *E. coli* apresenta indol positivo, vermelho de metila positivo, Voges-Proskauer negativo e citrato negativo.

Para a extração do DNA três colônias de *E. coli* foram semeadas em ágar Mac Conkey com incubação a 37° C por 24 horas e tiveram seu DNA isolado e submetido ao teste de PCR para detectar *E. coli* das linhagens enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC) ou enterohemorrágica (EHEC).

#### 4.3.3 Extração de DNA e PCR multiplex

Os isolados de *E. coli* foram transferidos para caldo BHI (Brain Heart Infusion) por aproximadamente 12 horas. Após o crescimento, foram coletados 1,0 mL da cultura de cada isolado de bactéria, os quais foram transferidos para tubos eppendorf de 2,0 mL. Os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 13.400 rpm. Após, o sobrenadante foi descartado e ao pellet de colônias foi acrescentado 1,0 mL de solução PBS (8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O; 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl). O pellet foi dissolvido em vortex e, logo em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente sob as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e ao pellet de colônias foi acrescentado 0,5 mL de água milli-Q estéril no qual o pellet foi dissolvido. A extração de DNA foi realizada por fervura. Assim, os tubos foram mantidos em um equipamento Thermomixer Compact (Eppendorf) em temperatura de 99°C, sem agitação por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e 400 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos novos.

O DNA das amostras foi submetido à PCR multiplex utilizando-se um conjunto de primers específicos para amplificação de diferentes genes de interesse (Tabela 1). Na PCR multiplex com os primers *stx1*, *stx2* e *eae* utilizou-se a cepa de *E. coli* padrão edl933 (Unifesp). Na PCR multiplex com os primers *eltB*, *estA* e *estB* utilizou-se a cepa padrão de *E. coli* Ecl7805 (Universidade de Montreal). Já na PCR multiplex com os primers *aggR* e *aafII* a cepa padrão utilizada foi a O42 (Unifesp).

Para a reação PCR de amplificação dos fragmentos, utilizou-se tampão 1X [100 mM Tris-HCl pH 8,8; 500 mM KCl; 0,8% (v/v) Nonidet P40]; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; dNTP's 0,2 mM, 1,5 U de *Taq DNA polimerase*, 5 pmol de cada primer, 60 ng de

DNA genômico e água pura estéril para 20 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) programado para realizar 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minuto, e para finalizar, um ciclo a 72°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e padrão de tamanho molecular 1kp Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os fragmentos foram visualizados sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC™ EQ (BioRad).

Tabela 1. Primers específicos utilizados na diferenciação dos subgrupos de *E. coli*.

Primers	Seqüências	Tamanho (pb)	Referências
<i>stx1</i>	AGAGCGATGTTACGGTTTG TTGCCCCCAGAGTGGATG	388	
<i>stx2</i>	TGGGTTTTTCTTCGGTATC GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807	China et al. (1996)
<i>eae</i>	AGGCTTCGTACAGTTG CCATCGTCACCAGAGGA	507	
<i>eltB</i>	TTA CGG CGT TAC TAT CCT CTC TA GGT CTC GGT CAG ATA TGT GAT TC	275	Furrer et al. (1990)
<i>estA</i>	TCC CCT CTT TTA GTC AGT CAA CTG GCA CAG GCA GGA TTA CAA CAA AGT	163	Ngeleka et al. (2003)
<i>estB</i>	GCA ATA AGG TTG AGG TGA T GCC TGC AGT GAG AAA TGG AC	368	Lortie et al. (1991)
<i>aggR</i>	CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG	457	Cerna et al. (2003)
<i>aafII</i>	CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T	378	Schmidt et al. (1995)

#### 4.3.4 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

Foram utilizados volumes de 100 mL da amostra de água e suas diluições, que foram obtidas adicionando 10 mL de amostra de água em 90 mL de água peptonada a 0,1%, para obter a diluição  $10^{-1}$ , e assim sucessivamente até obter a diluição  $10^{-3}$ . As amostras de água e suas diluições foram filtradas em membrana com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  e posteriormente as membranas foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar Baird Parker. Para as diferentes partes do camarão e para o sedimento, foi transferido 0,1 mL das diluições obtidas das amostras de água de enxaguadura da pele, do músculo e trato gastrointestinal para placas de Petri contendo Ágar Baird Parker. Foi realizada a semeadura com auxílio da alça de Drigalsky para espalhar o inóculo. As placas de Baird Parker foram incubadas a 36°C por 48 horas (APHA, 1998).

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 inclinado e incubados a 37°C por 24 horas (APHA, 1992).

Posteriormente essas colônias foram submetidas ao teste da catalase onde 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 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. 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 verificou-se a formação de coágulo após 1, 2, 3, 4 e 24 horas de incubação. Foram considerados coagulase positiva os *Staphylococcus* que coagularam o plasma de coelho dentro desse período de tempo.

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada com base no resultado das provas descritas, proporcionalmente ao número de colônias características contadas no Ágar Baird-Parker e a diluição utilizada na contagem.

Os resultados foram expressos por 100 mL de água, por mL de sedimento e água de enxaguadura, por grama de músculo e por trato gastrointestinal.

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

##### a) Pré-enriquecimento

Foi realizado um pré-enriquecimento, 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 sedimento, músculo, do trato gastrointestinal e da água de enxaguadura do camarão foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

##### b) Enriquecimento seletivo

Duas alíquotas de 1 mL e 0,1 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) Plaquetamento 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 sugestivas de *Salmonella* spp. 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 seria considerada positiva. O mesmo procedimento foi realizado para o soro polivalente flagelar-H. Seria considerada como de *Salmonella* spp. a cultura que apresentasse positividade em ambas as provas, que sempre seriam acompanhadas de provas com padrão positivo e negativo.

### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados microbiológicos foram transformados utilizando a raiz quadrada dos valores e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (SAS, 1991). Foram feitas comparações entre as médias dos NMP coliformes (totais e termotolerantes) e o número de *Staphylococcus* coagulase positiva da água e sedimento dos viveiros, superfície externa, músculo e trato gastrointestinal do camarão. Além disso, também foram feitas comparações das médias das populações dos microrganismos pesquisados de cada amostra no período da seca e chuva.

Foram estimadas correlações de Pearson entre os valores de coliformes totais e termotolerantes das amostras, sendo que a hipótese de nulidade (ausência de correlação) foi testada a 5% de probabilidade utilizando o teste t de Student.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Coliformes totais

A variação dos números mais prováveis de coliformes totais na água e sedimento do viveiro e da água de enxaguadura da superfície externa, músculo e trato gastrointestinal do camarão está apresentada na Tabela 2. As populações de coliformes totais na água do viveiro variaram de  $< 0,2 \times 10$  a  $5,0 \times 10^2$  NMP.100mL<sup>-1</sup>; no sedimento de  $< 0,3 \times 10$  a  $4,6 \times 10$  NMP.mL<sup>-1</sup>; na água de enxaguadura da superfície externa do camarão de  $< 0,3 \times 10$  a  $4,6 \times 10$  NMP.mL<sup>-1</sup>; no músculo do camarão de  $< 0,3 \times 10$  a  $2,1 \times 10$  NMP.g<sup>-1</sup> e no trato gastrointestinal do camarão de  $< 0,3 \times 10$  a  $4,6 \times 10$  NMP.trato gastrointestinal<sup>-1</sup>. Os coliformes totais foram detectados na maioria das amostras e em quantidades reduzidas.

A presença de coliformes totais não indica diretamente o contato com fezes humanas ou de animais, portanto a sua presença não representa necessariamente um risco para saúde, porém informa o grau de contaminação microbiológica ao qual está exposto o camarão e o viveiro em que ele foi cultivado, indicando falhas na higiene durante o cultivo.

Esses valores diferem da pesquisa de Carvalho (2006) que avaliou viveiros e camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* em quatro fazendas do Ceará encontrando altíssimas concentrações de coliformes, com variação de  $< 1,8$  a  $1,8 \times 10^5$  NMP.100mL de coliformes totais na água do viveiro;  $< 0,3 \times 10$  a  $2,4 \times 10^5$  NMP.g<sup>-1</sup> no sedimento dos viveiros e no camarão constatou valores entre  $< 1,8$  a  $7,9 \times 10^2$  NMP.g<sup>-1</sup>. Nesse estudo a autora destaca a existência de conhecidos pontos de descarga de esgoto das cidades próximas aos rios de onde era captada a água para abastecer os viveiros.

Tabela 2. População de coliformes totais das amostras de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão por amostragem.

Amostragem	Água (NMP.100mL <sup>-1</sup> )	Sedimento (NMP. mL <sup>-1</sup> )	SE (NMP.mL <sup>-1</sup> )	Músculo (NMP.g <sup>-1</sup> )	TG (NMP.trato gastrointestinal <sup>-1</sup> )
1	1,3x10	2,1x10	<0,3x10	0,36x10	0,15x10
	0,8x10	0,23x10	0,29x10	0,6x10	0,44x10
	0,8x10	0,23x10	0,43x10	<0,3x10	0,15x10
	1,1x10	0,15x10	<0,3x10	0,36x10	<0,3x10
	4,0x10	4,6x10	0,04x10	0,36x10	0,04x10
2	4,5x10 <sup>2</sup>	0,43x10	0,15x10	0,91x10	0,09x10
	1,3x10	0,23x10	0,09x10	0,36x10	0,04x10
	1,3x10 <sup>2</sup>	0,04x10	0,09x10	<0,3x10	1,5x10
	3,5x10	0,93x10	0,23x10	0,36x10	<0,3x10
	1,7x10	0,36x10	0,11x10	<0,3x10	<0,3x10
3	<0,2x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	<0,2x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	0,2x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	0,2x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	0,8x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
4	1,3x10	0,09x10	<0,3x10	0,3x10	<0,3x10
	3,0x10	0,03x10	<0,3x10	0,3x10	0,07x10
	2,3x10	0,03x10	<0,3x10	<0,3x10	0,04x10
	2,3x10	0,04x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	2,1x10	<0,3x10	0,04x10	<0,3x10	<0,3x10
5	1,4x10	0,03x10	0,14x10	2,1x10	0,15x10
	7,0x10	0,43x10	0,15x10	2,0x10	0,2x10
	1,1x10 <sup>2</sup>	0,23x10	0,04,10	<0,3x10	0,43x10
	6,0x10	0,15x10	0,15x10	0,3x10	4,6x10
	7,0x10	0,93x10	0,21x10	2,1x10	0,21x10
6	5,0x10 <sup>2</sup>	4,6x10	2,4x10	1,5x10	0,23x10
	2,2x10 <sup>2</sup>	2,4x10	4,6x10	2,1x10	<0,3x10
	5,0x10	3,9x10	0,43x10	0,73x10	2,4x10
	1,7x10 <sup>2</sup>	0,93x10	0,72x10	0,36x10	0,93x10
	1,1x10 <sup>2</sup>	2,4x10	0,43x10	2,3x10	<0,3x10

Valores baixos de contaminação por coliformes totais foram encontrados por Aguiar (2005) que pesquisou estes mesmos camarões marinhos recém capturados e a água dos viveiros de uma fazenda de Barra do Sul - SC, onde foram encontrados valores de coliformes totais entre <1,1 a 2,3 x 10 NMP.100 mL<sup>-1</sup> na água e nos camarões foram encontrados valores de 5,7 a 2,7 x 10<sup>2</sup> NMP.g<sup>-1</sup> de coliformes totais. Gomes (2005) pesquisando a qualidade de água da Laguna da Jansen em São Luis - MA e pescados retirados do local encontrou valores de coliformes totais que variaram de 4,5x10<sup>2</sup> a 4,5x10<sup>3</sup> NMP.100mL<sup>-1</sup> da água; 7,8 x

$10^2$  a  $2,0 \times 10^3$  NMP.  $g^{-1}$  no camarão branco *Penaeus schmitti* e  $8,2 \times 10^2$  a  $2,4 \times 10^3$  NMP.  $g^{-1}$  no peixe camurim (*Centropomus undecimalis*).

Embora a enumeração de coliformes totais não indique diretamente a presença de enteropatógenos, sua presença pode ser associada ao potencial de deterioração do produto e sua vida de prateleira (AGNESE et al., 2001). O camarão é um ótimo substrato para multiplicação de microrganismos, portanto a alta carga microbiana favorece a rápida deterioração do produto, causando perdas no comércio de camarões. Os mesmos autores ainda afirmam que valores de coliformes totais acima de 50 a 100 NMP por grama de carne de pescado indicam a necessidade de realizar um controle mais rígido relacionado à higiene do produto.

#### Coliformes termotolerantes

A variação dos números mais prováveis de coliformes termotolerantes na água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa, músculo e trato gastrointestinal do camarão está apresentada na Tabela 3. As populações de coliformes termotolerantes na água de viveiro variaram de  $<0,2 \times 10$  a  $5,0 \times 10$  NMP.100mL<sup>-1</sup>; no sedimento de  $< 0,3 \times 10$  a  $4,6 \times 10$  NMP.mL<sup>-1</sup>; água de enxaguadura da superfície externa do camarão de  $< 0,3 \times 10$  a  $4,3 \times 10$  NMP.mL<sup>-1</sup>; no músculo do camarão de  $<0,3 \times 10$  a  $2,1 \times 10$  NMP.g<sup>-1</sup> e no trato gastrointestinal de camarão de  $<0,3 \times 10$  a  $0,75 \times 10$  NMP.trato gastrointestinal<sup>-1</sup>

A ocorrência de coliformes termotolerantes no camarão não é natural, sendo resultado da contaminação do ambiente de criação já que esses coliformes existem em elevadas concentrações nas fezes de animais homeotérmicos e ocorrem na água em número reduzido (CARDOSO et al., 2001). Portanto, a presença dessas bactérias em diferentes populações indica que há alguma fonte de contaminação fecal na água. As prováveis vias de contaminação por coliformes termotolerantes nos viveiros geralmente são o uso de água poluída para abastecer o viveiro ou contaminação direta por esgoto, por resíduos de adubos orgânicos ou por dejetos lançados no tanque.

Tabela 3. População de coliformes termotolerantes das amostras de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão por amostragem.

Amostragem	Água (NMP.100mL <sup>-1</sup> )	Sedimento (NMP. mL <sup>-1</sup> )	SE (NMP.mL <sup>-1</sup> )	Músculo (NMP.g <sup>-1</sup> )	TG (NMP. Trato gastrointestinal <sup>-1</sup> )
1	1,3x10	1,2x10	<0,3x10	0,36x10	0,15x10
	0,8x10	0,23x10	0,29x10	0,6x10	0,2x10
	0,8x10	0,23x10	0,43x10	<0,3x10	0,15x10
	1,1x10	0,15x10	<0,3x10	0,36x10	<0,3x10
	4,0x10	4,6x10	0,04x10	0,36x10	0,04x10
2	4,5x10 <sup>2</sup>	0,43x10	0,03x10	<0,3x10	<0,3x10
	1,3x10	0,09x10	0,04x10	0,36x10	0,04x10
	1,3x10 <sup>2</sup>	0,04x10	<0,3x10	<0,3x10	7,5
	2,5x10	0,43x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	1,7x10	0,29x10	0,07x10	<0,3x10	<0,3x10
3	<0,2x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	<0,2x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	0,2x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	0,2x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	0,2x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
4	13,0	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	8,0	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	4,0	<0,3x10	0,04x10	<0,3x10	<0,3x10
	13,0	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	2,0	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
5	30,0	0,03x10	0,09x10	0,36x10	0,04x10
	23,0	0,43x10	<0,3x10	<0,3x10	0,04x0
	23,0	0,23x10	0,04x10	<0,3x10	0,43x10
	30,0	0,15x10	0,03x10	0,03x10	0,23x10
	30,0	0,93x10	0,09x10	2,1x10	0,09x10
6	30,0	0,23x10	<0,3x10	0,04x10	<0,3x10
	30,0	<0,3x10	0,09x10	<0,3x10	<0,3x10
	8,0	<0,3x10	0,04x10	<0,3x10	<0,3x10
	23,0	0,04x10	<0,3x10	<0,3x10	<0,3x10
	50,0	0,09x10	0,09x10	<0,3x10	<0,3x10

Como no viveiro do presente estudo não foi verificada a presença de fonte pontual de contaminação fecal, a população de coliformes termotolerantes encontradas foi baixa. Esses coliformes presentes no viveiro e no camarão podem ter sido encontrados devido ao contato da água com fezes de animais silvestres e domésticos próximos ao viveiro, o que pode ser evitado impedindo a circulação de animais no local de criação dos camarões, com uso de telas, cercas, alambrados ou outro tipo de proteção, prevenindo essa fonte de contaminação.

Aguiar (2005), que pesquisou contaminação por coliformes termotolerantes em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* recém capturados e da água dos

viveiros de uma fazenda de Barra do Sul - SC, encontrou valores entre  $< 0,1 \times 10^4$  a  $1,6 \times 10^4$  NMP.100mL<sup>-1</sup> na água de cultivo e para camarões e de  $< 0,3 \times 10^4$  a  $7,1 \times 10^4$  NMP. g<sup>-1</sup>. Em contrapartida, contagens elevadas de coliformes termotolerantes foram constatadas por Carvalho (2006) em fazendas de camarões no Ceará, com valores de  $< 1,8$  a  $1,8 \times 10^5$  NMP.100 mL<sup>-1</sup> na água do viveiro;  $< 3$  a  $2,4 \times 10^5$  NMP.g<sup>-1</sup> no sedimento dos viveiros e no camarão constatou valores entre  $< 1,8$  a  $7,9 \times 10^2$  NMP. g<sup>-1</sup>. A autora destacou ainda que a água de abastecimento das fazendas se encontrava exposta ao despejo de esgoto de cidades próximas às fazendas, o que implicou nos resultados encontrados. Valores semelhantes foram encontrados por Gomes (2005) pesquisando a qualidade de água da Laguna da Jansen em São Luis - MA, peixes e camarões retirados do local, com valores entre  $1,0 \times 10^2$  a  $2,9 \times 10^3$  NMP.100mL<sup>-1</sup> de água,  $1,8 \times 10^2$  a  $9,0 \times 10^2$  NMP.g<sup>-1</sup> de camarão e  $1,4 \times 10^2$  a  $1,2 \times 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup> no peixe.

Os parâmetros microbiológicos adotados pela resolução RDC n° 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) para o pescado *in natura* não apresentam limites para coliformes termotolerantes, entretanto a sua presença no camarão não deve ser ignorada já que indica condições sanitárias inadequadas durante a sua produção, além da possível presença de enteropatógenos, o que pode representar um risco à saúde do consumidor.

Nenhuma das amostras de água analisadas apresentaram valores acima do estabelecido pelo CONAMA, que determina que para águas destinadas à aquicultura e à atividade de pesca (classe 2), a concentração de coliformes termotolerantes não deverá exceder  $10^3$  NMP.100mL<sup>-1</sup> (BRASIL, 2005). A amostra de água com maior número de coliformes apresentou  $5,0 \times 10^4$  NMP.100ml<sup>-1</sup>, valor muito abaixo do estabelecido, indicando que a água do viveiro está em condições adequadas para produção de camarões.

### *Escherichia coli*

Foram isoladas *E. coli* em 13 amostras de água, seis amostras de sedimento, oito amostras de água de enxaguadura da superfície externa, quatro amostras de músculo e 13 amostras de intestino. A *E. coli* tem origem exclusivamente do trato intestinal de animais homeotérmicos, não sendo encontrado na água e nem em camarão. Portanto, sua presença nas amostras indica que estas tiveram contato com fezes o que, do ponto de vista da saúde pública, é preocupante, pois indicam a possível presença de enterobactérias patogênicas. Hatha et al. (2003) pesquisaram a qualidade microbiológica de produtos oriundos de atividade de carcinicultura na Índia e verificaram a presença dessa enterobactéria em camarões crus. Carvalho (2006) também detectou a presença de *E. coli* em viveiro e camarão em fazendas no Ceará.

Não foi encontrada *Escherichia coli* que apresentasse genes relacionados à patogenicidade das linhagens enteroagregativas, enterotoxigênicas e enterohemorrágicas nas amostras de água e sedimento do viveiro e no camarão (Figura 5). A presença de *E. coli* patogênica no camarão está relacionada com o uso de água em condições sanitárias precárias, com despejo de dejetos, sendo portanto de extrema importância que a instalação dos viveiros seja feita em local onde seja possível captar água livre desse tipo de contaminação, evitando a presença da *E. coli* patogênica no camarão.

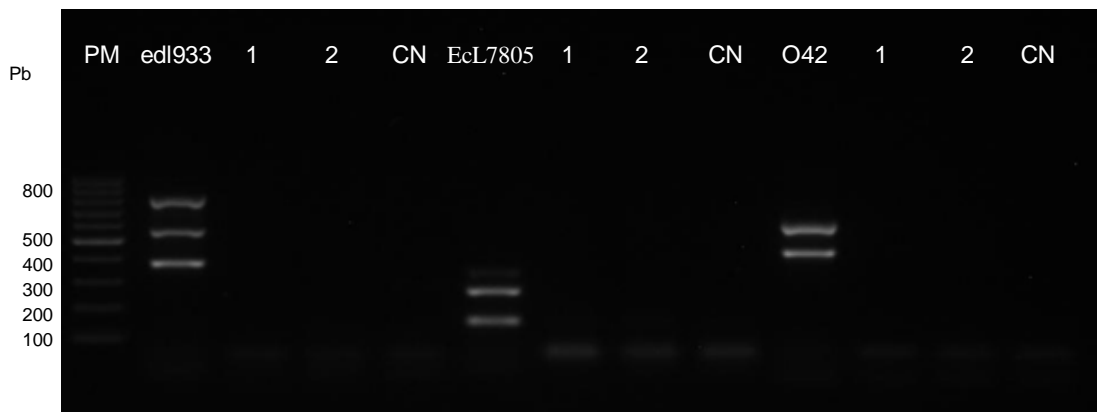


Figura 5. Resultado de PCR com os primers *stx1*, *eae*, *stx2* (388, 570, 807 pb) utilizando-se a cepa edl933, primers *estA*, *eltB* e *etsB* (163, 275, 368 pb) utilizando-se a cepa EcL7805 e dos primers *aafII* e *aggR* (378 e 457 pb), cepa O42. As amostras 1 e 2 não apresentaram amplificação assim como as demais. PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Fermentas). CN: controle negativo de cada reação (mix sem DNA).

### *Staphylococcus coagulase positiva*

A variação da população de *Staphylococcus coagulase positiva* na água e sedimento do viveiro e da água de enxaguadura da superfície externa, músculo e trato gastrointestinal do camarão está representada na Tabela 4. No presente estudo foram encontradas populações de *Staphylococcus coagulase positiva* variando entre  $<1,0 \times 10^2$  a  $4,2 \times 10^2$  UFC.100 mL<sup>-1</sup> na água; de  $< 1,0 \times 10^2$  a  $3,5 \times 10^3$  UFC. mL<sup>-1</sup> no sedimento; de  $< 1,0 \times 10^2$  a  $1,9 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> na água de enxaguadura da superfície externa do camarão e de  $<1,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^2$  UFC.trato gastrointestinal<sup>-1</sup>. No músculo do camarão não foi verificada a presença dessa bactéria. Na maioria das amostras não foram isoladas *Staphylococcus coagulase positiva* e, quando verificadas, foram encontrados valores baixos dessa bactéria, com exceção de algumas amostras.



Tabela 4. Populações de *Staphylococcus coagulase* positiva encontrados em cada amostra de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão por amostragem.

Amostragem	Água (UFC.100.mL <sup>-1</sup> )	Sedimento (UFC. mL <sup>-1</sup> )	SE (UFC. mL <sup>-1</sup> )	Músculo (UFC.g <sup>-1</sup> )	TG (UFC. trato gastrointestinal <sup>-1</sup> )
1	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	33,7x10	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<b>19,5x10<sup>3*</sup></b>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	2,5x10	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	34,7x10 <sup>2</sup>	6,0x0	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
2	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	2,5x10	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
3	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
4	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	0,2x10	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	4,2x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
5	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	9,0x10	<1,0x10 <sup>2</sup>	0,9x10	<1,0x10 <sup>2</sup>	24,7x10
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
6	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	0,2x10
	9,2x10	0,2x10	12,0x10	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	39,3x10	<1,0x10 <sup>2</sup>	0,4x10	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>
	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	0,6x10
	<1,0x10 <sup>2</sup>	0,4x10	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>2</sup>

\*Amostra em desacordo com a resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) para o pescado *in natura*

Os estafilococos também podem ser encontrados no ambiente, mas seu principal reservatório são a pele e mucosa de humanos e animais, além de equipamentos contaminados. Portanto, a presença desses microrganismos no presente estudo pode ter ocorrido devido à contaminação dos equipamentos utilizados para colheita de amostra, já que por vezes *Staphylococcus coagulase* positiva foram encontrados nas amostras de camarão, mas não foram isolados da água e nem do sedimento. Este fato ressalta a importância de adotar medidas de

prevenção para contaminação por estafilococos que englobam cuidados como educação dos manipuladores a respeito de normas de higiene, sanitização e limpeza.

Aguiar (2005) não encontrou estafilococos nas 30 amostras de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* recém capturados e água dos viveiros de uma fazenda de Barra do Sul - SC. Em estudos que ocorreram após o processo de manipulação do camarão, Santos (2011), estudando camarões oriundos de um mercado de peixes em Niterói - RJ encontraram 53,4% das amostras com contagem acima de  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> de estafilococos atribuindo esses valores à maneira que o produto era oferecido, onde a quantidade de gelo foi insuficiente para manter a temperatura ideal de conservação, permitindo a multiplicação dos estafilococos.

O papel do manipulador na contaminação por estafilococos foi estudado por Albuquerque et al. (2006) que analisaram amostras de gelo, água, superfície de bancadas e manipuladores em barracas que comercializavam camarão sete barbas em uma feira livre em Fortaleza - CE e confirmaram *Staphylococcus aureus* em 30% das amostras de gelo, 30% das amostras de bancadas e em 56,5% dos manipuladores (mãos, cavidade nasal e cavidade bucal). Evangelista Barreto e Vieira (2003) observaram a positividade de *S. aureus* em 60% de um total de 24 manipuladores estudados em duas indústrias de pesca em Fortaleza - CE. Na literatura é possível encontrar inúmeras pesquisas sobre elevadas populações de *Staphylococcus aureus* em utensílios usados no processamento de alimentos e nos seus manipuladores (SILVA JUNIOR, 1993; AYULO, 1994; VIEIRA, 2004), demonstrando que em geral, há um despreparo e/ou descaso dos manipuladores dos alimentos quanto ao perigo da presença de microrganismos.

Apenas uma amostra (amostragem 1, na água de enxaguadura da superfície externa) estava em desacordo com a resolução RDC n° 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) para o pescado *in natura* que estabelece o máximo tolerado de  $10^3$ .g<sup>-1</sup> de *Staphylococcus coagulase* positiva.

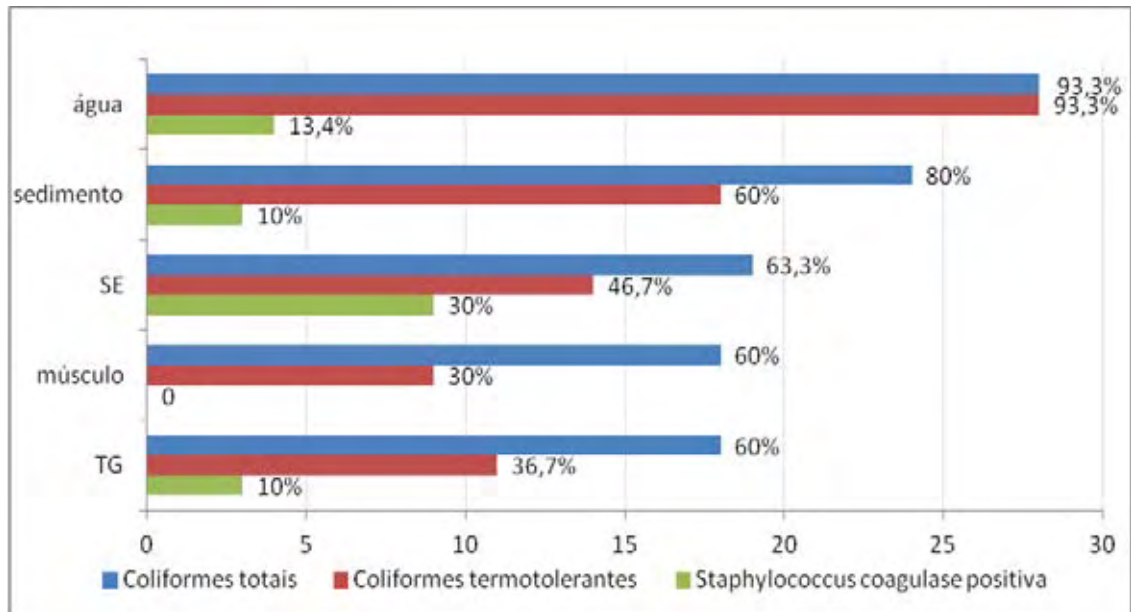
*Salmonella* spp.

No presente estudo não foi verificada a presença de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas, portanto as amostras de camarão estão de acordo com o determinado pela legislação vigente da ANVISA para pescados *in natura*.

A ocorrência da *Salmonella* spp. no camarão pode ser devido à contaminação do ambiente em que foi cultivado, já que esta bactéria não faz parte da microbiota do camarão. Tendo em vista que o viveiro em estudo não apresenta nenhuma fonte pontual de esgoto e a água utilizada nos viveiros também é de qualidade, não houve a contaminação por *Salmonella* spp. na água e nem no sedimento do viveiro e, conseqüentemente, a bactéria não foi encontrada no camarão. Esse resultado corrobora com resultados de Aguiar (2005) que não encontrou *Salmonella* spp. na água e camarão de viveiros e Dalsgaard et al. (1995) que também não detectaram *Salmonella* spp. em nenhuma das 158 amostras (água, sedimento, camarão, ração e fertilizante) coletadas em áreas de cultivo de camarão. Hatha e Rao (1998) descreveram apenas uma amostra positiva para *Salmonella* spp. de um total de 1.264 camarões crus analisados e, implicaram que este fato pode ter relação com a utilização de fertilizantes de origem animal não tratados que contaminou a água do viveiro de cultivo.

Em contrapartida, na análise de *Salmonella* spp. em fazendas do Ceará, Carvalho (2006) encontrou cepas de *Salmonella* spp. em 68,96% amostras de água, 20,68% amostras de sedimento e 10,34% amostras de camarão recém capturado. Segundo a autora, a contaminação por *Salmonella* spp. foi por decorrência das condições de cultivo, pois além das amostras de água do viveiro, foram analisadas amostras da água do rio que abastecia o viveiro. A autora ressaltou que durante o estudo foram detectados pontos de descarga de esgoto das cidades próximas aos rios de onde era captada a água para abastecer os viveiros.

Na Figura 6 estão ilustrados os números e as porcentagens de amostras de água e sedimento do viveiro, água de enxaguadura da superfície externa, músculo e trato gastrointestinal do camarão contaminados por coliformes totais e termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva.



**Figura 6.** Números e porcentagens de amostras de água e sedimento do viveiro, água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão contaminados por coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Staphylococcus coagulase positiva*.

Nota-se que o ambiente de criação apresentou mais amostras contaminadas por coliformes em comparação ao camarão, com 93,3% das amostras de água apresentando coliformes totais e termotolerantes e o sedimento apresentando contaminação em 80% das amostras para coliformes totais e 60% para coliformes termotolerantes. Os viveiros são reservatórios de água abertos e estão mais susceptíveis à contaminação microbiológica já que sofrem influência direta do ambiente em seu entorno.

Em relação às diferentes partes do camarão, a superfície externa apresentou maior número de amostras contaminadas pelos microrganismos em estudo em relação às outras partes do camarão devido ao fato de ser a parte do camarão que está em contato direto com o ambiente externo, ficando susceptível à contaminação por microrganismos presentes no viveiro. Por esse motivo é recomendado que seja feita a lavagem do camarão após a despesca para eliminar esses microrganismos da sua superfície. O músculo do camarão foi a parte que apresentou menor número de amostras contaminadas já que o exoesqueleto protege a musculatura do contato direto com a água.

A má qualidade microbiológica do camarão que chega ao consumidor não ocorre devido apenas às condições em que se encontram seu ambiente de criação já que após a despesca o camarão ainda está susceptível à contaminação microbiológica. Durante o seu processamento, o camarão fica sujeito à contaminação por falta de higiene durante a manipulação. A temperatura de conservação inadequada durante o transporte, armazenamento e comercialização também pode contribuir para multiplicação de microrganismos presentes no camarão. Portanto, mesmo que o camarão recém capturado apresente valores baixos de contaminação, as etapas posteriores da cadeia produtiva podem favorecer o aumento da carga microbiana inicial seja pela multiplicação dos microrganismos existentes ou introdução destes através dos processos pós-despesca.

Na Tabela 5 estão representados os valores médios das populações de coliformes totais, termotolerantes e de *Staphylococcus coagulase positiva* por amostra de água, sedimento do viveiro, água de enxaguadura da superfície externa, músculo e trato gastrointestinal do camarão.

Tabela 5. Valores médios das populações de coliformes totais (CT), termotolerantes (CTer) e de *Staphylococcus coagulase positiva* por amostra de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão.

Amostra	Número	CT	CTer	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>
Água	30	1,30 <sup>B</sup>	1,13 <sup>B</sup>	1,11 <sup>A</sup>
Sedimento	30	2,50 <sup>A</sup>	1,71 <sup>A</sup>	2,99 <sup>A</sup>
SE	30	1,75 <sup>AB</sup>	1,17 <sup>B</sup>	3,99 <sup>A</sup>
Músculo	30	2,25 <sup>A</sup>	1,41 <sup>AB</sup>	<1,0x10 <sup>-3 A</sup>
TG	30	1,76 <sup>AB</sup>	1,24 <sup>B</sup>	1,57 <sup>A</sup>

\* Médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente, a nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Observa-se que o sedimento do viveiro apresentou maior população de coliformes totais e termotolerantes do que a água. Microrganismos podem ser encontrados no fundo dos viveiros, uma vez que os grãos do sedimento oferecem um microhabitat que promove a sobrevivência desses organismos (GHINSBERG et al., 1994). As bactérias se aderem às partículas do sedimento e encontram condições favoráveis de nutrientes (VILLAR et al., 1999), proteção contra a luz solar (SINTON, 2002) e contra a predação por protozoários (DAVIES et al., 2000). Presnell e Miescier (1971) relatam que, no sedimento, os coliformes apresentam baixas taxas de mortalidade, podendo sobreviver por períodos maiores que seis meses. A presença de microrganismos no sedimento torna esse componente do viveiro uma fonte de contaminação, já que a ressuspensão do sedimento pode aumentar a carga microbiana na coluna d' água e pode contaminar o camarão também devido ao fato de ser um animal bentônico, habitando o fundo dos viveiros e em constante contato com o sedimento. Tal fato pode ser observado na população de coliformes totais no sedimento e no músculo do camarão que não apresentaram diferença significativa.

Constatou-se também que não houve diferença significativa de coliformes termotolerantes entre a água do viveiro, superfície externa e trato gastrointestinal do camarão o que reflete na relação direta entre a presença desses microrganismos na água e nestas partes do camarão. Para *Staphylococcus* coagulase positiva não houve diferença estatística entre as amostras.

Do ponto de vista sanitário, a relação direta entre a presença de microrganismos no ambiente de criação e o trato gastrointestinal e superfície externa coloca o camarão como veículo de contaminação cruzada. O manuseio das partes não comestíveis, como exoesqueleto e vísceras contaminadas veiculam microrganismos para musculatura, equipamentos, ambiente de preparo e outros alimentos. Guzmán et al. (2004) afirmam que pode ocorrer a contaminação cruzada dos tecidos comestíveis do pescado pelo uso de utensílios mal higienizados. Hobbs e Roberts (1999) relatam que no ambiente de preparo do alimento, se os alimentos crus e cozidos forem preparados nas mesmas superfícies, usando os mesmos equipamentos e pelos mesmos manipuladores, os microrganismos podem se disseminar dos ingredientes crus para os alimentos prontos para serem consumidos. Portanto a separação de superfícies,

equipamentos e pessoal para alimentos crus e cozidos, lavagem das mãos regularmente, especialmente após manipular alimentos crus e boas medidas de higiene são essenciais para reduzir a contaminação cruzada de alimentos. Para evitar esse tipo de contaminação, além da lavagem do camarão, a retirada do cefalotórax e do trato intestinal na etapa de processamento do camarão é importante para reduzir significativamente a carga microbiana (HUSS, 1997). Jay (2005) ainda afirma que a evisceração do camarão previne a passagem de bactérias presentes no trato gastrointestinal para o músculo que pode ocorrer pela deterioração do estômago e intestino pela ação de enzimas proteolíticas. O mesmo autor ressalta que a retirada das vísceras requer cuidados, pois pode ocorrer o rompimento do intestino, promovendo o extravazamento do conteúdo intestinal que pode contaminar o músculo do camarão.

Na tabela 6 são apresentadas as médias dos números mais prováveis de coliformes totais, termotolerantes e população de *Staphylococcus* coagulase positiva das amostras de água, sedimento do viveiro, água de enxaguadura da superfície externa, músculo e trato gastrointestinal do camarão no período de seca e chuva.

Tabela 6. Médias dos números mais prováveis de coliformes totais (CT), coliformes termotolerantes (CTer) e população de *Staphylococcus* coagulase positiva (EST) das amostras de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE) do camarão, músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão no período de seca e chuva

	Período	Água (NMP ou UFC.100mL <sup>-1</sup> )	Sedimento (NMP ou UFC. mL <sup>-1</sup> )	SE (NMP ou UFC. mL <sup>-1</sup> )	Músculo (NMP ou UFC.g <sup>-1</sup> )	TG (NMP ou UFC. trato gastrointestinal <sup>-1</sup> )
CT	Seca	1,16 <sup>A</sup>	1,91 <sup>A</sup>	1,26 <sup>A</sup>	1,58 <sup>A</sup>	1,34 <sup>A</sup>
	Chuva	1,50 <sup>B</sup>	3,64 <sup>B</sup>	2,70 <sup>B</sup>	3,56 <sup>B</sup>	2,63 <sup>B</sup>
CTer	Seca	1,13 <sup>C</sup>	1,7 <sup>C</sup>	1,16 <sup>C</sup>	1,31 <sup>C</sup>	1,21 <sup>C</sup>
	Chuva	1,12 <sup>C</sup>	1,7 <sup>C</sup>	1,20 <sup>C</sup>	1,60 <sup>C</sup>	1,29 <sup>C</sup>
EST	Seca	1,06 <sup>D</sup>	3,90 <sup>D</sup>	4,83 <sup>D</sup>	1,00 <sup>D</sup>	1,0 <sup>D</sup>
	Chuva	1,20 <sup>D</sup>	1,20 <sup>D</sup>	2,33 <sup>D</sup>	1,00 <sup>D</sup>	2,71 <sup>D</sup>

\* Médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente, a nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

A localização dos viveiros e o período de colheita das amostras podem provocar variação da carga microbiana do viveiro e do camarão (NASCIMENTO et al., 2001). No presente estudo apenas os coliformes totais apresentaram diferença significativa entre os períodos de seca e chuva. No período das chuvas a água de escoamento superficial altera a qualidade microbiológica da água do ambiente de criação do camarão ao levar dejetos e matéria orgânica presentes na superfície de forma direta para o viveiro ou indiretamente, contaminando os corpos d'água que abastecem o viveiro. Segundo Franco e Landgraf (2008) os coliformes totais, além de estarem presentes nas fezes, podem ser encontrados em águas com altos teores de material orgânico, solo ou vegetação em decomposição. Desse modo o aumento da população desses coliformes totais na água ocorreu pelo carreamento dos coliformes presentes no ambiente para o viveiro. Na água, os coliformes totais têm a capacidade de sobreviverem e se multiplicarem com relativa facilidade (ZULPO et al., 2006). A mudança da qualidade da água do viveiro devido ao período de chuva se refletiu na qualidade microbiológica do sedimento e do camarão que também tiveram um aumento na população de coliformes totais.

Os coliformes termotolerantes não apresentaram diferença significativa entre os períodos de seca e chuva já que em seu entorno não havia grande quantidade de dejetos que pudessem ser levados ao viveiro pela água de escoamento superficial. No Brasil é comum que a carcinicultura seja uma atividade secundária em pequenas propriedades (PIE DADE et al., 2002). Caso a atividade principal seja a criação de animais na propriedade ou no seu entorno é necessário que o produtor tenha atenção quanto ao destino dos dejetos desses animais para evitar que a água de escoamento da chuva leve as fezes até os viveiros. A população de *Staphylococcus* coagulase positiva não apresentou diferença significativa, pois sua presença está mais relacionada à manipulação do que à sua presença no ambiente de criação.

Além do período de colheita das amostras, a temperatura também pode influenciar na variação de microrganismos na água. As colheitas no período de seca também eram os períodos que apresentaram menores temperaturas. Como os coliformes são microrganismos mesófilos, ou seja, com um desenvolvimento



ideal em temperaturas entre 25 e 40°C, a baixa temperatura da água pode ter comprometido a sua sobrevivência na água.

Os resultados obtidos neste estudo são similares aos resultados obtidos por Martins et al. (2002) que estudaram filé de tilápia e carpa eviscerada de seis pesque-pagues em Toledo - PR e observaram que no período frio houve redução da carga microbiana. O estudo de Machado et al. (2001), verificando a presença de coliformes em ostras na cidade de Cananéia - SP, encontrou poucas amostras em desacordo com a legislação no período mais frios e secos, entretanto em períodos mais quentes e chuvosos encontraram um maior número de ocorrências de resultados positivos.

Como os resultados obtidos mostram que o período mais chuvoso e com maiores temperaturas favorece o aumento na população de microrganismos no ambiente de criação e, por consequência, do camarão é necessário que nessa época o produtor esteja mais atento ao controle das condições microbiológicas dos viveiros.

A Tabela 7 apresenta os valores de correlação (R) para coliformes totais entre as amostras de água e sedimento do viveiro e a água de enxágüe da superfície externa, músculo e trato gastrointestinal do camarão, sendo que as amostras foram consideradas correlacionadas entre si quando apresentaram o valor de  $p < 0,05$ .

Tabela 7. Correlação do NMP de coliformes totais entre as amostras de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão.

Amostra		Água	Sedimento	SE	Músculo	TG
Água	R	1.00000	<b>0.44140*</b>	<b>0.53944*</b>	<b>0.39318*</b>	0.03905
	P		<b>0.0146</b>	<b>0.0021</b>	<b>0.0316</b>	0.8377
Sedimento	R	<b>0.44140*</b>	1.00000	<b>0.47128*</b>	<b>0.39423*</b>	0.08362
	P	<b>0.0146</b>		<b>0.0086</b>	<b>0.0311</b>	0.6605
SE	R	<b>0.53944*</b>	<b>0.47128*</b>	1.00000	0.48982	-0.03047
	P	<b>0.0021</b>	<b>0.0086</b>		0.0060	0.8730
Músculo	R	<b>0.39318*</b>	<b>0.39423*</b>	0.48982	1.00000	-0.06313
	P	<b>0.0316</b>	<b>0.0311</b>	0.0060		0.7403
TG	R	0.03905	0.08362	-0.03047	-0.06313	1.00000
	P	0.8377	0.6605	0.8730	0.7403	

\*Amostras que apresentaram correlação entre si

A água e o sedimento do viveiro apresentaram correlação entre si, demonstrando que é necessário estar atento à presença de microrganismos nestes dois componentes do viveiro, pois a contaminação um pode refletir na contaminação do outro. Como já foi exposto, o sedimento pode apresentar uma população maior de microrganismos, portanto esse componente do viveiro pode ser reconhecido como fonte significativa de poluição, já que a ressuspensão do sedimento faz com que os microrganismos ascendam à coluna d'água.

No camarão foi observada correlação da superfície externa com a água e o sedimento do viveiro, sendo maior a correlação desta parte do camarão com a água. Assim como no músculo também foi observada correlação com água e sedimento do viveiro, porém com o valor de correlação um pouco maior com o sedimento.

Estes dados permitem afirmar que há relação entre o ambiente de criação e o camarão, portanto a qualidade microbiológica dos viveiros pode influenciar na população de microrganismos do camarão. Desse modo, é de extrema importância adotar medidas preventivas a respeito da contaminação de viveiros para produção de um camarão de qualidade microbiológica.

A Tabela 8 apresenta os valores de correlação (R) para coliformes termotolerantes entre as amostras de água e sedimento do viveiro e a água de enxaguadura da superfície externa, músculo e trato gastrointestinal do camarão sendo que as amostras seriam consideradas correlacionadas entre si caso apresentassem o valor de  $p < 0,05$ .

Para os coliformes termotolerantes não foi encontrada correlação entre as amostras (Tabela 8). Tal fato ocorreu pela grande quantidade de amostras em que não foram detectados coliformes termotolerantes, não havendo, portanto, dados suficientes para estabelecer uma correlação entre a contaminação microbiológica das amostras.

Tabela 8. Correlação do NMP de coliformes termotolerantes entre as amostras de água e sedimento do viveiro e água de enxaguadura da superfície externa (SE), músculo e trato gastrointestinal (TG) do camarão.

Amostra		Água	Sedimento	SE	Músculo	TG
Água	R	1.00000	0.07237	-0.05267	-0.05531	0.13669
	P		0.7039	0.7822	0.7716	0.4714
Sedimento	R	0.07237	1.00000	0.00867	0.27461	-0.00270
	P	0.7039		0.9638	0.1419	0.9887
SE	R	-0.05267	0.00867	1.00000	0.19064	0.13682
	P	0.7822	0.9638		0.3129	0.4709
Músculo	R	-0.05531	0.27461	0.19064	1.00000	0.06775
	P	0.7716	0.1419	0.3129		0.7221
TG	R	0.13669	-0.00270	0.13682	0.06775	1.00000
	P	0.4714	0.9887	0.4709	0.7221	

Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores. Aguiar (2005) monitorou a água de cultivo e o camarão da espécie *L.vannamei* de fazendas experimentais em Barra do Sul - SC e notou que houve relação na variação da quantidade de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E.coli* na água e no camarão. Putro et al. (1990) relataram uma boa correlação entre o elevado número de coliformes totais e fecais ao analisar a água de tanques de cultivo, amostras de sedimento e camarão. Al-Harbi (2003) 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<sup>-1</sup> e  $2,37 \times 10^2$  a  $\geq 1,1 \times 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup> respectivamente, estavam correlacionados. Pagnocca et al. (1991) estudaram bactérias no intestino de camarões *Penaeus schimitti* e água da Baía de Sepetiba - RJ e notaram que a microbiota presente no intestino dos camarões era reflexo do nível de poluição do ambiente.

O presente estudo observou que a presença de microrganismos no viveiro se reflete no camarão, portanto é importante tomar medidas que garantam que o viveiro não esteja sujeito à contaminação por microrganismos patogênicos que possam vir a afetar a qualidade do camarão e trazer riscos à saúde do consumidor através da aplicação de manejo adequado visando à qualidade da água e a combinação de outros fatores durante a produção.

A disponibilidade de água de qualidade para abastecer os viveiros é o primeiro cuidado a ser tomado. Os corpos d' água estão cada vez mais sujeitos à contaminação por resíduos sólidos e agrícolas que podem conter microrganismos patogênicos (DIAS et al., 1999) e o uso desta água para criação de camarões compromete a qualidade microbiológica do camarão. A água do viveiro pode sofrer alterações microbiológicas ao longo do cultivo dos camarões dependendo do manejo adotado. O grande aporte de nutrientes nos viveiros contribui para multiplicação e manutenção de coliformes (VIEIRA et al., 2001). Entre os fatores que causam aumento de matéria orgânica no viveiro está o fornecimento de alimento, através de fezes e ração não consumida que acaba acumulando-se principalmente no sedimento. Na medida em que aumenta a densidade de estocagem, o aporte alimentar também se incrementa, podendo então deteriorar a qualidade da água e do solo (VINATEA, 1999).

A utilização de fezes de animais nos tanques de cultivo é uma prática utilizada por produtores que merece atenção. A finalidade da medida é que as espécies cultivadas se beneficiem dos efeitos da fertilização da água, e possam também se alimentar diretamente desses dejetos, obtendo um aproveitamento racional desses resíduos, os quais são transformados em biomassa de alto valor nutritivo e econômico, incrementando a produção (LOPERA et al., 2006), entretanto essa prática além de causar aumento do aporte de matéria orgânica na água, pode introduzir bactérias patogênicas nos viveiros caso estejam presentes nas fezes de animais. Segundo Koivunen et al. (2003) o tratamento dos dejetos é uma ferramenta que pode minimizar os riscos de contaminação por microrganismos patogênicos.

Por abrigar bactérias, o sedimento dos viveiros também tem grande influência na qualidade microbiológica tanto da água quanto do camarão. Para eliminação desses microrganismos deve ser realizado o tratamento do solo dos viveiros entre os povoamentos dos viveiros. Para isso o fundo do tanque é exposto ao sol que promove a secagem completa da camada superficial, o arejamento do solo e a oxidação da matéria orgânica residual, posteriormente é feita a aplicação de hipoclorito de cálcio que eliminam as bactérias pelo contato com o cloro e a aplicação de cal virgem (óxido de cálcio) ou cal hidratada

(hidróxido de cálcio) que causa aumento do pH do solo e conseqüentemente a morte dos microrganismos (ROCHA , 2004).

Os resultados desse trabalho evidenciam que a presença de microrganismos contaminantes no ambiente de criação pode refletir na qualidade microbiológica do camarão, trazendo um risco potencial à saúde do consumidor. Portanto o monitoramento da qualidade da água e a adoção de manejo correto na carcinicultura assumem grande importância para garantir a produção de camarões de qualidade, atendendo às exigências do mercado para comercialização e consumo.

## 6. CONCLUSÕES

- A água e o sedimento do viveiro e camarão apresentaram baixas populações de coliformes totais e termotolerantes, demonstrando condições higiênico-sanitárias satisfatórias;
- Não foram encontradas amostras de água e sedimento do viveiro e camarão com *Escherichia coli* patogênica e *Salmonella* spp., já para *Staphylococcus* coagulase positiva as mesmas apresentaram baixas populações;
- Apenas uma amostra de camarão apresentou população de *Staphylococcus* coagulase positiva acima do limite estabelecido pela legislação;
- Houve diferença na população de coliformes totais para todas as amostras entre os períodos de seca e de chuva, sendo encontrada maior população no período de chuva;
- Existe correlação entre da superfície externa do camarão com a água e sedimento do viveiro e entre o músculo do camarão com água e sedimento do viveiro para coliformes totais;
- O monitoramento da qualidade da água e a adoção de manejo correto na carcinicultura assumem grande importância para garantir a produção de camarões de qualidade microbiológica.

## 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.

AGUIAR, S.F.B. **Qualidade microbiológica no cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* e ação *in vitro* do probiótico EM – 4**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ALBUQUERQUE, W.F.; VIEIRA, R.H.S.F.; VIEIRA G.H.F. Isolamento de *Staphylococcus aureus* do gelo, água, bancadas e vendedores de pescado da feira do Mucuripe, Fortaleza, Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, n.3, p.299-303, 2006.

ALEXANDRINO, A.C. Prevenção de doenças em aquicultura. **Boletim técnico do Instituto de pesca**. n. 23, p.45, 1998.

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.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; PENTEADO, M. V. C. **Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2007.

AMSON, G. V., HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.1139-1145, 2006.

ANTONY, M.M., JEYASEKARAN, G.; SHAQUILA; R.J.; SHANMUGAM, S.A. Microbiological quality of raw shrimp processed seafood processing plants if Tuticorin, Tamil Nadu, India. **Asian Fisheries Science**. V.15 p.33-41, 2002.

APHA – American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd ed. Washington, DC, 1219 p, 1992.

APHA – American Public Health Association. **Standart methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. APHA, Washington. 1220 p, 1998.

APHA – American Public Health Association. **Compedium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4rd. ed., Ed. VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, APHA, Washington, D.C. 676p, 2001.

AYULO, A. M. R.; MACHADO, R. A.; SCUSSEL, V. M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. **International Journal Food Microbiological**, v.14, p.687-695, 1994.

BEIER, R.C; BISCHOFF, K.M.; ZIPRIN, R.L. Chlorhexidine susceptibility, virulence factors, and antibiotic resistance of beta-hemolytic *Escherichia coli* isolated from neonatal swine with diarrhea. **Bulletin of Environment Contamination Toxicology**, v. 75, n. 5, p. 835-844, nov, 2005.



BERSOT, L.S.; *Salmonella* no Brasil: sua importância o abate de aves. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 5., 2006. **Anais...** Santa Maria, RS, p. 90-94, 2006.

BRAGA, S.P.; GOMES, F.S.P.; SILVA, C.A.; SOUZA, S.E.L.; SOUSA, C.P. Bactérias heterotróficas, coliformes, leveduras totais e fermentativas e fungos filamentosos em água e camarão comercializado em João Pessoa – PB. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17, 2000, Fortaleza. **Resumos**. Fortaleza, v. 1, p. 4-80, 2000.

BRANDÃO, W.N. Beneficiamento de camarões marinhos. **Rede de Tecnologia da Bahia – RETEC/BA**, 25p., 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2001). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, Brasília. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em 22 de fev. de 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (2005). Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/>>. Acesso em 22 de fev. de 2010.

BRIDGER, C. J.; GARBER, A. F. Aquaculture escapement, implications and mitigation: the salmonid case study. In: COSTA-PIERCE, B. A. **Ecological Aquaculture the Evolution of the Blue Revolution**. Oxford, Blackwell Science, p. 77- 102, 2002.

BRITO, B.G.; LEITE, D.S.; LINHARES, R.E.; VIDOTTO, M.C. Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 65, n. 2, p. 123-132, mar., 1999.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, M.B.M.; CAMPOS, L.C.; GOMPERTZ, O.F.; RÁCZ, M.L. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 718p, 2005.

CARDOSO, N.L.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I. A técnica da membrana filtrante, aplicada ao estudo bacteriológico da água de rede de abastecimento, utilizado pela população de Descalvado, SP. **Higiene Alimentar**, v.15, n.82, p. 33-38, mar,2001.

CARMO, G. M. I.; OLIVEIRA, A. A.; DIMECH, C. P.; SANTOS, D. A.; ALMEIDA, M. G.; BERTO, L. H.; ALVES, R. M. S.; CARMO, E. H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, n.6, p. 02-07, 2005.

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**. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) Universidade Federal do Ceará. Ceará, 2006.

CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2138-2140, 2003.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.

CONBOY, M. J.; GOSS, M. J. Natural protection of groundwater against bacteria of fecal origin. **Journal of Contaminant Hydrology**. v. 43, p. 1-24, 2000.

CORREIA, M.; RONCADA, M. J. Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres da Cidade de São Paulo. **Revista Saúde Pública**. v.31, n. 3, p. 296-301, 1997.

CRUZ, M.; SÁNCHEZ, F. J. Rastreabilidade: variável estratégica para competitividade da empresa de aquicultura. In: CONGRESSO IBERO AMERICANO VIRTUAL DE AQUACULTURA, 2003, Vigo. **Anais eletrônicos**. Vigo: Universidade de Vigo, 2003.

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**, Campinas, v. 22, n. 3, Dez. 2002.

DALSGAARD, A.; HUSS, H.H.; H-KITTIKEEN, A.; LARSEN, J.L. Prevalence of *Vibrio cholera* and *Salmonella* in major shrimp production area in Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v.28. p.101-113, 1995.

DAVIES, C.M.; BAVOR, H.J.; The fate of stormwater associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems. *Journal of Applied Microbiology*.;v.892, p.349, 2000.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, n.1, p.28–34, 2005.

DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA. Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado: seguimento de mercado. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA/SARC/ DPA.CNPq. 276 p, 2001.

DESMARCHELIER, P.M.; GRAU, F.H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, A.D., ARNOLD, G., JENSON, I., NEWTON, K. AND SUTHERLAND, P. **Foodborne Microorganisms of Public Health Significance** .5 ed. C.7 p. 231–264. Sydney, NSW: Trenear Printing Service Pty Limited, 1997.

DIAS, M. C. O.; **Manual de impactos ambientais: orientações básicas sobre aspectos de atividades produtivas**. Fortaleza: Banco do Nordeste, 158p, 1999.

DUARTE, D.A.M.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS A.M.M.; SILVA, J.V.D.; ANDRADE, P.L.A., SANTANA, A.A.P. Ocorrência de *Salmonella* spp. E *Staphylococcus* coagulase positiva em pescados no nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.711-713, out./dez., 2010.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; VIEIRA, R. H. S. F.; Investigação sobre possíveis portadores de *Staphylococcus aureus* em duas indústrias de pesca. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n.104/105, p.49-57, 2003.

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS/UNESP. Estação agroclimatológica. Disponível em< <http://fcav.unesp.br/#1244,1975>>. Acesso em 30 de maio de 2012.

FARIAS, M. C. A.; **Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado beneficiado em indústrias paraenses e aspectos relativos à exposição para consumo em Belém-Pará**. Dissertação (Mestrado em saúde animal) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

FELDHUSEN, F.; The role of seaffod in bacterial fodborne diseases. **Microbes and infection**, Paris, v.2, p.1.651-1.660, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The state of world fisheries and aquaculture**, Roma, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 20 fev 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), Roma, 2010a. **FIGIS Fisheries Statistics – Aquaculture** Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 20 fev 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FIGIS – Fisheries Statistics: Global Aquaculture Production: online query**. FAO, Roma, 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 15 fev. 2012.

FORSYTHE, S. J.;. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Atmed. 424 p., 2002.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 182 p., 2008.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; LUTHY J. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 10, n.1, p. 31-34, 1990.

GELDREICH E. E. The bacteriology of water. In: **Microbiology and microbial infections**. 9<sup>o</sup> ed., London: Arnold, 1998.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2003.

GEUS, J. A. M.; LIMA I. A. Análise de Coliformes Totais e Fecais: Um Comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes. In: ENCONTRO DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA DOS CAMPOS GERAIS, 2, 2008. Disponível em: <[www.pg.cefetpr.br/.../12%20ANALISE%20DE%20COLIFORMES %20TOT](http://www.pg.cefetpr.br/.../12%20ANALISE%20DE%20COLIFORMES%20TOT)>. Acesso em: 29 mar 2012.

GHINSBERG, R.C.; LEIBOWITZ, P.; WITKIN, H.; MATES, A.; SEINBERG, Y.; BAR, D.L.; NITZAN, Y., ROGOL, M. Monitoring of selected bacteria and fungi in sand and seawater along the Tel Aviv coast. **Microbios**, n.77, p. 29-40, 1994.

GILLIGAN, P.H.; *Escherichia coli*: EAEC, EHEC, EIEC, ETEC. **Clinical Laboratory Medical** v.19, n. 3, p. 505-521, 1999.

GIOVA, A. T.; **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.

GOMES, L, V; CAVALCANTE, P.R.S.; IBAÑEZ, M.S.R; SILVA, R.N.M.; SILVA, M.N.S.; Avaliação de parâmetros físicos e químicos da água e colimetria em água e pescado da Laguna de Jansen (São Luís-MA) In: Associação Brasileira de Engenharia Sanitaria e Ambiental. Saneamento ambiental Brasileiro: Utopia ou realidade? Rio de Janeiro, ABES, 2005.

GUIMARÃES, A.G.; LEITE . C.C.; TEXEIRA , L .D.S.; SANTANNA , M .E. B.; ASSIS, P.N. Detecção de *Salmonella* spp.em pacientes e manipuladores envolvidos em um surto de infecção alimentar. Infecção alimentar. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador. v.2,n.12, p.1-4 , jan. 2001.

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

HATHA, A. A. M.; MAQBOOL, T. K.; KUMAR, S. S. Microbial quality of shrimp products of export trade produced from aquacultured shrimp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 213-221, 2003.

HATHA, A. A. M.; RAO, N. P. B. Bacteriological quality of individually quick-frozen (IQC) raw and cooked ready-to-eat shrimp produced from farm raised black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Food Microbiology**, v. 15, p. 177-183, 1998.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos**. São Paulo, Varela, 1999.

HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M.; FÁZIO, M.L.S. Levantamento da Qualidade Higiênico – Sanitária do Pescado comercializado na Cidade de São José do Rio Preto, SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo.v.14, n. 64, p. 45 - 47, set. 1999.

HUSS, H.H. Garantia de qualidade dos produtos da pesca. FAO documento técnico da pesca, n.334, 176p. Roma, 1997. Disponível em: [www.fao.org/DOCREP/003/T1768P/T1768P00.HTM](http://www.fao.org/DOCREP/003/T1768P/T1768P00.HTM).> Acesso em 20 mar 2012.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed. 711p., 2005.

KAPER, J. B.; NATARO, J. D.; MOBLEY, H. L. T.; Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**. v. 2, p. 123-139, 2004.

KOIVUNEN, J., SIITONEN, A.; HEINOEN-TANSKI, H. Elimination of enteric bacteria biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. **Water research**. v. 37, p.690-698, 2003.

KUHNERT, P., BOERLIN, P., FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolated from water, food and environment. **FEMS Microbiological Review** v.24, p.107-117. 2000.

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

LIMA, M.G.; REIS, R.B. Incidência de *Salmonella* spp. Comparação entre metodologias de detecção em amostras de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) de rio e cultivado comercializadas no município de Cuiabá-MT. **Higiene Alimentar**. V.16, n.101. p. 43-49, out.2002.

LOPERA, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH1, J.A.; VARGAS, L.; STREIT JR., D.P. Semi-intensive tilapia culture in reservoirs: alternatives for the fertilization and production - review. **Arquivo de ciências veterinárias e zoologia**, v. 9, n. 1, p.67-76, 2006.

LORTIE, L.A.; DUBREUIL, J.D.; HAREL, J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 656–659, 1991.

LYNCH, M. Surveillance for foodborne-disease outbreaks: United States, 1998-2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 55, n. 10, p. 1 - 34, nov. 2006.

MACEDO, J. A. B. **Doenças de Veiculação hídrica e Alimentar**. Minas Gerais: CRQ. 43p., 2007.



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

MACIEL, C. R.; VALENTI, W. C. Biology, Fisheries, and Aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: A Review. **Nauplius**, v. 17, n. 2, p. 61-29.,2009.

MANNING, S. D.; MOTIWALA, A. S.; SPRINGMAN, A. C.; QI, W.; LACHER, D. W.; OUELLETTE, L. M.; MLADONICKY, J. M.; SOMSEL, P.; RUDRIK, J. T.; DIETRICH, S. E.; ZHANG, W.; SWAMINATHAN, B.; ALLAND, D.; WHITTAM, T. S. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.105, n.12, p.4868-4873, 2008.

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

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**.4ed. Washigton, APHA, p. 331-341, 2001.

MORAES-RIODADES, P. M. C.; VALENTI, W. C. Morphotypes in male amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture**, v.236, n.1-4, p.297-307 2004.

MORAES-VALENTI, P.; VALENTI, V. C. Culture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M. B.; VALENTI, W. C.; TIDWELL, J. H.; D'ABRAMO, L. R.; KUTTY, M. N. **Freshwater Prawns; Biology and Farming**. Wiley-Blackwell, p. 485-501, Oxford, 2010.

MOURA, A.F.P.; MAYER B.D.M .; LANDGRAF.M.; TENUTA,F.A. Qualidade química e Microbiológica de Camarão Rosa Comercializado em São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo. v.3, n.39,p.23-28, abril/jun.2003.

NASCIMENTO, A.R., JESUS, J.R., PEREIRA, M.S.S. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e bactérias mesófilas em camarão fresco e carne moída comercializados em São Luis-MA **Caderno Pesquisa**, São Luís, v. 10, n. 1, p. 9-18, jan./jun. 1999.

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 (São Luís, Maranhão), de peixes e sururus capturados em suas águas. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 84, p. 59-66, maio 2001.

NASCIMENTO, F. C. A. Aspectos sócio-econômicos das doenças veiculadas pelos alimentos. **Nutrição em pauta**, n. 40, p.22 -26, 2000.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, USA, v.11, n. 1, p. 142-201, jan., 1998.

NEW, M. B. 2010. History and Global Status of Freshwater Prawn Farming. In: NEW, M. B.; VALENTI, W. C.; TIDWELL, J. H.; D'ABRAMO, L. R.; KUTTY, M. N. (Eds.). **Freshwater Prawns; Biology and Farming**. Wiley-Blackwell, Oxford, p. 1-11.

NGELEKA, M.; PRITCHARD, J.; APPELYARD, G.; MIDDLETON, D. M.; FAIRBROTHER J. M. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 242–252, 2003.

NOTERMANS, S.; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A. H. Existing and emerging foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, n.34, p.197-205, 1992.

NOVOTNY, V.; OLEM, H. **Water quality: Prevention, Identification and Management of diffuse pollution**, New York: Van Nostrand Reinhold, 1993.

OLIVEIRA, M.C; ARAÚJO, N.K.S.; CASTRO, A.A. Estudo do efeito de temperaturas de congelamento e criocongelamento na estrutura física dos camarões (*Litopenaeus vannamei* Boone) comercializados nos supermercados da cidade de Aracaju-SE. **Scientia plena**, v.7,n.5, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Food safety and foodborne illness. 2007 Disponível em< [www.who.int](http://www.who.int).> Acesso em: 15 jan. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Several foodborne diseases are increasing in Europe**. Copenhagen, 2003.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales: bacteriosis y micosis. **Publicación científica y técnica**. 3. ed., v. 1, n. 580, p. 240-253, 2003.

PAGNOCCA, F. C.; MENDONÇA-HANGLER, L. C. S.; HANGLER, A. N; Heterotrophic Bacteria Associated With The Shrimp *Penaeus schmitti*, Sediment And Water Of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de microbiologia**, v. 22, n. 3, p. 247-252, 1991.

PIEIDADE, R. K.; NEVES, M.F; SANTOS, M. J. M. Caracterização da Rede Produtiva do Camarão de Água Doce no Brasil. In: Anais do XL Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural - SOBER, "Equidade e Eficiência na Agricultura Brasileira", Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, 2002.

PINTO, C. V. **Avaliação da qualidade do pescado fresco comercializado no comercio varejista no município de São Gonçalo, RJ.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2005.

PRESNELL, M.; MIESCIER, J.; Coliforms and fecal coliforms in an oyster growing area. *Journal of Water Pollution Control Federation*, v.43, n.3, p.407-416, 1971.

PUTRO, S.; ANGAWATI, A. M.; FAWZYA, Y. N.; ARIYANI, F.; Studies on the microbiology of farmed shrimp *FAO Fisheries Report*, v. 401, p. 6-17, 1990.

RANGEL, P.M. **Perfil genetic e microbiológico de cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite mastício bovino.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia agropecuária) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

RANTHUM, M. A. **Subnotificação e Alta Incidência de Doenças Veiculadas por Alimentos e de seus Fatores de Risco: causas e conseqüências no município de Ponta Grossa – PR.** Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Ponta Grossa-PR, Ponta Grossa, 2002.

REILLY, A.; KAFERSTEIN, F. Food safety and products from aquaculture. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement.** Oxford, v.85, p.249-257, 1999.

REIS, A.J.; HOFFMANN, P.; MARCOS, M.L.; TADEI, G.F.; GONÇALVES, M.V.T.; Estudo higiênico-sanitária dos camarões dulcícolas *Macrobrachium amazonicum* Jelskii. **Higiene Alimentar**; São Paulo, v. 18, n.116/117.p.50 - 53, jan. /fev.2004.

RIEDEL, G.; **Controle sanitário de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 320p., 1992.

ROCHA, I. P.; FONSECA, C. Cartilha de boas práticas de manejo na fazenda para prevenir e controlar enfermidades do camarão *Litopenaeus vannamei* no Brasil. Recife: ABCC, 28 p, 2004.

ROSA, R; NUNEZ, M.L. Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.84, p.89-94, 2003.

SANTOS, C. A. M. L. A qualidade do pescado e a segurança dos alimentos. In: **Simpósio de Controle do Pescado**, 2, 2006.

SANTOS, E.B.; **Avaliação bacteriológica e físico química do camarão cru, descascado e resfriado**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2011.

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIC, S.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 701-705, 1995.

SHERE, J.A., BARTLETT, K.J., KAPER, C.W.; Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms Wisconsin. **Applied Environmental Microbiology**, v.64 p.1390- 1399, 1998.

SILVA JUNIOR, E. A.; **Contaminação microbiológica como indicadora das condições higiênico-sanitárias de equipamentos e utensílios de cozinhas industriais, para determinação de pontos críticos de controle.** Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

SINTON, L.W.; HALL, C.H.; LYNCH, P.A.; DAVIES-COLLEY, R.J.; Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. **Applied Environmental Microbiology**.;v.68p .1122-1131, 2002.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos.** Brasília: EMBRAPA, 159p. 1995.

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

STROHL, W. A.; ROSE, H.; FISHER, B. D. Bacilos Entéricos Gram-Negativos in: **Microbiologia Ilustrada.** 1 ed. Porto Alegre: Art Méd, p. 189-204, 2004.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia.** 5. ed. São Paulo: Atheneu, 760p., 2008.

TREVISAN, A. B. ; MELO, M. B. P. C. ; MACEDO, V. P. ; SILVA, J. M. S. ; SILVA, R. V. ; SANTOS, D. N. ; ANDRADE, S. S. ; RAMOS, I. ; FERNANDES, L.M.B ; DA SILVA, M. C. A. Pesquisa de coliformes e enterobactérias em camarão seco salgado defumado comercializado no estado da Bahia. In: 38° Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária - Conbravet, 2011, Florianópolis - SC. **Anais do 38° Conbravet**, 2011.

VIEIRA, R. H. S. F.; SILVA, A. I. M.; SOUSA, O. V.; HOFER, E.; VIEIRA, G. H. F.; SAMPAIO, S. S.; LIMA, E. A. Análise experimental sobre a viabilidade de *Escherichia coli* em água do mar. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 34, p. 43-48, 2001.

VIEIRA, R.H.S.F.; **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela. 380p., 2004.

VILLAR, C.D.E.; CABO, L.; VAITHIYANATHAN, P.; BONETTO, C. Porewater N and P concentration in a floodplain marsh of the Lower Parana River. **Hydrobiologia**, v. 392, p.65-71, 1999.

VINATEA, L. A. A. Aquicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aquicultura brasileira. Florianópolis: Ed. Da UFSC, 1999.

ZULPO, D.L.; PERETTI, J.; ONO, L.M.; GARCIA, J.L. Avaliação microbiológica da água consumida nos bebedouros da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 107-110, jan./mar. 2006.