



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Roberta Juliano Ramos

**MONITORAMENTO BACTERIOLÓGICO DE ÁGUAS DO MAR E DE
OSTRAS (*Crassostrea gigas*) EM ÁREAS DE CULTIVO NA BAÍA SUL
DA ILHA DE SANTA CATARINA**

Florianópolis - SC

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**MONITORAMENTO BACTERIOLÓGICO DE ÁGUAS DO MAR E DE
OSTRAS (*Crassostrea gigas*) EM ÁREAS DE CULTIVO NA BAÍA SUL
DA ILHA DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Dra. Cleide Rosana Vieira Batista

Roberta Juliano Ramos

Florianópolis-SC

2007

**MONITORAMENTO BACTERIOLÓGICO DE ÁGUAS DO MAR E DE
OSTRAS (*Crassostrea gigas*) EM ÁREAS DE CULTIVO NA BAÍA SUL
DA ILHA DE SANTA CATARINA**

Por

ROBERTA JULIANO RAMOS

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela Comissão formada por:

Presidente: _____

Profa. Dra. Cleide Rosana Vieira Batista (UFSC)

Membro: _____

Dr. Felipe Matarazzo Suplicy (SEAP/PR)

Membro: _____

Prof. Dr. Jaime Fernando Ferreira (UFSC)

Coordenadora: _____

Profa. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz (UFSC)

Florianópolis, junho de 2007.

*Aos meus pais, Celina e Sérgio,
ao meu amor Taylor e minha filha Carolina, dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Cleide Rosana Vieira Batista, pelas oportunidades, apoio, amizade, e confiança, que permitiram um crescimento profissional e pessoal nestes dois anos de convívio.

À Associação de Maricultores do Sul da Ilha - AMASI, pela parceria e colaboração em todas as etapas deste trabalho.

Aos maricultores da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, em especial ao Néelson Silveira Jr. e ao Fábio Faria Brognoli, pela disponibilidade, pelas informações prestadas, permitindo a realização desta pesquisa.

À EPAGRI, pelo envio dos dados pluviométricos diários na região da Grande Florianópolis.

A UFSC, pela oportunidade concedida para o aprimoramento da minha formação acadêmica.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, e pelo financiamento desta pesquisa.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação, por serem parte fundamental na aquisição de conhecimentos indispensáveis para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Ogliari, pela orientação na parte estatística deste trabalho.

Aos integrantes da banca, Dr. Felipe Matarazzo Suplicy e Prof. Dr. Jaime Fernando Ferreira, pelas importantes contribuições a este trabalho.

Ao secretário do PGCAL, Sérgio de Sousa, e demais funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC pela amizade e bons momentos vividos.

A minha “pupila” Renata, pelo apoio incondicional durante todo desenvolvimento desta pesquisa, com responsabilidade e amizade.

Aos estagiários: Ana Cristina, Letícia, Luiz Fernando, Gisele, Fernanda Junkes e Nanda, por toda colaboração indispensável à realização desta pesquisa, e pelos bons momentos vividos no laboratório.

As monitoras Gisele, Mirelle e Júlia pelo apoio na realização das análises e pelos bons momentos de convívio.

A todos os colegas do Programa de Pós-graduação, em especial à Tatiana, Sabrina, Bianca, Renata, Janaína, Jefferson e Murilo, pelo apoio e por tornar ainda mais prazerosa a convivência no Departamento.

Aos amigos Priscila, Sandro, Renata, Deco, Kica e Karina pelos bons momentos vividos durante este período. E aos amigos que mesmo distantes, se fizeram presentes em todos os momentos.

Ao meu Dindo Roberto Juliano e Cris, por toda força e incentivo que recebi no decorrer destes dois anos.

Aos meus pais, Celina e Sérgio, minha avó Lorena, meus irmãos, Octavio e Sérgio Jr., e toda minha família pelo incentivo, amor, torcida, e pela compreensão dos longos períodos de ausência.

Ao Taylor, pelo amor, dedicação e incentivo que me deram suporte para realizar este trabalho.

À minha filha Carolina, por existir em minha vida, servindo de estímulo na busca do crescimento, tanto profissional como espiritual.

A Deus.

RAMOS, ROBERTA JULIANO. Monitoramento bacteriológico de águas do mar e de ostras (*Crassostrea gigas*) em áreas de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina.

RESUMO

A segurança do consumidor de moluscos bivalves, como as ostras, depende da sanidade destes a qual, por sua vez, depende das condições físicas, químicas e microbiológicas do ambiente de origem, do manuseio e tecnologia pós-captura, bem como da existência de legislação adequada, que se baseie na fiscalização de todas as etapas de produção. Esta pesquisa teve por objetivo monitorar a qualidade bacteriológica das águas onde os moluscos são cultivados e de ostras (*Crassostrea gigas*) em seis diferentes regiões de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, por um período 12 meses, totalizando 15 coletas. Nas águas foram realizados ensaios microbiológicos para contagens de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C, e de *Escherichia coli*. Na carne das ostras, além dos ensaios realizados nas águas, foram realizadas contagens de *Vibrio spp.*, Estafilococos coagulase positivo, além de detecção de *Salmonella spp.* Embora as contagens tenham ficado abaixo dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira, foram encontradas correlações positivas entre contagens de coliformes a 35°C, 45°C e *E. coli* nas águas onde são cultivadas, e na carne das ostras. Foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as contagens de coliformes a 45°C nas amostras de águas onde são cultivadas as ostras provenientes da região mais contaminada (Barro Vermelho) e das regiões menos contaminadas (Caieira da Barra do Sul e Costeira do Ribeirão). Os parâmetros físico-químicos apresentaram pouca ou nenhuma correlação estatística com as contagens bacteriológicas realizadas nas águas onde os moluscos são cultivados, no entanto foi encontrada uma correlação positiva significativa entre a temperatura destas águas e a incidência de *Vibrio spp.* na carne dos moluscos. Considerando a Baía Sul como um todo, foi possível observar a influência do índice pluviométrico nas contagens bacteriológicas obtidas nas águas e conseqüentemente nas ostras, sendo que as maiores contagens de coliformes a 35°C, 45°C e *Escherichia coli* nas águas, e de *Escherichia coli* nas ostras, foram observadas no mês de novembro 2006, mesmo mês em que foram registrados os maiores acumulados pluviométricos, tanto mensal quanto na semana anterior a coleta. Os resultados encontrados, tanto para águas onde os moluscos são cultivados quanto para as amostras de ostras estão de acordo com os parâmetros descritos na legislação brasileira, estando todas as regiões aptas para o cultivo de moluscos bivalves. Contudo, ressalta-se a importância da implantação de saneamento básico em regiões de cultivo de moluscos bivalves, assim como o monitoramento bacteriológico constante de indicadores de qualidade, tanto nas águas onde os moluscos são cultivados, como nos moluscos, além do desenvolvimento de programas de qualidade para a cadeia produtiva de moluscos bivalves.

Palavras chave: ostras, qualidade bacteriológica, monitoramento, *Crassostrea gigas*.

RAMOS, Roberta Juliano. **Bacteriological monitorament of sea waters and oysters (*Crassostrea gigas*) in culture's areas located in the South Bay of Santa Catarina's Island**. 2007. 116 p. Dissertation (Master on Food Science). Santa Catarina's Federal University. Florianópolis, Santa Catarina.

ABSTRACT

The security of bivalve mollusks (as oysters) consumer, depends on their sanity, which in turn, depends on physical, chemical and microbiological conditions of the origin environment, their manuscript and after- capture technology as well as the existence of adequate legislation with bases on the fiscalization of all the production stages. This research had as its aim to monitor the bacteriological quality of water where the mollusks and oysters are cultivated in six different regions of the South Bay of Santa Catarina's Island, for a 12-month period, totalizing 15 collections. There were made microbiological assays in these waters in order to perform coliforms and *Escherichia coli* count at 35°C and at 45°C. For the oysters meat analysis, beside the water culture assays performed, there were also carried through, *Vibrio spp* counts, coagulase-positive Staphylococcus count and *Salmonella sp* detection. Although the count had been less than the maximum limit established by Brazilian legislation, there were found positive correlations between coliforms count at 35°C, at 45°C and *E. coli* in the waters where the culture is made and in the oysters meat. There were observed significant statistical differences between the coliforms count at 45°C in the water samples, where the oyster are cultivated, proceeding from the most contaminated region, Barro Vermelho, and the less contaminated regions Caieira da Barra do Sul and Costeira do Ribeirão. The physical-chemical parameters had presented few or none statistical correlation with the bacteriological counts performed in the waters where the mollusks are cultivated in, however a positive significant correlation was found between the temperature of culture waters and the incidence of *Vibrio spp*. in the oysters' meat. Considering the South Bay as a whole, it was possible to observe the rainfall level influence at the bacteriological counts obtained at waters and consequently at the oysters, considering that the highest coliforms at 35°C, at 45°C counts and *Escherichia coli* in the culture waters and *Escherichia coli* in the oysters had been observed in november 2006, exactly month where there had been registered the highest rainfalls accumulated, such as monthly as in the previous week of the collection. The found results, as well as for the waters where the mollusks are cultivated in and such for the oysters samples are in accordance with the parameters described by the Brazilian legislation, and so, being all the regions safe for the culture of bivalve mollusks. However, importance of the basic sanitation in regions of bivalve mollusks culture is standed out as well as the constant bacteriological monitorament of quality indicators, such as for the culture water as for the cultivated oysters, besides the development of quality programs for the productive chain of bivalve mollusks.

Key words: oysters, bacteriological quality, monitorament, *Crassostrea gigas*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais países envolvidos com a produção de ostras (<i>Crassostrea gigas</i>).....	20
Figura 2 - Produção de ostras em Santa Catarina.....	23
Figura 3 - Concha de ostra <i>Crassostrea gigas</i>	24
Figura 4 - Pássaros marinhos pousados sobre estrutura de mesa em cultivo de moluscos bivalves.	29
Figura 5 - Pontos de coleta nas seis diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina	40
Figura 6 – Temperatura da água nas seis regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina nas quinze coletas realizadas.	50
Figura 7 - Salinidade nas seis regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina nas quinze coletas realizadas.	51
Figura 8 - Turbidez nas seis regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina nas quinze coletas realizadas.	52
Figura 9 - Correlação bivariada entre contagens de coliformes a 45°C nas águas da Baía Sul e acumulado pluviométrico mensal na região da grande Florianópolis.	56
Figura 10 - Correlação bivariada entre contagens de coliformes a 45°C nas águas da Baía Sul e acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta na região da grande Florianópolis.	56
Figura 11 - Correlação entre as contagens de coliformes a 35°C e 45°C nas águas onde os moluscos são cultivados da Baía Sul.	57
Figura 12 - Acumulado pluviométrico mensal na região da grande Florianópolis.	60
Figura 13 - Acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta na região da grande Florianópolis.....	61

Figura 14 - Correlação entre as contagens de coliformes a 35°C e 45°C nas ostras provenientes de cultivos da Baía Sul.....	66
Figura 15 - Correlação entre as contagens de coliformes a 45°C e <i>E. coli</i> nas ostras provenientes de cultivos da Baía Sul.....	69
Figura 16 - Correlação entre incidência de vibrios nas ostras e temperatura das águas onde são cultivadas.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência de coliformes a 35°C durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.....	53
Tabela 2 - Incidência de coliformes a 45°C nas águas durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.....	55
Tabela 3 - Correlações entre coliformes a 35 e 45°C nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.....	57
Tabela 4 - Ocorrência de <i>E. coli</i> . em águas onde os moluscos são cultivados de diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.	58
Tabela 5 - Contagens de <i>Escherichia coli</i> durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.	59
Tabela 6 - pH nas amostras de ostras, segundo as diferentes estações do ano.....	62
Tabela 7 - Contagens de coliformes a 35°C nas ostras durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.....	63
Tabela 8 - Contagens de coliformes a 45°C nas ostras durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.....	65
Tabela 9 - Contagens de <i>Escherichia coli</i> nas ostras durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.....	67
Tabela 10 - Ocorrência de <i>E. coli</i> em amostras de ostras provenientes de diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.....	67
Tabela 11 - Contagens mínimas e máximas de estafilococos coagulase-positivos nas amostras de ostras das diferentes regiões.	69
Tabela 12 - Correlações entre parâmetros físico-químicos da água de cultivo e contagens estafilococos coagulase positivo.....	70

Tabela 13 – Distribuição de diferentes espécies de vibrios em amostras de ostras contaminadas por *Vibrios spp* provenientes de seis regiões de cultivo da Baía Sul.....71

Tabela 14 - Número de cepas de diferentes espécies de vibrios isoladas de ostras provenientes das diferentes regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina entre março 2006 e fevereiro 2007.....72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escala de pH para determinação da qualidade microbiana de ostras.....	27
Quadro 2 - Profundidade nos seis diferentes pontos de coleta geo-referenciados.	41

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS.....	19
2.1.	Objetivo Geral	19
2.2.	Objetivos específicos	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1.	Ostreicultura em Santa Catarina.....	20
3.2.	Caracterização da ostra <i>Crassostrea gigas</i>	23
3.3.	Aspectos gerais da Microbiologia de Moluscos Bivalves	26
3.4.	Microrganismos indicadores de qualidade da água de cultivo	30
3.5.	Parâmetros físico-químicos de águas onde os moluscos são cultivados.....	33
3.6.	Consumo de ostras e saúde pública	34
3.7.	Controle de qualidade em cultivos de ostras	37
3.7.1.	Seleção da área de cultivo.....	38
3.7.2.	Controle de qualidade.....	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1.	Área de estudo	40
4.2.	Eleição e caracterização dos pontos de coleta.....	40
4.3.	Parâmetros físico-químicos da água de cultivo	41
4.4.	Coleta de amostras	42
4.4.1.	Ostras	42
4.4.2.	Água de cultivo	42
4.4.3.	Preparo e diluições das amostras.....	43
4.5.	Análises microbiológicas de água de cultivo	43
4.5.1.	Coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i>	44
4.5.2.	Classificação das áreas de cultivo	44
4.6.	Índice pluviométrico	44
4.7.	Determinação do pH das ostras	45

4.8.	Análises microbiológicas de ostras.....	45
4.8.1.	Coliformes a 35°C, coliformes 45°C e <i>Escherichia coli</i>	45
4.8.2.	Estafilococos coagulase positivo.....	46
4.8.3.	<i>Salmonella spp.</i>	46
4.8.4.	<i>Vibrio spp.</i>	46
4.9.	Análise estatística dos dados	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1.	Água de cultivo	49
5.1.1.	Análises físico-químicas	49
5.1.1.1.	Temperatura.....	49
5.1.1.2.	Salinidade.....	50
5.1.1.3.	Turbidez.....	51
5.1.1.4.	pH	52
5.1.2.	Análises microbiológicas.....	53
5.1.2.1.	Coliformes a 35°C	53
5.1.2.2.	Coliformes a 45°C	54
5.1.2.3.	<i>Escherichia coli</i>	58
5.1.2.4.	Classificação das águas onde os moluscos são cultivados	59
5.2.	Índice pluviométrico	60
5.3.	Ostras	61
5.3.1.	Análises físico-químicas	61
5.3.1.1.	pH	61
5.3.2.	Análises microbiológicas.....	62
5.3.2.1.	Coliformes a 35°C	62
5.3.2.2.	Coliformes a 45°C	64
5.3.2.3.	<i>Escherichia coli</i>	66
5.3.2.4.	Estafilococos coagulase positivo	69
5.3.2.5.	<i>Salmonella spp.</i>	70

5.3.2.6. <i>Vibrio spp.</i>	71
6. CONCLUSÕES	76
6.1. Recomendações.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICE A	86
APÊNDICE B	102

1. INTRODUÇÃO

A aqüicultura como atividade economicamente emergente no Brasil, apesar de sua origem milenar, encontra-se hoje diante do desafio de moldar-se ao conceito de sustentabilidade, incorporando as dimensões sociais, econômicas e ambientais. A garantia da sustentabilidade dependerá das condições locais, incluindo recursos, atividades econômicas, políticas, ações individuais, além das características particulares de cada comunidade (VALENTI *et al*, 2000).

Face ao grande declínio dos recursos pesqueiros costeiros, ocasionado principalmente pela intensa exploração, aliada à degradação ambiental, os mexilhões e as ostras garantem a subsistência de parte da população ligada à pesca artesanal, tanto em termos de consumo como de comércio, em vários estados litorâneos brasileiros (VALENTI *et al*, 2000).

A ostra do Pacífico ou ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) foi introduzida no Brasil, no ano de 1974, quando as primeiras importações de sementes de ostras foram realizadas pelo Instituto de Pesquisas Marinha em Cabo Frio, RJ. Embora não se conheçam relatos bibliográficos capazes de explicar a razão pela qual esta espécie foi importada, acredita-se que “seria utilizada para a formação de bancos naturais e a criação de uma alternativa de renda para os pescadores artesanais”, tentativa que não teve sucesso, pois a mesma parece não desovar em ambiente natural (POLI *et al*, 2004).

O cultivo de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) teve seu início no Estado de Santa Catarina em 1983, a partir da introdução de sementes produzidas no Chile. Entre seus produtores encontram-se tanto pessoas com ligação anterior com a pesca, como outras que foram atraídas pela perspectiva de boa rentabilidade, além de produtores de mexilhão que buscam uma nova alternativa de produção (SOUZA FILHO, 2003).

A maricultura tem sido amplamente praticada no Estado de Santa Catarina, devido às condições climáticas favoráveis desta região, com temperatura da água em torno de 15°C durante o inverno, e a qualidade geográfica da região, com a presença de grande número de Baías que facilitam o cultivo dos moluscos bivalves nas fazendas marinhas (COELHO *et al*, 2003).

Todavia, apesar do inegável potencial sócio-econômico contido nestas experiências, o atual padrão de desenvolvimento acelerado e intensivo das práticas de maricultura no Estado não está isento de riscos, dentre os quais, a ameaça à saúde pública pelo fato dos cultivos serem realizados na ausência de um sistema realmente eficaz de monitoramento da qualidade das águas e dos produtos cultivados (CURTIUS *et al*, 2003).

Deve-se levar em conta que a qualidade da água varia de acordo com inúmeros parâmetros ambientais como marés, precipitação pluviométrica, frentes frias e sazonalidade, e também devido ao fluxo de pessoas para as regiões litorâneas, havendo despejos de esgotos domésticos em maior quantidade na orla marítima (LENOCH, 2003).

A tarefa de se estabelecer normas para a produção e consumo de moluscos não é simples, especialmente quando se considera que o país não tem tradição como produtor deste alimento, além do fato de que o consumo de moluscos pode representar sérios riscos à saúde pública, uma vez que os mesmos refletem diretamente as condições do ambiente em que se encontram. A segurança do consumidor de moluscos bivalves depende da sanidade destes, a qual por sua vez depende das condições físicas, químicas e microbiológicas do ambiente de origem, do manuseio e tecnologia pós-captura, bem como da existência de legislação adequada, que se baseie na fiscalização de todas as etapas de produção (GALVÃO, 2004).

Embora algumas fazendas marinhas, localizadas no litoral de Santa Catarina, possuam registro e certificação sanitária junto ao Serviço de Inspeção Federal (SIF), e sejam juntas responsáveis pelos maiores volumes de ostras cultivadas em Santa Catarina e comercializadas para outros estados, a grande maioria, dos pequenos e médios ostreicultores, ainda não possui esta certificação. A falta de certificação sanitária e conhecimento da origem do produto, requisitos obrigatórios para a regularização do transporte e comercialização junto ao SIF, impedem o transporte da produção de moluscos frescos através das fronteiras estaduais, não permitindo, assim, o abastecimento de grandes centros consumidores mais próximos como São Paulo, Rio de Janeiro, Porto Alegre e Curitiba, além de impedir também, o acesso destes produtos aos países inseridos no Mercosul. (SUPLICY, 1998).

Programas de monitoramento da qualidade da água incluem uma série de estudos que, em conjunto, permitem avaliar o cenário ambiental de um determinado corpo d'água, possibilitando o estabelecimento de diagnóstico do recurso hídrico e servindo de parâmetro

para os usos deste recurso. Em se tratando de maricultura, um dos estudos de grande importância num monitoramento é o da qualidade sanitária das águas. Assim como o monitoramento da contaminação em organismos oriundos da maricultura também são extremamente importantes, uma vez que seus tecidos são bastante suscetíveis ao acúmulo de organismos patogênicos e de contaminantes presentes na coluna d'água, podendo, portanto, causar uma série de doenças aos consumidores caso sejam consumidos (GARCIA, 2005).

O desenvolvimento ou a manutenção do crescimento da maricultura está intimamente ligado aos conceitos de integração das estratégias e programas que se queira apoiar para desenvolvê-la (POLI & LITTLEPAGE, 2005).

Apesar da importância do Estado de Santa Catarina, destacando o município de Florianópolis, no cenário da ostreicultura nacional, ainda não existem dados contínuos e abrangentes sobre a qualidade bacteriológica das águas onde estes moluscos são cultivados, que estejam de acordo com a resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005), além da qualidade bacteriológica dos próprios moluscos produzidos no estado. Apenas em 2007 a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A. (EPAGRI) iniciou um estudo com este objetivo. Atualmente estes monitoramentos são de responsabilidade dos próprios produtores, sendo realizados por um pequeno número de maricultores, que já possuem certificação sanitária junto ao SIF.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo diagnosticar a qualidade bacteriológica das águas marinhas onde os moluscos são cultivados e de ostras (*Crassostrea gigas*) em seis diferentes regiões de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.

2.2. Objetivos específicos

- Monitorar através dos ensaios microbiológicos, a qualidade higiênico-sanitária das águas onde são cultivadas e, de ostras produzidas nas diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina;
- Verificar a existência de correlação entre níveis de contaminação nas águas onde são cultivadas e nas ostras produzidas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina;
- Determinar as características físico-químicas de temperatura, salinidade, turbidez e pH das águas onde são cultivadas as ostras na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina;
- Verificar a existência de correlação entre parâmetros físico-químicos das águas onde são cultivadas as ostras e níveis de contaminação tanto nas águas como nas ostras produzidas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina;
- Acompanhar o índice pluviométrico na região da grande Florianópolis, verificando a existência de correlação entre este e níveis de contaminação bacteriológica das águas onde são cultivadas e das ostras;
- Classificar as áreas de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina em aptas ou não para o cultivo de moluscos bivalves segundo a legislação CONAMA 357/2005;
- Verificar a existência de diferenças significativas nos níveis de contaminação por coliformes a 45°C, tanto nas águas onde são cultivadas, como nas ostras, assim como nos parâmetros físico-químicos nas águas das seis diferentes regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de SC;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Ostreicultura em Santa Catarina

Segundo a FAO, a produção global de ostras (*Crassostrea gigas*) teve um crescimento em sua produção na ordem de 4,38 milhões de toneladas, maior que qualquer outra espécie de pescado, molusco ou crustáceo, entre os anos de 1950 e 2003. Os principais países envolvidos com a produção desta espécie até o ano de 2002 são apresentados na figura 1, além disso, a introdução de cultivos de ostras (*Crassostrea gigas*) também tem sido registrada em países como Brasil, Equador, Costa Rica, Ucrânia, Polinésia Francesa entre outros.



Figura 1 - Principais países envolvidos com a produção de ostras (*Crassostrea gigas*)

Fonte: FAO Fishery Statistics, 2002

Os primeiros exemplares de ostras (*Crassostrea gigas*) que chegaram ao Brasil foram importados pelo Instituto de Pesquisas da Marinha de Cabo Frio, no Rio de Janeiro, e eram oriundas da Grã-Bretanha. Em 1987, os primeiros exemplares foram trazidos de Cabo Frio para Santa Catarina e com eles iniciou-se um cultivo experimental (POLI, 2004).

Na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina os resultados se mostraram promissores desde o início, motivando o interesse dos pescadores da localidade de Santo Antônio de Lisboa – Florianópolis. Formou-se aí o primeiro condomínio de Pesca e Aqüicultura do Brasil, chamado Condomínio de Pesca e Aqüicultura Baía Norte, formado por um grupo de pescadores pioneiros (POLI, 2004).

Segundo LINS (2004), a década de 1990 registrou, em Santa Catarina, uma grande expansão da maricultura de moluscos, incluindo várias localidades entre a região de

Florianópolis e a fronteira norte do estado. Esse crescimento teve como base uma rede institucional em que despontam a Universidade Federal de Santa Catarina e a EPAGRI, com atividades de pesquisa, desenvolvimento tecnológico e de difusão das técnicas de cultivo nas comunidades, acompanhadas de iniciativas de organização dos produtores, uma estrutura que constitui, ela própria, uma importante inovação. Assim sustentada, a maricultura tem representado possibilidade de geração de renda e ocupação em comunidades de pescadores defrontadas com o declínio de suas atividades, e, como a qualidade das águas é essencial para esse setor, tem também representado estímulo à preservação ambiental.

A mudança da atitude extrativista tradicional para o cultivo de mexilhões e ostras em fazendas marinhas tem tornado rentável essa atividade atraindo produtores pelo aumento da renda familiar proporcionada pelo baixo investimento e curto prazo para o retorno da produção. No entanto, cada vez mais se faz necessário o monitoramento técnico das áreas ocupadas pelos cultivos, bem como a análise dos seus reflexos no entorno da área de produção (MACHADO, 2002).

O Estado de Santa Catarina abriga o maior Pólo de Maricultura do País. A área que compreende a linha da costa catarinense tem 561,4km de extensão que se inicia ao Norte em 25° 58' 36" de latitude e 48° 35' 36" de longitude e termina ao Sul em 29° 19' 30" de latitude e 49° 42' 57" de longitude (MACHADO, 2002). A região produtora do estado é compreendida por 12 municípios, inseridos na faixa costeira que se estende de São Francisco do Sul, no norte do estado, a Palhoça, na região centro-leste, com um contingente de 767 maricultores, a cadeia produtiva do cultivo de moluscos em Santa Catarina envolve direta e indiretamente cerca de 8.000 pessoas, desde a produção, colheita e beneficiamento, até a comercialização (OLIVEIRA NETO, 2007).

Em 2006, a produção total de moluscos (14.756,9 toneladas) registrou um modesto crescimento da ordem de 3,94 % em relação a 2005. Esse pequeno saldo positivo deve-se ao crescimento na produção de ostras que, mesmo participando com apenas 22,23% da produção total de moluscos, teve um crescimento de 62,36% de 2005 para 2006 (OLIVEIRA NETO, 2007).

A competitividade de Santa Catarina na ostreicultura pode ser creditada à presença de um arranjo produtivo local, onde se tem condições e agentes que contribuem, de maneira efetiva, para o alcance de elevada produtividade da atividade, a começar, como já foi afirmado, pela presença de boas condições oceanográficas. Um agente que tem

desempenhado um papel crucial é o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), que identificou o potencial das águas marinhas de Florianópolis para o cultivo da ostra japonesa e, posteriormente, iniciou e expandiu a produção em laboratório das mesmas, tornando-se o principal produtor de sementes do país (SOUZA FILHO, 2003). Hoje o LMM/UFSC é o único laboratório no Brasil a produzir regularmente sementes de ostras do Pacífico, constituindo-se, portanto, no principal pilar de sustentação da atividade, atendendo tanto a comunidade catarinense, quanto outros estados brasileiros (FERREIRA *et al*, 2006).

O desenvolvimento futuro da maricultura como atividade econômica no litoral de Santa Catarina, passa por um momento importante, aonde a produção vem gradativamente aumentando e a oferta vem se equilibrando. Em função da transformação da aquicultura em um dos maiores setores da produção de alimentos, a avaliação apropriada e o controle dos problemas sanitários que afetam a saúde pública tornam-se atividades de essencial importância para seu desenvolvimento. Iguais aos produtos da pesca tradicional, os oriundos da aquicultura, como os moluscos bivalves, também sofrem deterioração e ação de patógenos e, portanto, necessitam dos mesmos cuidados básicos durante a manipulação ou processamento para a introdução nos diferentes canais de comercialização (BEIRÃO, 2000).

Santa Catarina é responsável pela produção de, aproximadamente, 85% do total de ostras produzidas no Brasil, sendo o município de Florianópolis o maior produtor de ostras de Santa Catarina e, por conseguinte, do Brasil. Na safra de 2006 foi responsável pela produção de 51,26% do total de ostras produzido em todo Estado. Dois são os ambientes em que se desenvolve a ostreicultura em Florianópolis, na Baía Norte e na Baía Sul, sendo que a Baía Sul responde por cerca de 88% do total produzido em Florianópolis (OLIVEIRA NETO, 2007), estando a maioria destes cultivos localizados no distrito do Ribeirão da Ilha, nas localidades da Tapera, Barro Vermelho, Freguesia, Costeira do Ribeirão e Caieira da Barra do Sul.

O crescimento na produção de ostras apresentado na safra de 2006, passando das 1.941,6 toneladas registradas em 2005, ano este em que foi registrada uma queda na produção de ostras no estado de Santa Catarina, para 3.152,4 toneladas na última safra (figura 2), retomou a taxa de crescimento médio de 25%, verificada em, 2003 e 2004. Os municípios que mais contribuíram para esse crescimento foram: Florianópolis, com um volume de 559,61

toneladas a mais que no último ano, seguido por Palhoça e São José. Os municípios de Florianópolis e Palhoça apresentaram os maiores volumes de produção de ostras, em relação aos demais municípios produtores. Juntos eles produziram 90,91% da produção estadual (OLIVEIRA NETO, 2007).



Figura 2 - Produção de ostras em Santa Catarina.

Fonte: OLIVEIRA NETO, 2007

3.2. Caracterização da ostra *Crassostrea gigas*

A espécie *Crassostrea gigas* conhecida como Ostra do Pacífico ou Japonesa pertence ao Filo MOLLUSCA, Classe PELECYPODA ou BIVALVIA, Família OSTREIDAE, Gênero *Crassostrea* (BARNES, 1984).

É um filtrador, alimenta-se de materiais orgânicos e inorgânicos, fitoplâncton, partículas em suspensão presentes na água e microrganismos através de filtração branquial. Os cílios branquiais produzem uma corrente de água até o interior do animal, enviando as partículas em suspensão até os filamentos branquiais, onde são retidas e levadas por batimentos ciliares até os palpos labiais, onde ocorre uma seleção, tanto química quanto por tamanho (RUPP, 1999; FURLAN, 2004).

Os moluscos bivalves não possuem esqueleto interno e têm o corpo contido em uma concha formada por duas partes iguais, as valvas, as quais são unidas medianamente por uma estrutura conhecida como ligamento e contém delicadas linhas de crescimento. O músculo adutor une as duas conchas sendo o responsável pelo fechamento das mesmas. Este músculo

atua contra a pressão do ligamento e quando está relaxado, as valvas encontram-se abertas (RUPP, 1999).

A concha é muito variável, e depende do ambiente onde as ostras crescem, sendo usualmente alongada. A valva inferior ou esquerda é côncava, e encaixada sob a articulação, sendo esta a valva sobre a qual a ostra encontra-se fixada ao substrato, enquanto a valva superior ou direita é plana (figura 3). Comparativamente, as conchas são espessas, calcárias e frágeis (RUPP, 1999).

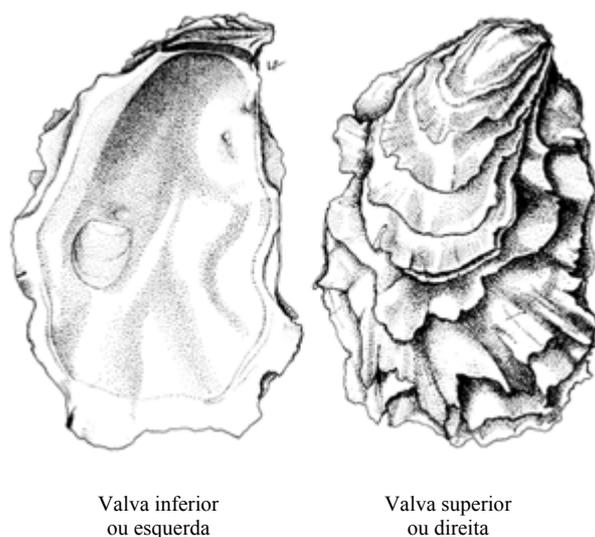


Figura 3 - Concha de ostra *Crassostrea gigas*

Fonte: FAO, 2007

A ostra *Crassostrea gigas* ocorre naturalmente no litoral do Japão, China e Coréia (IMAI, 1982). São animais hermafroditas seqüenciais, isto é, em um mesmo indivíduo, inicialmente, maturam as células de um sexo e após uma desova maturam as de outro, deste modo após cada período de desova, ocorre a troca de sexo. As espécies do gênero *Crassostrea* são classificadas como ovíparas ou não incubatórias, ou seja, os gametas são liberados diretamente para o ambiente externo, onde ocorre a fertilização (RUPP, 1999; POLI, 2004).

Segundo o Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM, 2005), as ostras *Crassostrea gigas* têm limite de tolerância de salinidade e temperatura. Os melhores desempenhos são em salinidades de 18-32%, podendo seu cultivo ser realizado em salinidade inferior ou superior, porém seu crescimento em altura é prejudicado. A ostra *Crassostrea*

gigas é uma espécie de clima temperado. Em nossas águas, a temperatura média encontrada fica em torno de 25°C, porém quando a temperatura está mais alta, as ostras parecem interromper o crescimento.

A temperatura elevada em ambientes que apresentam alta produtividade primária e fundo lodoso poderá ocasionar mortalidade em massa, fenômeno também conhecido como mortalidade em massa de verão (MMV). O processo de formação de gametas envolve uma série de etapas e é denominado gametogênese, sendo que inicia com o período de repouso, quando ocorre o acúmulo de glicogênio, o qual constitui a maior parte do tecido gonádico. Com o aumento da temperatura, que em regiões temperadas ocorre na primavera, as gônadas proliferam, e os folículos vão sendo preenchidos pelas células germinativas, as quais vão utilizando o glicogênio, sendo que, em uma ostra completamente madura, já não há mais glicogênio presente nas gônadas (RUPP,1999). Portanto, a capacidade reduzida de reservar glicogênio, já que mais de 65% do peso da carne das ostras sexualmente maduras é tecido germinativo e o esforço para produzir e manter este nível é altamente estressante, é uma forma de explicar a morte em massa que ocorre neste período, acarretando prejuízos aos produtores de ostras (BERTHELIN *et al*, 2000). Uma outra hipótese é a possibilidade da MMV ser provocada por microrganismo patogênico, uma bactéria do gênero *Nocardia*, a qual foi isolada de ostras doentes, que apresentavam fraco fechamento das valvas, manto de coloração normal, levemente descoloridos, ou contendo nódulos amarelos, verdes ou marrons (SILVEIRA JR, 1997).

Os dois sistemas de cultivo mais utilizados para a engorda de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) são os de fundo e o suspenso. O sistema suspenso pode ter três formas de estrutura: espinhel, mais comumente chamado de “long-line”, balsa e mesa. Estes são adaptados conforme as condições do local escolhido: profundidade, correntes, ondas e ventos. Já a contenção das ostras em cultivo, nestas estruturas, é feita utilizando-se caixas plásticas, armações de madeira envoltas em telas ou redes, travesseiros de rede, ou da maneira convencional, com “lanternas”. O cultivo de fundo não é realizado no Brasil, apenas em países europeus e da América do Norte, enquanto o cultivo suspenso é o sistema mais empregado no mundo, pois permite cultivar grande quantidade de ostras, utilizando pouca área, explorando o volume d’água, ao usar a profundidade do local, porém mantendo sempre uma distância segura do fundo, de aproximadamente 50 centímetros (SILVA, 1999; POLI, 2004).

3.3. Aspectos gerais da Microbiologia de Moluscos Bivalves

A incidência de microrganismos em alimentos de origem marinha como as ostras e os mexilhões, depende, em grande parte, da qualidade microbiológica do ambiente em que estes animais se encontram (BEIRÃO, 2000).

Ahmed (1991) refere em seus dados epidemiológicos sete surtos de salmonelose provocados pelo consumo de frutos do mar nos Estados Unidos durante o período de 1978-1987, três destes surtos foram devidos ao consumo de moluscos bivalves contaminados, dos quais dois, ocorreram após o consumo de ostras cruas coletadas em águas poluídas por esgotos.

Os moluscos bivalves são ecologicamente importantes por possuírem a capacidade de filtrarem grandes volumes de água, removendo assim, partículas e poluentes. Segundo Nunes & Parsons (1998), a capacidade filtrante da ostra pode variar de 2 a 5 litros de água por hora, e cerca de 100 litros por dia (WARD, 1996 apud COELHO, 2001).

Segundo Huss, (1997), existem dois grupos de bactérias de relevância para a saúde pública que contaminam os produtos marinhos: aqueles naturalmente presentes no ambiente como *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *Listeria monocytogenes*. E bactérias da família *Enterobacteriaceae* como *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, e *Escherichia coli* que estão presentes no meio devido a contaminação por resíduos humanos.

O número e tipo de microrganismos em produtos marinhos, recém capturados, é influenciado por diversos fatores, tais como: (1) localização geográfica da captura ou colheita, por exemplo, um pescado capturado em mar aberto contém menos bactérias e menor incidência de *Salmonella* do que um pescado capturado em uma Baía de águas poluídas; (2) estação do ano, a incidência de *Vibrio parahaemolyticus* é maior nos meses de verão do que no inverno e (3) método de captura (BEIRÃO *et al*, 2004).

A flora microbiana de moluscos bivalves varia consideravelmente, dependendo da qualidade da água na qual é capturado e/ou cultivado, da qualidade da água que se utiliza para sua lavagem, e de outros fatores. Os seguintes gêneros bacterianos foram isolados de ostras

deterioradas: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* e *Micrococcus*. No início e no desenvolvimento da deterioração, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Moraxella* spp., predominaram, enquanto, nos estágios mais avançados da deterioração, predominaram os *Enterococcus*, *Lactobacillus* e leveduras (JAY, 2005).

Segundo JAY, (2005), a medição do decréscimo de pH é um teste de deterioração de ostras e outros moluscos aparentemente melhor que as bases voláteis nitrogenadas. Embora o pH seja apontado pela maioria dos pesquisadores como a melhor técnica objetiva para a determinação da qualidade de ostras (quadro 1), Abbey *et al* (1957) apud Jay, (2005) constataram que avaliações organolépticas e contagens microbianas foram melhores indicadores da qualidade microbiológica deste produto.

pH	Perfil ostras
6,2 – 5,9	Boa
5,8	Inadequada (pouco)
5,7 – 5,5	Inadequada (muito)
5,2 ou menos	Pútrida

Quadro 1 - Escala de pH para determinação da qualidade microbiana de ostras.
(FONTE: JAY, 2005)

Na Espanha, devido ao alto consumo de alimentos marinhos, são relatados diversos casos de infecções por espécies de *Vibrio*. A dificuldade de isolar e identificar estas bactérias pode constituir um fator importante na hora de avaliar sua patogenicidade. *Vibrios* são, caracteristicamente, originários de habitats marinhos, salobres e estuários, aparecem em grandes concentrações em temperaturas de 20-25°C, a temperaturas baixas os *Vibrios* permanecem nos sedimentos do fundo do mar em concentração insuficiente para causar infecções. Sua concentração aumenta nos meses quentes, devido às condições ecológicas favoráveis e do plâncton, aumentando seu acúmulo por moluscos filtradores (GUTIÉRREZ & MARTOS, 1997). As espécies patogênicas são principalmente mesófilas, isto é, ocorrem, em geral, em águas tropicais e em número mais elevado em águas temperadas nos finais do verão ou princípios do outono (HUSS, 1997).

Os moluscos são os maiores veículos do vírus da hepatite A, *Salmonella typhi* também é considerada um dos mais significantes contaminantes, enquanto que *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus* estão envolvidos em menor intensidade, seguidos por *Vibrio vulnificus*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter jejuni* (BEIRÃO *et al*, 2004).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae*: *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli* ocorrem em produtos do pescado como resultado de contaminação do homem ou dos animais. Esta contaminação tem sido normalmente associada à contaminação fecal ou à poluição das águas naturais ou de ambientes aquáticos, onde estes organismos podem sobreviver durante um longo período, ou à contaminação direta dos produtos durante o processamento (HUSS, 1997).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como os coliformes de origem fecal, coliformes totais e *Escherichia coli*, *Shigella spp.* e *Samonella*, têm sido utilizadas como indicadores da qualidade sanitária das águas onde os moluscos são cultivados e dos moluscos bivalves (ANTONIOLLI, 1999).

A pesquisa de coliformes de origem fecal e *Escherichia coli* fornece, com maior segurança, informações sobre suas condições higiênico-sanitárias e indicam presença de enteropatógenos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

É atribuída a pássaros marinhos a disseminação de *Salmonella* e outros patógenos na água. *Salmonella* tem sido relatada como contaminante em várias espécies de pescado, principalmente em crustáceos como camarão. Há evidências de que certos sorotipos deste microrganismo façam parte da microbiota natural de alguns crustáceos em países tropicais (HUSS, 2000).

Nos cultivos localizados na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, é uma cena comum enxergarmos pássaros pousados em estruturas de mesa, provavelmente devido à facilidade em conseguir alimentos, situação que coloca a produção de moluscos bivalves em constante risco de contaminação, especialmente por *Salmonella*, que pode estar presente nas fezes eliminadas por estes pássaros, que muitas vezes defecam sobre as próprias lanternas quando a maré está baixa (figura 4). A contaminação dos mariscos com *Salmonella*, devido à sua proliferação em águas poluídas, tem sido um problema em muitas partes do mundo (HUSS, 1997).



Figura 4 - Pássaros marinhos pousados sobre estrutura de mesa em cultivo de moluscos bivalves.

O Ministério da Saúde através da Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a qual aprova o regulamento técnico e princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos, estabelece para moluscos bivalves *in natura* limites máximos permitidos de Estafilococos coagulase positivo de até 10^3 UFC/g e ausência de *Salmonella* em 25g. O limite para coliformes a 45°C somente é estabelecido para moluscos bivalves, temperados ou não, industrializados, resfriados ou congelados, sendo este de 5×10 NMP/g, não existindo nesta legislação, limites estabelecidos para *Vibrio parahaemolyticus* em moluscos bivalves, devido a isto utiliza-se como parâmetro a Portaria 451 de 19 de setembro de 1997, já revogada, a qual estabelecia um limite de 5×10^3 NMP/g. O limite máximo permitido de *Vibrio parahaemolyticus*, é apenas estabelecido para pratos prontos para o consumo a base de pescados, em cozinhas, restaurantes e similares, sendo este de 10^3 NMP/g.

Cabe salientar que os limites de microrganismos tolerados pela RDC nº12 (2001), para moluscos bivalves *in natura*, resfriados ou congelados, referem-se ao molusco não consumido cru. Porém moluscos são, tradicionalmente, consumidos crus ou levemente cozidos. Desta forma, são vistos como alimento de alto risco e estão largamente associados com intoxicações alimentares. Provavelmente, como consequência do aumento da poluição ambiental (BEIRÃO *et al*, 2004).

3.4. Microrganismos indicadores de qualidade da água de cultivo

O cultivo de moluscos bivalves deve ser apenas autorizado nas zonas onde não desembocam diretamente esgotos. Para tal, é necessário conhecer a geografia local, as correntes marinhas e o modo como os esgotos são tratados e descarregados localmente. Simultaneamente, é necessário vigiar a qualidade microbiológica da água (HUSS, 1997).

A principal dificuldade do monitoramento da qualidade da água de um determinado local é o estabelecimento de indicadores adequados e a definição dos critérios a serem adotados para esta avaliação (CETESB, 2003 *apud* GALVÃO, 2004).

Vários microrganismos, principalmente da família *Enterobacteriaceae*, como os coliformes totais, coliformes de origem fecal e *Escherichia coli*, têm sido utilizados como indicadores da qualidade sanitária das águas onde os moluscos são cultivados e dos moluscos bivalves (MARTINEZ-MANZANARES *et al*, 1991). Os coliformes têm pouca tolerância à salinidade das águas do mar, portanto, sua detecção neste ambiente denota uma descarga constante de matéria fecal (HAGLER & HAGLER, 1988, *apud* SALÁN, 2005).

Segundo Cabelli *et al*, (1983), os melhores indicadores da presença de patógenos entéricos em fontes de poluição fecal devem ter as seguintes propriedades: estar presentes em águas contaminadas por material fecal em densidades mais elevadas que os patógenos, ser incapaz de crescer em ambientes aquáticos, mas capazes de sobreviver mais tempo que os microrganismos patogênicos; apresentar resistência igual ou maior que os patógenos aos processos de desinfecção, serem facilmente enumerados por técnicas precisas; ser aplicável a todos os tipos de águas naturais (doce, salobra, salina), estar ausente em águas não poluídas e associadas exclusivamente a despejos de fezes animais e humanas e apresentar densidade diretamente correlacionada com o grau de contaminação fecal. Este conjunto de características constitui uma definição teórica de um indicador, pois nenhum tipo de bactéria preenche totalmente estes requisitos. No entanto, estas características restringem os indicadores a alguns grupos de bactérias.

O grupo dos coliformes totais inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C, incluindo tanto bactérias originárias

do trato gastrointestinal, como também diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, por essa razão, sua enumeração em água e alimentos é menos representativa que os coliformes a 45°C e *Escherichia coli* (SILVA *et al*, 2000).

Os coliformes fecais ou termotolerantes recebem a mesma definição que os coliformes totais, porém restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5 – 45,5°C. Inclui pelo menos três gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais dois (*Enterobacter* e *Klebsiella*) incluem cepas de origem não fecal. Por esse motivo a presença de coliformes fecais é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração direta de *Escherichia coli*, porém muito mais significativa que a presença de coliformes totais, dada a alta incidência de *Escherichia coli* dentro do grupo fecal (SILVA *et al*, 2000).

Como indicador de poluição fecal recente, os coliformes termotolerantes apresentam-se em grande densidade nas fezes, sendo, portanto, facilmente isolados e identificados na água por meio de técnicas simples e rápidas, além de apresentarem sobrevivência praticamente semelhante a das bactérias enteropatogênicas. No entanto, a presença de coliformes termotolerantes nas águas não confere a estas uma condição infectante. Este subgrupo das bactérias coliformes não é por si só prejudicial à saúde humana, apenas indica a possibilidade da presença de quaisquer organismos patogênicos (CETESB, 2003 *apud* GALVÃO, 2004).

A correlação entre a presença de bactérias indicadoras e de diversos agentes patogênicos na água e nos moluscos bivalves tem sido também questionada. A concentração de microrganismos nos moluscos filtradores varia enormemente de um animal para outro e depende também das condições meteorológicas, da temperatura e da atividade geral do molusco (HUSS, 1997).

Testes para coliformes são amplamente utilizados para verificar a sanificação de moluscos e crustáceos, mas nem sempre eles são considerados bons indicadores de qualidade sanitária. O Programa Nacional de Sanificação de Moluscos e Crustáceos dos Estados Unidos teve início em 1925, e a presença de coliformes foi utilizada para avaliar a sanificação de água onde estes animais eram cultivados. Geralmente moluscos e crustáceos cultivados em águas que apresentam adequação aos critérios de coliformes têm um bom histórico de qualidade sanitária, contudo alguns patógenos humanos podem ainda estar presentes nesses animais. Em

ostras não existe correlação entre coliformes fecais e *Vibrio cholerae*, ou entre *E. coli* e *Vibrio parahaemolyticus* ou *Yersinia enterocolitica* (JAY, 2005).

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), órgão que estabelece a classificação e normaliza os parâmetros de qualidade da água, segundo seu uso preponderante, determina que em águas salobra ou salina para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mililitros, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mililitros. Esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de cinco amostras. A *Escherichia coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente (BRASIL, 2005).

Em 1900 foi sugerida a utilização do grupo dos enterococos clássicos como indicadores de qualidade de água, por possuírem algumas características relevantes: (1) não se multiplicarem na água, devido a sua existência nas fezes, especialmente se o conteúdo de matéria orgânica for baixo; (2) geralmente são menos numerosos em fezes humanas do que a *E. coli*, e relações de coliformes fecais para enterococos de 4,0 ou mais indicam contaminação por resíduo humano; (3) os enterococos morrem mais lentamente em água do que os coliformes e, desse modo, normalmente sobrevivem mais do que o patógeno cuja presença eles devem indicar (JAY, 2005).

O grupo dos enterococos é um subgrupo dos estreptococos fecais que incluem *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. gallinarum* e *S. avium*. Os enterococos se diferenciam dos outros estreptococos pela habilidade que possuem de crescer em 6,5% NaCl, a um pH 9.6 e a temperatura de 10°C e 45°C. São considerados bons indicadores bacterianos por determinarem a extensão da contaminação fecal em águas superficiais. Seu uso tem sido indicado para verificar a qualidade de águas para fins de recreação (APHA, 2005).

3.5. Parâmetros físico-químicos de águas onde os moluscos são cultivados

Junto à costa, há ambientes onde a salinidade varia diariamente com valores que vão de zero a 35‰, como em desembocadura de rios, estuários, mangues e lagoas costeiras. Existem também locais com salinidade mais estável, como Baías e mar aberto, com pouquíssimas variações, devido a isto a importância da seleção da área de implantação do cultivo de ostras (*Crassostrea gigas*), já que este parâmetro tem influência direta no seu crescimento (POLI, 2004).

Segundo a CETESB (2007), variações de temperatura são parte do regime climático normal, e corpos de água naturais apresentam variações sazonais e diurnas. A temperatura superficial é influenciada por fatores tais como latitude, altitude, estação do ano, período do dia, taxa de fluxo e profundidade. A temperatura desempenha um papel principal de controle no meio aquático, condicionando as influências de uma série de parâmetros físico-químicos. Em geral, à medida que a temperatura aumenta de 0 a 30°C, a viscosidade, tensão superficial, compressibilidade, calor específico, constante de ionização e calor latente de vaporização diminuem, enquanto a condutividade térmica e a pressão de vapor aumentam as solubilidades com a elevação da temperatura. Organismos aquáticos possuem limites de tolerância térmica superior e inferior, temperaturas ótimas para crescimento, temperatura preferida em gradientes térmicos e limitações de temperatura para migração, desova e incubação do ovo.

A temperatura é um fator que influencia no metabolismo destes organismos. Tratando-se de uma espécie de clima temperado, é de se esperar que a ostra (*Crassostrea gigas*) encontre o seu melhor desenvolvimento em ambientes semelhantes ao de origem, não sendo aconselhável a sua criação em regiões onde a água é sempre quente, pois é uma espécie típica de águas frias (POLI, 2004).

A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais dá-se diretamente devido a seus efeitos sobre a fisiologia das diversas espécies. Também o efeito indireto é muito importante podendo, em determinadas condições de pH contribuir para a precipitação de elementos químicos tóxicos como metais pesados; outras condições podem exercer efeitos sobre as solubilidades de nutrientes (CETESB, 2007).

Desta forma, as restrições de faixas de pH são estabelecidas para as diversas classes de águas naturais através da Resolução nº357 do CONAMA, de março de 2005, a qual estabelece

que o pH esteja entre 6,5 e 8,5, não devendo haver uma mudança do pH natural maior do que 0,2 unidade (BRASIL, 2005).

Há uma tendência do pH da água decrescer, com o distanciamento da fonte poluidora de despejo de esgoto, isto porque a matéria orgânica em suspensão é diluída pela ação das ondas, marés e correntes (PINHEIRO JÚNIOR, 2000 apud GALVÃO *et al*, 2006).

A turbidez de uma amostra de água é o grau de atenuação de intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessá-la, e esta redução se dá por absorção e espalhamento, uma vez que as partículas que provocam turbidez nas águas são maiores que o comprimento de onda da luz branca, devido à presença de sólidos em suspensão, tais como partículas inorgânicas (areia, silte, argila) e de detritos orgânicos, algas e bactérias, plâncton em geral, etc (CETESB, 2007).

A alta turbidez da água reduz a fotossíntese das algas. Esse desenvolvimento reduzido de plantas pode, por sua vez, influenciar a alimentação dos bivalves e outras espécies de pescado (GALVÃO *et al*, 2006). A turbidez é influenciada pelas partículas em suspensão, como as microalgas; a baixa concentração dessas microalgas na água, além de resultar numa baixa turbidez, aumenta a capacidade de filtração de bivalves (SOLIC *et al.*, 1999).

Segundo GALVÃO, (2004), as chuvas interferem no índice de qualidade microbiológica da água, pois estas têm a capacidade de arrastar esgotos e resíduos sólidos para os cursos d'água, que, por sua vez, afluem para o mar.

3.6. Consumo de ostras e saúde pública

Na aqüicultura, os aspectos de saúde pública relacionados com o consumo de produtos provenientes desta atividade, se enfocam principalmente a evitar a presença de perigos biológicos e químicos. Estes perigos só podem ser eliminados por meio da introdução de programas de boas práticas nos locais de produção, assim como com a emissão e vigilância de normas e regulamentos específicos por parte das autoridades competentes (MARTÍNEZ & RODRIGUEZ, 2003).

O risco para a saúde pública, tanto em cultivos artesanais quanto em fazendas de criação, exige que as atividades de maricultura sejam monitoradas de perto, para detectar e

evitar qualquer contaminação por agentes causadores de doenças: bactérias, parasitas e vírus (BARARDI *et al*, 2001).

Os problemas que advém do cultivo de moluscos bivalves em áreas poluídas são muito prejudiciais à saúde pública. A poluição tem sua origem no deságüe de dejetos domésticos, industriais e pesticidas agrícolas. As águas contaminadas por fezes humanas e de animais de sangue quente podem disseminar fácil e rapidamente, através dos moluscos cultivados, um grande número de enfermidades, principalmente gastroenterites (LENOCH, 2003).

O consumo de moluscos, conforme registros em literatura especializada é responsável por inúmeros surtos epidêmicos e responde diretamente pelos problemas de saúde pública ocasionados, principalmente, quando os moluscos são ingeridos *in natura* e a qualidade sanitária do ambiente aquático onde eles são capturados está comprometida (JOSÉ, 1996).

Segundo o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), entre os anos de 2000 e 2005, foram registrados nos EUA, dez surtos de toxinfecções alimentares envolvendo a ingestão de ostras contaminadas por bactérias patogênicas. Destes, 70 % foram causados por *Vibrio parahaemolyticus*, 20% por *Vibrio cholerae* e 10% por *Salmonella typhi*, envolvendo, no total, cerca de 120 pessoas.

Em 1997, o percentual de surtos de toxinfecções causados pela ingestão de moluscos, nos Estados Unidos, representou 2,2% do total de surtos registrados pelo CDC, tendo sido este percentual o mais elevado, se comparado à carne bovina, presunto, carne suína e frango (CDC, 2000).

A maioria dos surtos alimentares documentados, envolvendo pescado marinho nos Estados Unidos, está relacionada com o consumo de moluscos bivalves. Esta incidência se deve à biologia do animal, à qualidade da água na qual este se encontra, às técnicas de manipulação pós captura e ao fato de que estes alimentos, freqüentemente, são consumidos *in natura* (COOK, 1991).

A importância dos frutos do mar como veículo de toxinfecções está condicionada a fatores como a dieta da população consumidora e o modo tradicional de preparo do alimento. Devido a isto a proporção de surtos alimentares envolvendo frutos do mar é

significativamente mais alta no Japão devido ao alto consumo de pescado *in natura* quando comparado a outros países como Canadá e Estados Unidos (HUSS *et al*, 2000).

Segundo a Fundação Instituto da Pesca do Rio de Janeiro, (1989), no Brasil as dificuldades operacionais dos sistemas de estatística e, conseqüentemente, de estudos na área, se deve ao fato de que parte importante da população de bivalves é comercializada na clandestinidade.

Archer & Moretto, (1994), estudaram a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões de banco natural do litoral do Município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil, encontrando um índice de contaminação de 52,5% das amostras analisadas.

Heinitz, *et al*, (2000), estudaram a incidência de *Salmonella* em frutos do mar importados e produzidos nos Estados Unidos, no laboratório do Food and Drug Administration (FDA), tendo uma incidência de 7,2% nos produtos importados e 1,3% nos produtos locais, sendo que a incidência nos moluscos importados consumidos crus foi de 1% em ostras e 3,4% em mariscos.

Embora esses microrganismos sejam eliminados rapidamente do trato gastrintestinal, mais de 5% dos pacientes tornam-se portadores após a cura da doença, e passam a ser fonte de contaminação dos ambientes nos quais seus dejetos são eliminados (JAY, 2005).

O homem e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*. A cavidade nasal é o principal habitat dos estafilococos no homem e, a partir deste foco podem atingir a água, ar, solo, esgoto e qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com o homem (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Galvão *et al* (2006), estudando a qualidade microbiológica de mexilhões *Perna perna* comercializados em Ubatuba/SP, encontrou sempre valores médios de *S. aureus* inferiores a $1,0 \times 10^2$ UFC g⁻¹ para todos os pontos de coleta, durante todo o período de estudo, estando estes resultados de acordo com a Legislação vigente no Brasil, Resolução - RDC n°12, de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Em pesquisa realizada por Pereira *et al* (2006), que avaliou a qualidade microbiológica de ostras *Crassostrea gigas*, cultivadas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis, não foi encontrada contaminação por *Salmonella sp.*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus* em nenhuma das amostras analisadas, encontrando estafilococos coagulase positiva em apenas 1,1% das amostras analisadas e, *Escherichia coli* em 9% das amostras coletadas no local de cultivo.

Vírus e parasitas também têm sido apontados como causa de infecções por consumo de ostras e moluscos. Na Nova Zelândia o consumo de ostras do Pacífico causou surtos no último trimestre de 1999, com o vírus tipo Norwalk-like, que causa gastroenterites (SIMMONS *et al*, 2001).

As toxinas e compostos químicos como os praguicidas, organoclorados, organofosforados e metais pesados, também podem ser incorporados e acumular-se nos moluscos bivalves, causando problemas de saúde pública (MARTÍNEZ & RODRIGUEZ, 2003). Em estudo realizado por Curtius *et al*, (2003), avaliando a contaminação por elementos traço de metais e semi-metais em atividades de maricultura em Florianópolis, Santa Catarina, todas as amostras analisadas encontravam-se com os teores abaixo dos limites toleráveis, citados no “Food and Drugs Administration (FDA) Guidance Document”.

3.7. Controle de qualidade em cultivos de ostras

A implantação de boas práticas, em diferentes sistemas produtivos, enfocadas a garantir a inocuidade dos alimentos, já está sendo uma realidade no que se refere à aqüicultura, já que diferentes organizações nacionais e internacionais continuam recomendando e fomentando esta forma de trabalhar em todas as fases da produção de alimentos (MARTÍNEZ & RODRIGUEZ, 2003).

Segundo Carvalho (2005), o Codex Alimentarius define as Boas Práticas de Aqüicultura como práticas necessárias para a obtenção de produtos alimentares saudáveis em conformidade com as leis e regulamentos relativos aos alimentos, bem como com aquelas ligadas ao bem estar animal.

As boas práticas de aquicultura representam mais um componente do controle de qualidade das empresas para a produção de alimentos seguros para o consumidor (CARVALHO, 2005).

3.7.1. Seleção da área de cultivo

A seleção da área de cultivo é determinante para assegurar a inocuidade dos moluscos, por isso é necessário que seja uma área livre de fontes de contaminação que atentem contra a saúde humana, e que ofereça as características adequadas para o bom desenvolvimento dos organismos (MARTÍNEZ & RODRIGUEZ, 2003).

Os locais de cultivo devem ser protegidos dos despejos poluentes ou estarem localizados em águas mais profundas e distantes da orla marítima (LENOCH, 2003).

Em Santa Catarina, estudos desenvolvidos desde 1992 pela EPAGRI em parceria com a Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina (FATMA), levantando dados de poluição por coliformes fecais nos municípios onde naquela época já eram cultivados mariscos, de São Francisco do Sul até Palhoça/SC, enfatizam que a escolha do local de cultivo é fundamental não apenas para o seu desenvolvimento, mas também para a qualidade sanitária dos produtos cultivados (LENOCH, 2003). Diante desses fatos pode-se concluir que, em se tratando de atividades de maricultura, uma das maiores preocupações está na localização do cultivo em áreas resguardadas da contaminação ambiental (GARCIA, 2005).

3.7.2. Controle de qualidade

Em se tratando de bivalves e outras espécies de pescado, dá-se ênfase à qualidade da água, pois a classificação desta é fundamental para garantir a sanidade microbiológica do molusco, e monitorando as águas, os órgãos competentes poderão definir qual o local recomendado para a colheita e cultivo de bivalves (NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS, 1992).

Um meio alternativo para garantir a salubridade dos moluscos bivalves é a depuração, sendo esta operação obrigatória num certo número de países. A depuração consiste em manter os moluscos bivalves por um certo tempo em água tratada, livre de microrganismos ou, ao

menos, em concentrações não patogênicas destes. Durante este tempo, os moluscos permanecem em água depurada filtrando, eliminando os microrganismos patogênicos que possam ter sido acumulados em seu tubo digestivo (SUPLICY, 1998). Para desinfetar a água, recorre-se a vários métodos tais como luz ultravioleta, cloro, iodóforos, ozônio e oxigênio ativado (HUSS, 1997).

Uma alternativa para garantir a eliminação de microrganismos patogênicos de bivalves é a transferência das lanternas ou cordas de cultivo para áreas comprovadamente livres de contaminação, onde os moluscos passariam por um processo de depuração natural (SUPLICY, 1998).

Tanto os mexilhões e ostras frescas, quanto os produtos processados a partir destes perdem qualidade nutritiva e organoléptica quando submetidos a condições de conservação insatisfatórias. Para evitar que os produtos transmitam ao consumidor a sensação de má qualidade, é fundamental que a indústria tenha por hábito um rigoroso controle sobre a qualidade de seus produtos, tanto com relação à matéria-prima adquirida, quanto às diversas operações envolvidas com o processo produtivo, e mais do que isso, quanto a como se dá a preservação e apresentação destes produtos no mercado varejista (BEIRÃO, 2000).

No Brasil está em fase de elaboração o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), o qual vai regulamentar o controle higiênico-sanitário de toda a cadeia produtiva de moluscos bivalves (como ostras e mexilhões) no país, desde a produção até a comercialização. A criação e implantação do programa é uma necessidade urgente, devido ao rápido desenvolvimento da maricultura no Brasil e à exigência por produtos de qualidade e sanitariamente seguros. O PNCMB é fundamental para que a maricultura se desenvolva de forma sustentável no país, com atenção para todas as fases da cadeia produtiva visando à proteção da saúde da população e a criação de mecanismos seguros para o comércio nacional e internacional. Estão envolvidos na elaboração deste programa além da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP), a Divisão de Pescados e Departamento de Saúde Animal do Ministério da Agricultura e da ANVISA e Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde, além de consultores, pesquisadores, associações de produtores e demais integrantes da cadeia produtiva de moluscos (SEAP, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

O trabalho foi realizado na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, em seis diferentes regiões geográficas localizadas no distrito do Ribeirão da Ilha, onde estão concentrados o maior número de cultivos de ostras: Caieira da Barra do Sul, Tapera do Ribeirão, Costeira do Ribeirão, Freguesia do Ribeirão, Barro Vermelho e Tapera da Base Aérea, as quais foram identificadas, respectivamente, como pontos: A, B, C, D, E e F (figura 5).



Figura 5 - Pontos de coleta nas seis diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.

4.2. Eleição e caracterização dos pontos de coleta

A eleição dos pontos de coleta dentro de cada região foi determinada observando o local onde se concentrava o maior número de espinheis (*long-line*) e/ou mesas, de maneira que obtivéssemos um ponto que melhor representasse as características dos cultivos dentro daquela região, além da disponibilidade do maricultor responsável pela área identificada em disponibilizar uma lanterna de ostras (*Crassostrea gigas*) de onde foram coletadas as amostras durante todo o monitoramento. Estes pontos foram geo-referenciados através de posicionamento por satélites (Global Position System – GPS), utilizando um aparelho GPS portátil Garmin 12.

As coordenadas geográficas dos pontos identificados foram: Caieira da Barra do Sul (27° 48'849" S; 48° 33'981" W); Tapera do Ribeirão (27° 46'989" S; 48° 34'318" W); Costeira do Ribeirão (27° 44'350" S; 48° 33'890" W); Freguesia do Ribeirão (27° 43' 17,4" S; 48° 33'57,8" W), Barro Vermelho (27° 42'11,1" S; 48° 33'33,7") e Tapera da Base Aérea (27° 41'397" S; 48° 34'230" W). A profundidade de cada ponto de coleta geo-referenciado estão descritas no quadro 2.

REGIÃO	PROFUNDIDADE (metros)
A	4,0
B	2,3
C	5,2
D	2,7
E	3,0
F	2,5

Quadro 2 - Profundidade nos seis diferentes pontos de coleta geo-referenciados.

4.3. Parâmetros físico-químicos da água de cultivo

No momento da coleta das amostras de água de cultivo, foram realizadas análises da temperatura, turbidez e salinidade das águas onde os moluscos são cultivados. A temperatura foi verificada utilizando termômetro portátil de mercúrio com graduação de 0,5° C, a turbidez utilizando turbidímetro Plus Microprocessado da marca Alkafit, e a salinidade foi verificada utilizando salinômetro portátil da marca Alkafit, modelo 211. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

A determinação do pH das águas onde os moluscos são cultivados era realizada imediatamente após a chegada das amostras ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do CAL/UFSC, em medidor digital de pH da marca Quimis, modelo Q-400A, sendo esta realizada em triplicata.

4.4. Coleta de amostras

4.4.1. Ostras

As amostras de ostras frescas foram coletadas aleatoriamente entre os compartimentos de lanternas de cultivo, nos pontos previamente identificados em cada região de cultivo, sendo que 12 unidades constituíram cada amostra. Foram coletadas concomitantemente, duas amostras mensais, de cada uma das seis regiões de cultivo durante nove meses e, nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro foram realizadas coletas quinzenais, ou seja, quatro amostras em cada uma das seis regiões por mês, totalizando em doze meses 180 amostras.

Para o cálculo dos resultados das contagens de microrganismos nas amostras de ostras, foi calculada a média aritmética entre as duas repetições coletadas no mesmo ponto em cada coleta, expressando um único resultado nas contagens, totalizando 90 amostras, enquanto para as análises de incidência, foram consideradas as 180 amostras individualmente.

4.4.2. Água de cultivo

Quanto as amostras de água do mar proveniente dos cultivos, foi coletada uma amostra mensal com repetição, em frascos estéreis de um litro, das seis regiões de cultivo do Ribeirão da Ilha durante 9 meses, sendo que nos meses de janeiro, fevereiro e março foram realizadas coletas quinzenais, coletadas no mesmo ponto em cada uma das seis regiões, totalizando em doze meses 180 amostras. A coleta era realizada a 50 cm de profundidade, no sentido contrário a correnteza, junto à lanterna de coleta de ostras, na altura do primeiro compartimento da mesma. No laboratório, foram analisadas 90 amostras de águas onde os moluscos são cultivados, sendo que cada unidade amostral foi obtida da mistura das repetições de cada coleta em cada uma das seis regiões de cultivo.

As amostras eram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo potável em embalagem vedada, até chegarem ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC e as análises eram realizadas em até, no máximo, 2 horas.

4.4.3. Preparo e diluições das amostras

As ostras eram lavadas imediatamente após a chegada ao Laboratório, com escova sob água potável corrente. Todo material aderido às conchas era raspado e escovado sob água corrente de boa qualidade, para então as ostras serem secas ao ar livre em bandeja plástica previamente desinfetada com álcool 70%.

As ostras eram abertas com faca estéril e, o líquido intervalvar e a carne, transferidos asepticamente para saco estéril, constituindo o *pool* de cada amostra, de onde eram posteriormente pesadas duas amostras de 25 e uma de 50g.

Para as análises microbiológicas de coliformes a 35° C, coliformes a 45° C, *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positivo das ostras, foram pesadas 25 g da amostra, adicionadas de 225 ml água peptonada 0,1% e, posteriormente desintegrada em homogeneizador *Bagmixer*. A partir dessa diluição (10^{-1}), foram efetuadas as demais diluições decimais para proceder às análises. Para a pesquisa de *Salmonella spp.* foi realizado um pré-enriquecimento de 25g da amostra em 225 mL de água peptonada tamponada (BPW - Oxoid) o qual foi incubado a 35°C ($\pm 1^\circ$ C) por 24 horas.

Para a análise de *Vibrio spp.* foram pesadas 50g da amostra e adicionados 450 mL de tampão fosfato salina (PBS). Posteriormente, desintegrou-se em homogeneizador *Bagmixer*. A partir dessa diluição (10^{-1}), foram efetuadas as diluições decimais seguintes para proceder à análise.

4.5. Análises microbiológicas de água de cultivo

As análises microbiológicas de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli*, foram realizadas segundo metodologia do STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER & WASTEWATER - APHA/AWWA/WEF, 21st Edition (2005).

4.5.1. Coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli*

Para as amostras de água de cultivo foi utilizada a técnica de 5 tubos múltiplos, onde utiliza-se uma série de 5 tubos com Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST- Oxoid) duplamente concentrado, seguida de duas séries de 5 tubos com LST em concentração normal, adicionando-se em cada série de 5 tubos 10, 1 e 0,1mL da água de cultivo respectivamente. Os tubos de LST foram incubados a 35° C ($\pm 1^\circ$ C) por 48 horas, e aqueles com turvação e produção de gás foram repicados para tubos de Caldo Verde Brilhante 2% lactose (BVB- Oxoid) e para tubos com Caldo *Escherichia coli* (EC- Oxoid). Os tubos de caldo BVB foram incubados a 35 °C ($\pm 1^\circ$ C) por 48 horas e os tubos de EC em Banho-Maria a 45,0°C ($\pm 1^\circ$ C) por 24 horas. A partir dos tubos de EC com turvação e produção de gás, foram realizadas inoculações em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EAM- Oxoid) por esgotamento, as quais foram incubadas a 35° C ($\pm 1^\circ$ C) por 24 horas. As colônias típicas de *Escherichia coli* foram submetidas à série bioquímica: Indol, Vermelho de Metila , Voges Proskauer e Citrato (IMVIC). As contagens foram realizadas através da utilização da tabela do número mais provável (NMP) para séries de 5 tubos por diluição (10,0 ml, 1,0 ml e 0,1 ml).

4.5.2. Classificação das áreas de cultivo

A classificação das diferentes regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, como aptas ou não para o cultivo de moluscos bivalves destinados a alimentação humana, foi definida em função da média geométrica e do percentil 90 de coliformes a 45°C obtidos nas análises microbiológicas das águas onde os moluscos são cultivados das quinze coletas realizadas em cada região, baseando-se na resolução Conama 357/2005 (BRASIL, 2005).

4.6. Índice pluviométrico

O índice pluviométrico na Grande Florianópolis foi acompanhado a partir dos dados recebidos mensalmente do Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia (CIRAM) da Epagri, da estação São José, que fica localizada a 27°35`S de latitude e 48°34`W de longitude, a uma altitude de 2 metros, próximo à Baía Norte da Ilha de Santa Catarina. Sendo que foi verificado tanto o acumulado mensal, como o acumulado na semana anterior a cada coleta, durante todo o período de monitoramento.

4.7. Determinação do pH das ostras

O pH das ostras era verificado a partir do restante do *pool* de 12 ostras de cada amostra, em medidor digital de pH da marca Quimis, modelo Q-400A, sendo realizado em triplicata.

4.8. Análises microbiológicas de ostras

As análises de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C, *Escherichia coli*, estafilococos coagulase positivo e *Salmonella spp.* foram realizadas segundo metodologia do AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA, (2001), e a análise de *Vibrio spp.* foi realizada segundo a metodologia BAM/US FDA (2001).

4.8.1. Coliformes a 35°C, coliformes 45°C e *Escherichia coli*

Transferiu-se 1 ml das diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) em cada tubo de uma série de três tubos para cada diluição contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST - Oxoid), e incubou-se a 35°C ($\pm 1^\circ \text{C}$) por 48 horas. De cada tubo de LST com turvação e produção de gás, foram transferidos 100 μl dos tubos positivos para tubos de Caldo Verde Brillante 2% lactose (BVB- Oxoid) e para tubos com Caldo *Escherichia coli* (EC- Oxoid). Os tubos de BVB foram incubados a 35 °C ($\pm 1^\circ \text{C}$) por 48 horas e os tubos de EC em Banho-Maria a 45,0°C ($\pm 0,5^\circ \text{C}$), por 48 horas. A partir dos tubos de EC com turvação e produção de gás, foi realizada inoculação em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EAM- Oxoid) por esgotamento, incubando-as a 35° C ($\pm 1^\circ \text{C}$) por 24 horas. As colônias típicas de *Escherichia coli* foram submetidas à série bioquímica: Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato (IMVIC). O resultado final de coliformes a 35° C e coliformes a 45° C foi expresso a partir da tabela do Número Mais Provável (NMP), pela combinação do número de tubos positivos em cada série da diluição, no qual a positividade caracterizou-se pela turvação e produção de gás em cada tubo individualmente. As contagens de *E. coli* foram feitas a partir da confirmação das colônias isoladas no EAM, na série bioquímica do IMVIC, também expressos pela combinação de isolados positivos, através da tabela do NMP.

4.8.2. Estafilococos coagulase positivo

As análises foram realizadas por plaqueamento direto em superfície, das três primeiras diluições, sendo esse procedimento recomendado para detecção de Estafilococos em alimentos crus (APHA, 2001). Foi distribuído 1 mL de cada uma das três primeiras diluições em 3 placas de ágar Baird Parker (BP), as quais foram incubadas a 35° C (\pm 1° C) por 48 horas. Foram selecionadas três colônias típicas, as quais foram repicadas para caldo Infusão cérebro coração (BHI-Oxoid) e incubadas a 35° C (\pm 1° C) por 24 horas para posteriormente realizar os testes bioquímicos de catalase e coagulase. Para interpretação e cálculo de resultados foram consideradas como Estafilococos coagulase positivo, as culturas com reação de coagulase positiva. Em caso de dúvida quanto ao resultado da coagulase foram utilizados os testes adicionais de DNase e estudo da morfologia através do Gram. Quando a reação de coagulase foi negativa, o resultado foi expresso como < 10 Unidades Formadoras de Colônia por grama da amostra (UFC/g).

4.8.3. *Salmonella spp.*

Após as 24 horas de pré-enriquecimento em BPW, foram transferidas alíquotas, simultaneamente, para caldo tetrionato (TT-Oxoid) e caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado (RV-Oxoid) e foram incubados a 42°C (\pm 1° C) por 24 horas. A partir dos tubos de enriquecimento seletivo foi realizada semeadura por esgotamento em placas de Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS-Merk) e Ágar xilose lisina desoxicolato (XLD-Oxoid), e foram incubadas a 35° C (\pm 1° C) por 24 horas. As colônias típicas de *Salmonella spp.* foram submetidas a triagem bioquímica em ágar ferro três açúcares (TSI-Oxoid), ágar ferro lisina (LIA-Oxoid), e ágar uréia, e quando ocorreu reação típica de *Salmonella sp.* na triagem bioquímica, foram então submetidas aos testes bioquímicos complementares: Dulcitol, Indol, Malonato, VM-VP e Citrato.

4.8.4. *Vibrio spp.*

Foram preparadas diluições decimais até 10⁻⁴ em Tampão fosfato salina (PBS), e foi semeado 1 mL de cada diluição em séries de três tubos de água peptonada alcalina (APW-Oxoid), suplementada com 3% de NaCl, incubando-os a 35°C (\pm 1° C) por 24 horas. A partir de cada tubo com turvação foi semeado, por esgotamento, em placas de Agar Tioissulfato

citrato bile sacarose (TCBS-Oxoid) e as placas foram incubadas a 35° C ($\pm 1^\circ$ C) por 24 horas. As colônias suspeitas de ser *Vibrio spp.* foram submetidas ao teste de motilidade, em ágar Sulfeto indol motilidade (SIM-Oxoid), teste da oxidase, utilizando fitas de oxidase da marca Newprov, e coloração de Gram para estudo da morfologia bacteriana. As cepas suspeitas nestes testes, e com características morfológicas de bacilos Gram negativos foram submetidas à identificação bioquímica das espécies através da utilização do kit API 20E da Biomérieux, a partir de uma suspensão bacteriana das culturas suspeitas, contendo 3% NaCl. O resultado das contagens foi obtido pela utilização da Tabela do NMP.

4.9. Análise estatística dos dados

As análises estatísticas dos dados foram realizadas através da utilização do programa *Statistica 6.0*[®]. Os resultados das análises de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli*, tanto das águas onde os moluscos são cultivados, quanto das ostras foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para comparação do nível de contaminação nas diferentes regiões ao longo de um ano. Havendo diferença estatística a um nível de 5%, foram aplicados testes de comparações múltiplas (CAMPOS, 1983), com $\alpha = 0,05$.

Para comparação dos parâmetros físico-químicos, e das contagens de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* nas diferentes regiões de cultivo, os resultados foram submetidos a uma análise de variância ANOVA, utilizando um nível de significância de 5%. Havendo diferença entre as médias, foi aplicado o teste de Tukey para compará-las.

O estudo da existência de correlação entre os microrganismos da água de cultivo e da carne das ostras, assim como a correlação entre estes microrganismos e parâmetros físico-químicos tanto nas águas onde os moluscos são cultivados, como nas ostras foi realizado através do teste não paramétrico de correlação de *Spearman*. A influência do acumulado pluviométrico mensal e acumulado pluviométrico da semana anterior à coleta nas contagens dos diferentes microrganismos nas águas onde os moluscos são cultivados e carne de ostras, foi avaliada através da análise de regressão linear.

Para avaliar a correlação entre os parâmetros físico-químicos e incidência de *Vibrio spp.* foi utilizada a correlação de *Pearson*, também através da utilização do programa *Statistica 6.0*[®].

Para fins de cálculos estatísticos, sempre que os resultados obtidos na tabela do NMP foram < 3 NMP/g, estes foram substituídos pelo número inteiro imediatamente inferior, ou seja, 2 NMP/g. Quando os resultados obtidos foram $< 1,8$ NMP/100ml e $> 1,6 \times 10^3$ NMP/100ml, estes foram substituídos pelo número decimal imediatamente inferior e superior, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Água de cultivo

5.1.1. Análises físico-químicas

5.1.1.1. Temperatura

As coletas foram realizadas nas quatro diferentes estações do ano, sendo que a temperatura mínima registrada foi de 18°C e a máxima 29°C, e a temperatura média das águas das seis regiões de cultivo da Baía Sul foi de 23°C. Não foi observada diferença estatística entre as médias de temperatura das quinze coletas, nas diferentes regiões de cultivo ($p > 0,05$).

Galvão, (2004), estudando áreas de cultivos de moluscos bivalves na região litorânea de São Paulo, encontrou uma amplitude de variação reduzida em relação a este estudo, ficando as temperaturas naquela região entre 25 e 30°C. Pesquisa realizada no México, por Téllez *et al*, 1999, monitorando águas de cultivo de ostras em La Laguna Madre, Tamaulipas, entre setembro 1997 e fevereiro de 1998, observaram uma amplitude de variação na temperatura da água ainda mais reduzida, se mantendo entre 21 e 23°C.

Em estudo realizado por Curtius *et al*, (2003), em três diferentes regiões de cultivo da Ilha de Santa Catarina, incluindo a região do Ribeirão da Ilha, a temperatura média das águas nesta região, nos meses de abril e outubro de 1999, foram respectivamente, 20,4°C e 19°C, enquanto nos mesmos meses de 2000, foram registradas temperaturas médias superiores, ou seja, 22,3°C e 23,5°C, respectivamente. Estes valores foram muito próximos aos das temperaturas observadas nas seis regiões de estudo deste monitoramento, que no mês de abril 2006, estiveram entre 22°C e 23,5°C, e no mês de outubro 2006, entre 22°C e 24°C.

Observando a figura 6, foi possível visualizar o comportamento da temperatura das águas onde os moluscos são cultivados nas diferentes regiões durante as quinze coletas realizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.

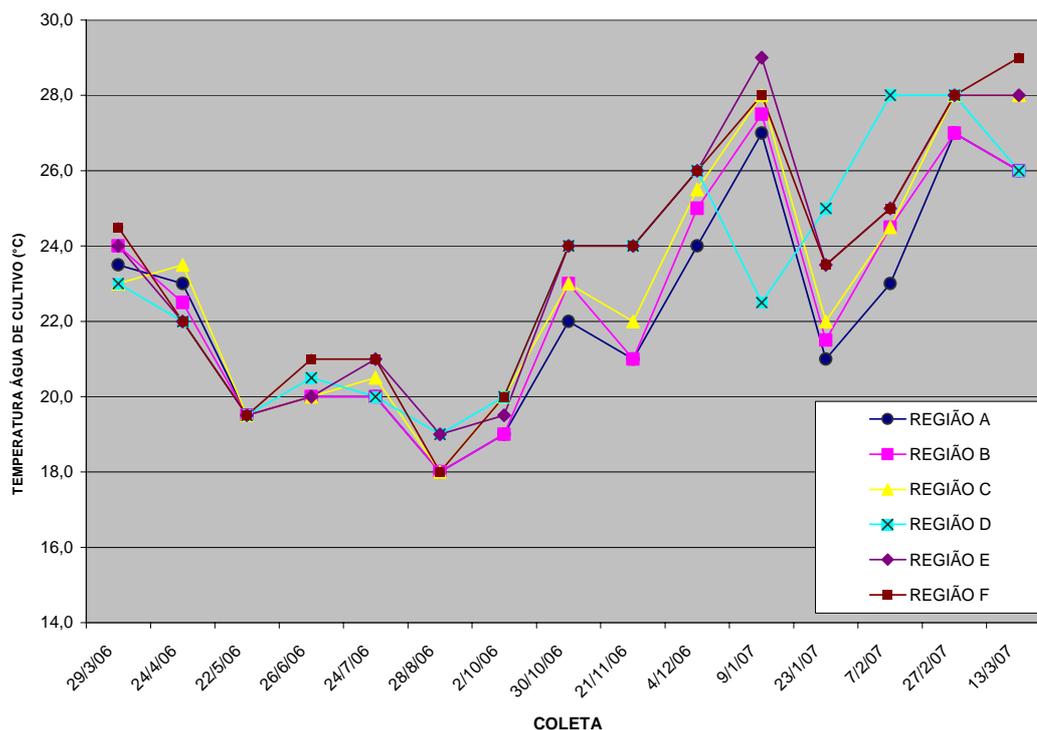


Figura 6 – Temperatura da água nas seis regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina nas quinze coletas realizadas.

5.1.1.2. Salinidade

A salinidade mínima ficou em 24‰ e a máxima 37‰, sendo a salinidade média encontrada de 33,5‰. Não foi observada diferença estatística entre as médias de salinidade, durante as quinze coletas, nas águas das diferentes regiões de cultivo da Baía Sul ($p > 0,05$).

Observando a figura 7, é possível visualizar a variação na salinidade das águas nas diferentes regiões, durante as quinze coletas realizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina. Archer & Moretto, (1994), estudando a salinidade de águas em áreas de cultivo de moluscos, na praia da Pinheira, no município de Palhoça, próximo a Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, encontraram uma média de salinidade de 35,6‰, entre os meses de janeiro e março de 1993, sendo o valor mínimo encontrado de 35,0‰ e o máximo 36,5‰. No presente estudo, a amplitude na salinidade, durante esta mesma época do ano permaneceu entre 33‰ e 37‰. Curtius *et al*, 2003, encontraram valores de salinidade entre 29,6‰ e 35,0‰, e 29,7‰ e 37,0‰, nas regiões do Ribeirão da Ilha e praia da Pinheira, respectivamente, durante abril e outubro de 1999 e 2000. Permanecendo todos estes valores encontrados pelos autores acima citados, nas águas da Baía Sul, dentro da faixa entre o valor mínimo e o valor máximo deste estudo.

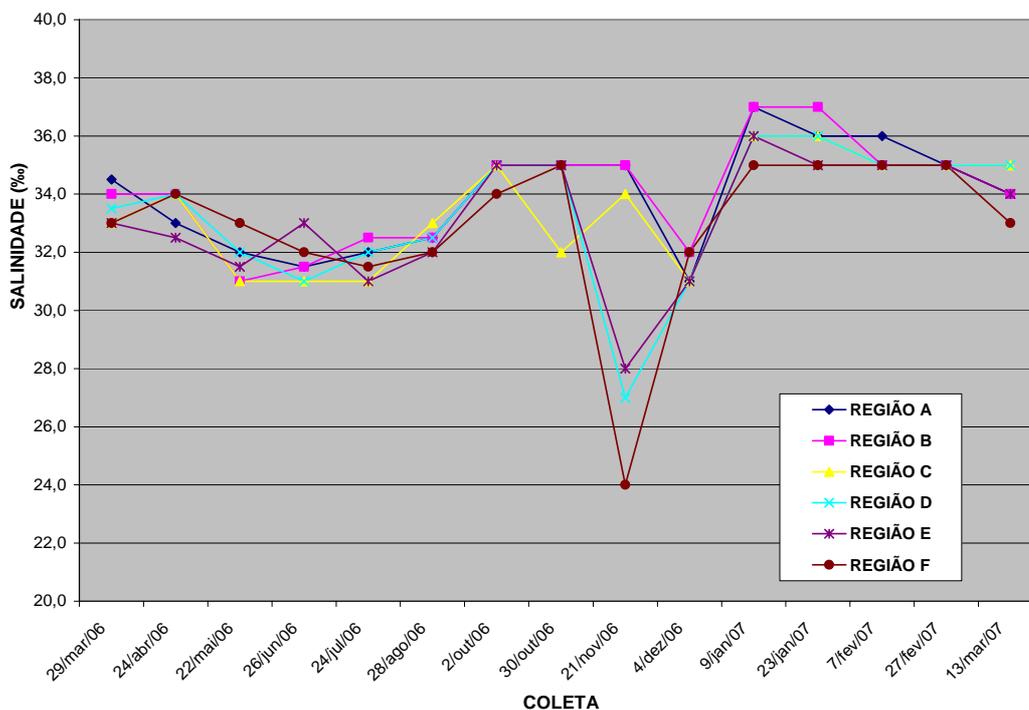


Figura 7 - Salinidade nas seis regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina nas quinze coletas realizadas.

As menores salinidades foram observadas nas regiões D, E e F, e foram registradas no mês de novembro de 2006, mesmo mês em que foram observados os maiores índices pluviométricos, tanto no acumulado mensal, quanto na semana anterior a coleta, o que parece explicar a queda na salinidade das águas nestas regiões, devido, provavelmente, ao grande volume de água das enxurradas que deságuam na Baía Sul, especialmente nestas regiões localizadas mais internamente na Baía.

5.1.1.3. Turbidez

Foi observada uma turbidez média de 3,72 UNT – Unidade Nefelométrica de Turbidez, alcançando um pico de 16,42 UNT, na região da Tapera do Ribeirão, no mês de dezembro de 2006. Esta elevada turbidez observada na região B pode ter alguma relação com a menor profundidade deste ponto de coleta e influência de correntes marinhas. Na primeira coleta de janeiro de 2007 todas as regiões apresentaram turbidez 0,0 UNT, como pode ser observado na figura 8. Não foi observada diferença estatística entre as médias de turbidez das quinze análises realizadas nas seis diferentes regiões de cultivo ($p > 0,05$). Galvão *et al*, (2006), encontraram uma média de turbidez ainda menor, de 0,67 UNT, em águas de cultivo mexilhões, em Ubatuba, São Paulo, com uma turbidez máxima de 1,15 UNT e mínima de 0,30 UNT. Curtius *et al*, (2003), avaliando a turbidez em três regiões de cultivo da Ilha de

Santa Catarina: Ribeirão da Ilha, na Baía Sul, Praia da Pinheira, próximo a Baía Sul e Sambaqui, na Baía Norte, encontraram valores de turbidez que variaram entre 1,0 - 8,5 UNT, no Ribeirão da Ilha, e entre 0,6 – 20,6 UNT na Pinheira, valores estes próximos ao observado neste estudo, enquanto na localidade de Sambaqui, na Baía norte da Ilha, foram encontrados valores mais altos de turbidez, que ficaram entre 3,8 e 90,6 UNT.

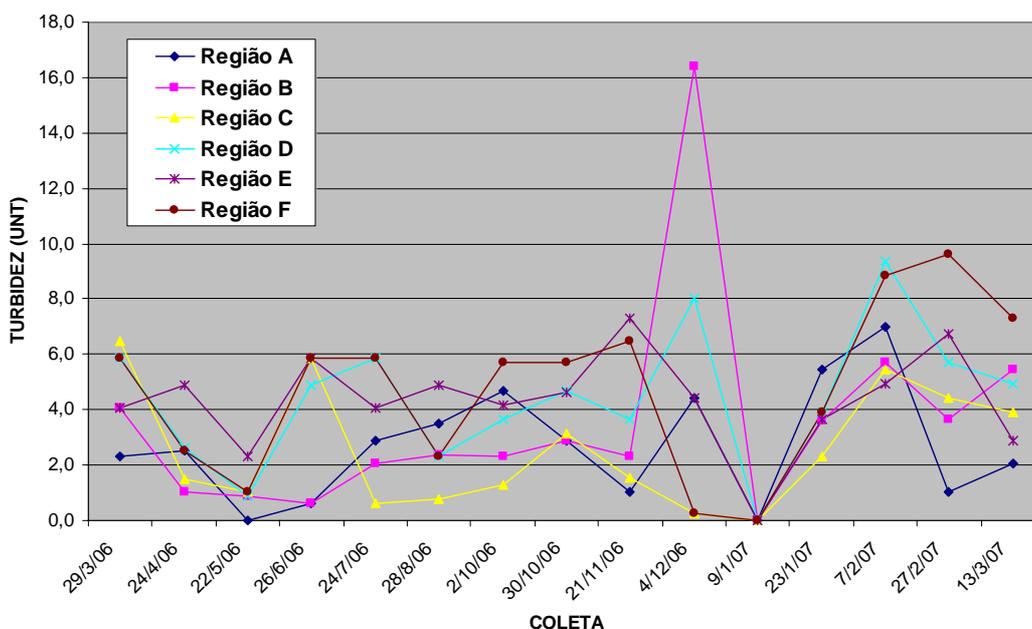


Figura 8 - Turbidez nas seis regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina nas quinze coletas realizadas.

5.1.1.4. pH

A amplitude de pH observada nas águas da Baía Sul foi de 7,9 a 8,3, estando estes valores em acordo com os valores estabelecidos na legislação vigente, Resolução CONAMA 357/2005, para águas salinas de classe I, as quais devem ter um pH entre 6,5-8,5 não devendo ultrapassar 0,2 unidades.

O pH médio nas águas da Baía Sul durante o período de monitoramento foi de 8,1, estando de acordo com os resultados encontrados por Curtius *et al*, (2003), que encontraram um pH em torno de 8,0 nas três regiões de estudo, sendo uma delas localizada nesta mesma Baía. Não foi observada diferença estatística significativa entre as médias de pH nas seis diferentes regiões ($p > 0,05$).

Ferreira *et al* (2004), avaliando parâmetros físico-químicos em cinco diferentes regiões de cultivo da Grande Florianópolis: Sambaqui, Santo Antônio, Ribeirão da Ilha, Enseada e Pinheira, também encontraram um pH médio de 8,1 nas águas. Téllez *et al* (1999), avaliando águas de cultivos de ostras em Laguna Madre, no México, encontraram um pH constante e ligeiramente básico, em torno de 8.1 em todo estudo, mesma média obtida neste estudo.

5.1.2. Análises microbiológicas

5.1.2.1. Coliformes a 35°C

As contagens de coliformes a 35°C variaram de $< 1,8$ a $> 1,6 \times 10^3$ NMP/100ml, nas diferentes regiões de cultivo, sendo que nas regiões E, D e F foram registrados as maiores contagens, respectivamente, tanto em relação à média geométrica, quanto ao percentil 90. Foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas contagens estimativas nas diferentes regiões, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Incidência de coliformes a 35°C durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.

REGIÃO CULTIVO	MÉDIA GEOMÉTRICA (NMP/100 ml)*	PERCENTIL 90 (NMP/100 ml)*
A	2,39 ^a	4,5
B	3,30 ^{a b}	17,0
C	2,89 ^a	11,0
D	12,49 ^{b c}	130,0
E	31,50 ^c	220,0
F	11,19 ^{a b c}	130,0

Nota: * NMP/100 ml = Número mais provável em 100 ml

As médias que não possuem letras em comum entre si, apresentaram diferença estatística ao nível de 5% ($H = 32,4034$, $p < 0,05$).

A região E apresentou uma incidência significativamente maior ($\alpha = 0,05$) de coliformes a 35°C que a região A, B e C, enquanto a região D apresentou uma contaminação significativamente maior apenas que as regiões A e C, que apresentaram as menores médias de contagem de coliformes a 35°C de toda Baía Sul.

Embora o monitoramento de coliformes a 35°C não esteja contemplado na legislação brasileira em vigor, Resolução CONAMA 357/2005, se avaliássemos as regiões de cultivo em estudo, com base no National Shellfish Sanitation Program (NSSP) do FDA/US – em sua última revisão – 2005, onde a média geométrica de coliformes a 35°C de 15 amostras coletadas no mesmo ponto não deverá ultrapassar 70 NMP/100ml, com não mais de 10% das amostras excedendo a 230 NMP/100ml (UNITED STATES, 2005), teríamos todas as regiões deste estudo, aprovadas para o cultivo de moluscos bivalves.

Galvão, (2004), monitorando por um ano águas de cultivos de mexilhões em Ubatuba, São Paulo, encontrou contagens de coliformes a 35°C, que variaram de < 3 a $3,6 \times 10^2$ NMP/100ml, valores estes que superam as contagens mínimas e máximas obtidas nas regiões A, B, que ficaram entre $< 1,8$ e $1,7 \times 10$ NMP/100ml, e C de $< 1,8$ e $3,3 \times 10$ NMP/100ml. No entanto em relação às regiões D, E e F a situação é inversa, pois nestas regiões as contagens atingiram $5,4 \times 10^2$ NMP/100ml na região D, e $>1,6 \times 10^3$ NMP/100ml para as regiões E e F.

Correlacionando as contagens de coliformes a 35°C com temperatura, salinidade, turbidez e pH, observou-se que a temperatura e o pH não apresentaram correlação estatística com a contagem de coliformes a 35°C, enquanto a salinidade apresentou uma fraca correlação negativa (Spearman $R = - 0,22$; $p = 0,0363$), e a turbidez uma fraca correlação positiva (Spearman $R = 0,34$; $p = 0,0011$).

Através da análise de regressão linear, foi possível observar que a contagem média de coliformes a 35°C nas águas, considerando a Baía Sul como um todo, foi influenciada, tanto pelo acumulado pluviométrico mensal ($\beta = 0,678$; $p < 0,05$), quanto pelo acumulado pluviométrico da semana anterior a coleta ($\beta = 0,612$; $p < 0,05$).

5.1.2.2. Coliformes a 45°C

As contagens de coliformes a 45°C nas águas das diferentes regiões da Baía Sul oscilaram entre $< 1,8$ e $9,2 \times 10^2$ NMP/100 ml, sendo que as regiões E, D e F, assim como nas contagens de coliformes a 35°C, apresentaram as maiores médias geométricas de contaminação, e os maiores percentis 90, respectivamente (Tabela 2), embora todas as regiões tenham apresentado médias de contagens de coliformes a 45°C e percentis 90, abaixo dos limites estabelecidos, atendendo a Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005). Furlan,

(2004), monitorando a qualidade das águas em cultivos de moluscos no litoral de São Paulo, encontrou contagens pouco mais baixas de coliformes a 45°C que, oscilaram entre < 3 e $4,6 \times 10^2$ NMP/100ml.

Tabela 2 - Incidência de coliformes a 45°C nas águas durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.

REGIÃO CULTIVO	MÉDIA GEOMÉTRICA (NMP/100 ml)*	PERCENTIL 90 (NMP/100 ml)*
A	2,17 ^a	4,5
B	2,90 ^{a b}	13,0
C	2,42 ^a	6,8
D	5,28 ^{a b}	49,0
E	9,42 ^b	79,0
F	3,51 ^{a b}	17,0

Nota: * NMP/100 ml = Número mais provável em 100 ml

As médias que não possuem letras em comum entre si, apresentaram diferença estatística ao nível de 5% ($H = 15,1589$, $p < 0,05$).

Foi observada uma diferença estatística entre no nível de contaminação da região mais contaminada, região E, e regiões menos contaminadas, região A e C, a um nível de significância de 5%. É possível que a região E apresente contagens superiores tanto de coliformes a 35°C como a 45°C, por se encontrar em uma região geográfica que não permite uma circulação eficiente das águas onde os moluscos são cultivados, dificultando, caso estejam ocorrendo despejos de esgoto doméstico e outros dejetos, que estes se diluam rapidamente.

No mês de novembro de 2006 foram registradas as maiores contagens, tanto de coliformes a 35°C, quanto de coliformes a 45°C, sendo que neste mês foi registrado o maior acumulado pluviométrico mensal, totalizando 246 mm³, destes 101,3 mm³ registrados na semana anterior a coleta. Na análise de regressão linear, a média das contagens de coliformes a 45°C nas águas, considerando a Baía Sul como um todo, foi influenciada tanto pelo acumulado pluviométrico mensal ($\beta = 0,714$; $p < 0,05$), quanto pelo acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta ($\beta = 0,657$; $p < 0,05$), conforme pode ser observado nas figuras 9 e 10.

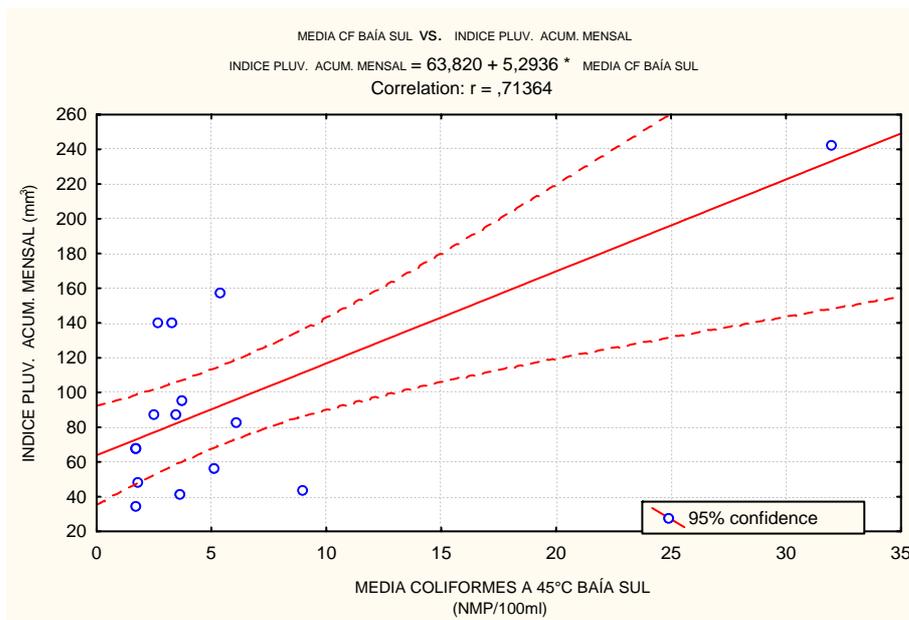


Figura 9 - Correlação bivariada entre contagens de coliformes a 45°C nas águas da Baía Sul e acumulado pluviométrico mensal na região da grande Florianópolis.

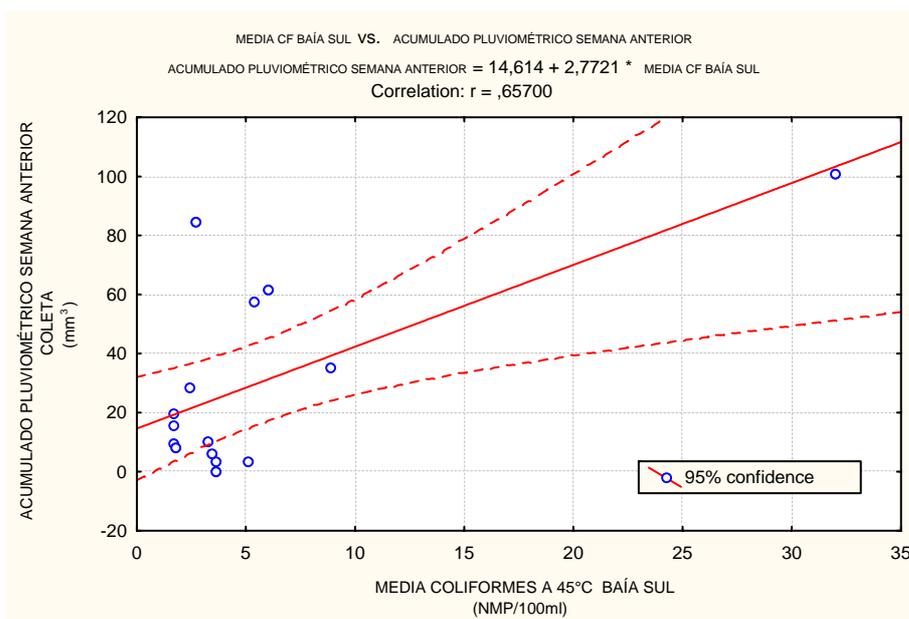


Figura 10 - Correlação bivariada entre contagens de coliformes a 45°C nas águas da Baía Sul e acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta na região da grande Florianópolis.

Correlacionando as contagens de coliformes a 45°C com temperatura, salinidade, turbidez e pH observou-se que a salinidade e o pH não apresentaram correlação estatística com a contagem de coliformes a 45°C, enquanto a temperatura (Spearman $r = 0,20$; $p = 0,0479$) e a turbidez (Spearman $r = 0,26$; $p = 0,0115$) apresentaram uma fraca correlação positiva.

Foi encontrada uma correlação positiva (Spearman $r = 0,703679$; $p = 0,0000$) entre as contagens de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C nas águas onde os moluscos são cultivados da Baía Sul, como pode ser observado na figura 11.

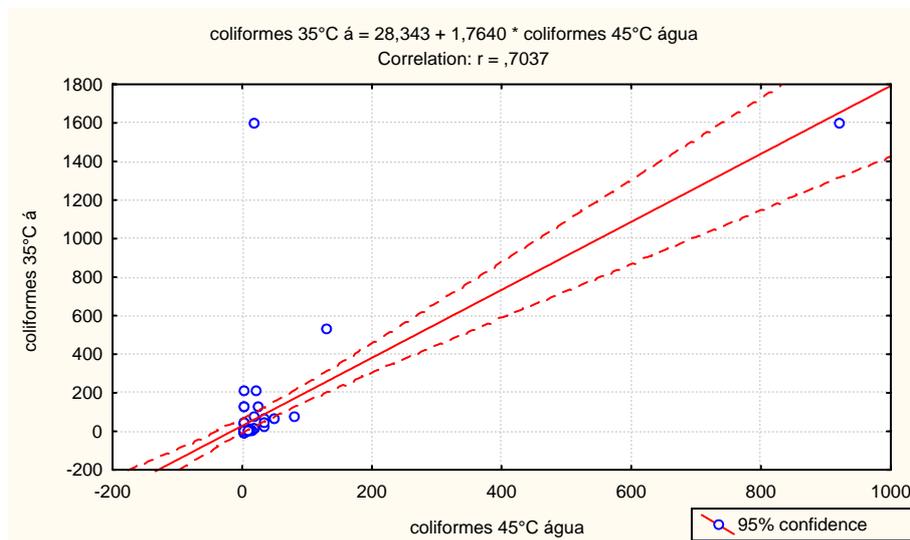


Figura 11 - Correlação entre as contagens de coliformes a 35°C e 45°C nas águas onde os moluscos são cultivados da Baía Sul.

Quando observadas as correlações entre coliformes a 35°C e coliformes a 45°C em cada região individualmente, todas outras regiões, com exceção da região E, apresentaram fortes correlações positivas (tabela 3). Galvão, (2004), também encontrou correlações positivas muito altas entre coliformes a 35°C e coliformes a 45°C nas águas de duas das três regiões de cultivo estudadas.

Tabela 3 - Correlações entre coliformes a 35 e 45°C nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.

REGIÃO	CORRELAÇÃO SPEARMAN	P VALOR
A	0,68	0,00524
B	0,87	0,00002
C	0,76	0,00109
D	0,55	0,03243
E	0,35*	0,19520
F	0,67	0,00567

* Não apresentou correlação estatística $p > 0,05$.

5.1.2.3. *Escherichia coli*

Foi avaliada tanto a presença ou ausência de *Escherichia coli* (*E. coli*), como realizada sua contagem, nas amostras de águas onde os moluscos são cultivados. Os resultados para presença ou ausência foram expressos em percentual de isolamento, sendo que 42% das amostras analisadas confirmaram a presença de *E. coli*. As regiões D, E e F apresentaram as maiores incidências, seguidas da região B, A e C, respectivamente (tabela 4).

Tabela 4 - Ocorrência de *E. coli* em águas onde os moluscos são cultivados de diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.

Região	N° amostras analisadas	<u>Amostras Positivas <i>E. coli</i></u>	
		N°	%
A	15	4	26,7
B	15	7	46,7
C	15	3	20,0
D	15	8	53,0
E	15	8	53,0
F	15	8	53,0
Total	90	38	42,0

Na coleta do mês de novembro de 2006, todas as amostras de água de cultivo das diferentes regiões, apresentaram a presença de *E. coli*, coincidindo com elevadas contagens de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, e com o maior acumulado pluviométrico mensal, que atingiu um volume de 246 mm³. No entanto, na análise de regressão linear o acumulado pluviométrico mensal e o acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta, não interferiram significativamente no percentual de isolamento de *E. coli*, embora também tenha sido obtida nesta coleta a maior média de *E. coli* nas águas dos cultivos, considerando a Baía Sul como um todo.

As contagens de *E. coli* nas amostras de água de cultivo variaram entre < 1,8 e 79,0 NMP/100ml, sendo que não houve diferença estatística entre as contagens nas diferentes regiões de estudo ($H=10,74573$; $p > 0,05$). As regiões E, D e F apresentaram as maiores médias geométricas de *E. coli*, assim como observado para coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, e os maiores percentis 90 foram observados nas regiões D e E (tabela 5).

Tabela 5 - Contagens de *Escherichia coli* durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.

REGIÃO CULTIVO	MÉDIA GEOMÉTRICA (NMP/100 ml)*	PERCENTIL 90 (NMP/100 ml)*
A	1,84 ^a	2,0
B	2,62 ^a	7,8
C	2,36 ^a	4,5
D	3,43 ^a	49,0
E	5,41 ^a	33,0
F	3,01 ^a	6,8

Nota: * NMP/100 ml = Número mais provável em 100 ml

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa a um nível de 5% (H = 10,74573; $p > 0,05$).

Foram encontradas correlações positivas, tanto entre contagens de coliformes a 35°C e *E. coli* (Spearman $r = 0,66$; $p = 0,000000$), como entre contagens de coliformes a 45°C e *E. coli* (Spearman $r = 0,86$; $p = 0,000000$), o que já era esperado, visto que *E. coli* é principal bactéria do grupo dos coliformes a 45°C.

Não foram observadas correlações estatísticas entre as contagens de *Escherichia coli* e temperatura, salinidade e pH das águas onde os moluscos são cultivados, apenas a turbidez apresentou uma fraca correlação positiva (Spearman $r = 0,28$; $p = 0,0065$).

5.1.2.4. Classificação das águas onde os moluscos são cultivados

Todas as regiões monitoradas atendem aos parâmetros estabelecidos na atual legislação vigente no Brasil, através da resolução CONAMA 357/2005, tanto em relação à média geométrica, quanto em relação ao percentil 90. Ainda segundo esta resolução, esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras, quesito este que se aplica as análises realizadas nas seis diferentes regiões de cultivo da Baía Sul, visto que, tanto no ano de 2006, quanto no ano de 2007 foram realizadas estas 5 coletas, permitindo que estas regiões sejam classificadas como aptas para o cultivo de moluscos bivalves. No entanto, as elevadas contagens de coliformes a 45°C encontradas isoladamente em algumas amostras, reforçam a necessidade de um programa contínuo de monitoramento da

qualidade das águas onde são cultivados os moluscos bivalves, garantindo assim, a segurança alimentar do consumidor.

5.2. Índice pluviométrico

Os dados pluviométricos fornecidos pela EPAGRI, provenientes da estação São José, na região da grande Florianópolis foram analisados tanto em relação ao acumulado pluviométrico mensal, como pelo acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta (figuras 12 e 13).

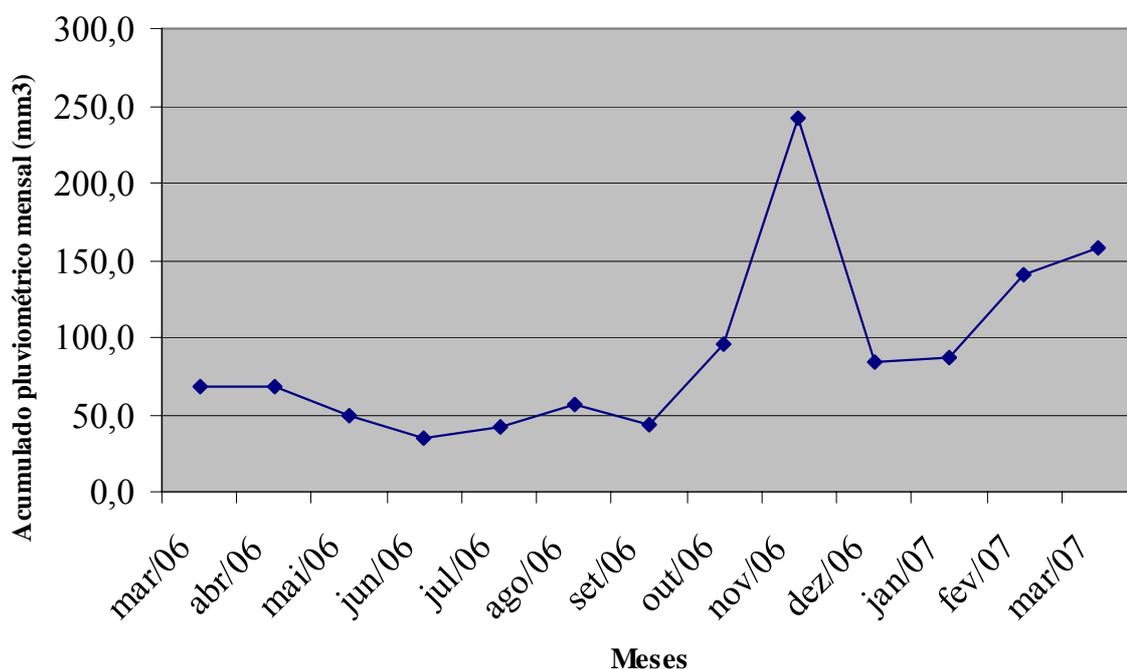


Figura 12 - Acumulado pluviométrico mensal na região da grande Florianópolis.

Ambos tiveram seus picos registrados no mês de novembro de 2006, quando o acumulado mensal atingiu $242,6 \text{ mm}^3$, e o acumulado na semana anterior à coleta atingiu $101,3 \text{ mm}^3$. O menor valor, para o acumulado mensal, $35,2 \text{ mm}^3$, foi registrado em junho de 2006, enquanto o da semana anterior à coleta, $0,4 \text{ mm}^3$, foi registrado no mês de julho do mesmo ano.

Observou-se que as chuvas foram mais intensas nos meses da primavera e do verão, tanto no acumulado pluviométrico mensal, quanto no acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta.

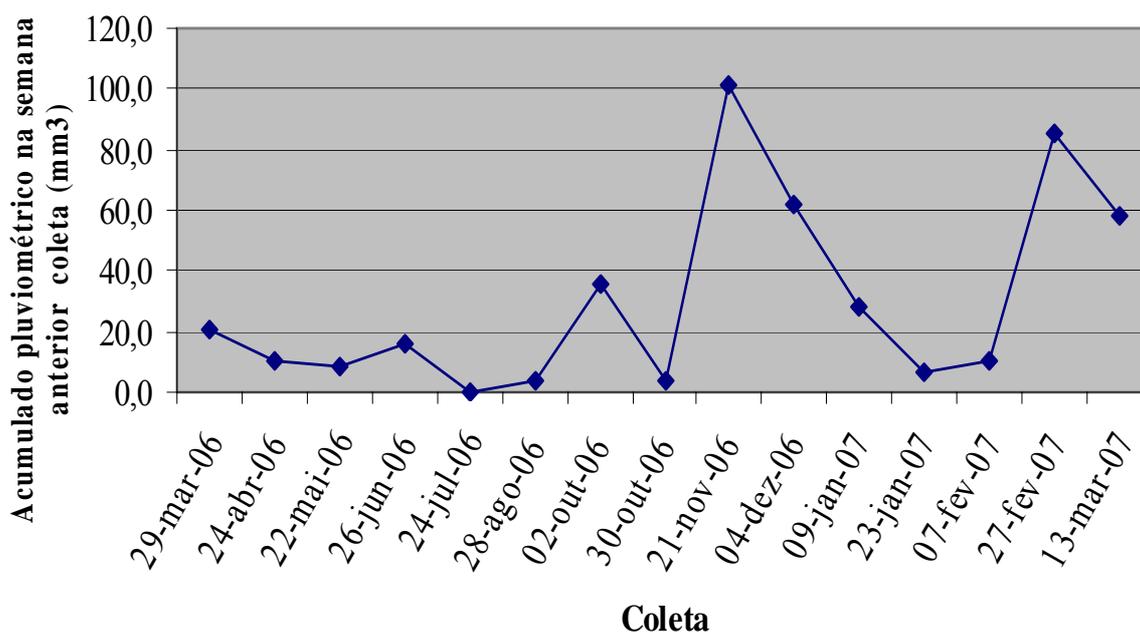


Figura 13 - Acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta na região da grande Florianópolis.

5.3. Ostras

5.3.1. Análises físico-químicas

5.3.1.1. pH

Os valores de pH das ostras provenientes das diferentes regiões da Baía Sul variaram entre 5,7 e 6,6, sendo o pH médio observado de 6,1. O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1980) não estabelece limites de pH para moluscos, apenas para peixes. Galvão (2006) ressalta a necessidade de estudos específicos quanto aos limites de pH para moluscos bivalves, visto que estes apresentam composição centesimal diversificada quando comparada a outras espécies de pescado, apresentando um outro padrão de decomposição e alteração do pH. De acordo com a escala de pH apresentada por Jay, (2005), 66% das amostras deste estudo apresentaram boa qualidade microbiológica, 4% qualidade inadequada (pouco) e apenas 1% classificadas com inadequada (muito), além disso, 29% das amostras apresentaram valores de pH acima de 6,2, não estando contempladas nesta escala. Segundo Cook, (1991) um pH acima de 6,0 para carne das ostras é considerado bom, e para ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) vivas tem sido observado um pH de 6,5.

Téllez *et al.*, (1999), monitorando a qualidade de ostras (*Crassostrea virginica*) em “La Laguna Madre”, no México, por seis meses, encontraram valores de pH entre 6,0 e 7,0, enquanto Oliveira *et al.*, (2006), que monitoraram a qualidade de ostras (*Crassostrea gigas*) cultivadas no Alaska, nos Estados Unidos, durante o período de um ano, encontraram valores de pH entre 6,6 e 6,9, apresentando uma alteração menor que 0,4, durante todo o ano, enquanto no presente estudo encontramos diferenças de até 0,9 ao longo do ano.

Não foram observadas diferenças estatísticas, a um nível de significância de 5%, entre as médias de pH das ostras nas diferentes regiões de cultivo, no entanto foi observada uma diferença estatística significativa, em relação ao pH médio das ostras encontrado nas diferentes estações do ano, sendo que no verão foi encontrado um pH médio na carne dos moluscos, significativamente menor em relação às outras estações do ano, assim como no inverno foi observado uma situação inversa, com um valor médio de pH significativamente maior, em relação às outras estações do ano (Tabela 6), o que parece estar relacionado ao estágio de maturação sexual dos moluscos, especialmente ao metabolismo do glicogênio.

Tabela 6 - pH nas amostras de ostras, segundo as diferentes estações do ano.

Estações	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Média pH	6,2 ^a	6,4 ^b	6,2 ^a	6,0 ^c

As médias seguidas por letras diferentes, apresentaram diferença estatística ao nível de 5% (F = 25,03; p < 0,05).

5.3.2. Análises microbiológicas

5.3.2.1. Coliformes a 35°C

Em relação às contagens de coliformes a 35°C nas amostras de ostras, estas variaram de < 3,0 a $2,5 \times 10^2$ NMP/g, sendo que as ostras provenientes das regiões E, D e F apresentaram as maiores médias geométricas de contaminação, respectivamente, assim como foi observado nas águas onde os moluscos são cultivados.

Em pesquisa realizada por Pereira *et al.*, (2006), avaliando ostras *Crassostrea gigas* provenientes de três regiões de cultivo de Florianópolis, Santa Catarina, foram obtidas contagens entre < 3 e $> 1,1 \times 10^3$ NMP/g, no entanto, considerando apenas a região do Ribeirão da Ilha, mesma região deste estudo, as contagens foram mais baixas, oscilando entre

< 3 e $1,5 \times 10^2$ NMP/g, valores estes, semelhantes aos encontrados neste estudo. Silva *et al*, (2003), encontraram contagens entre < 1,8 e $> 1,6 \times 10^3$ NMP/g de coliformes a 35°C em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas no estuário do Rio Cocó, no estado do Ceará, Brasil, apresentando uma amplitude maior de contaminação em relação aos resultados obtidos no presente estudo, ao contrário de Oliveira *et al*, (2006), que encontraram uma pequena amplitude de contaminação, com contagens de coliformes a 35°C entre < 3 e 3×10 NMP/g em ostras *Crassostrea gigas* cultivadas no Alaska.

Segundo Galvão, (2004), embora a legislação atual, RDC 12/2001 - ANVISA não apresente padrão de coliformes a 35°C para este tipo de alimento, a pesquisa deste grupo permite que se tenham dados sobre a qualidade higiênico-sanitária destes, visto que a contagem de coliformes totais corresponde ao total dos microrganismos Gram-negativos, fermentadores de lactose, da família Enterobacteriaceae encontrados em uma amostra.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias de contaminação das ostras provenientes das diferentes regiões de estudo, embora as maiores médias de contaminação tenham sido observados nas regiões E, D e F (tabela 7). Isto também pode ser observado em relação ao percentil 90.

Tabela 7 - Contagens de coliformes a 35°C nas ostras durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.

REGIÃO CULTIVO	MÉDIA GEOMÉTRICA (NMP/g)*	PERCENTIL 90 (NMP/g)*
A	2,09 ^a	2,5
B	3,14 ^a	5,5
C	2,47 ^a	6,5
D	4,17 ^a	9,5
E	6,26 ^a	48,5
F	3,84 ^a	16,0

Nota: * NMP/g = Número mais provável por grama; Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença estatística a um nível de 5% (H = 15,08; p < 0,05).

Foi observada uma correlação positiva entre as contagens de coliformes a 35°C nas águas onde os moluscos são cultivados e nas ostras (Spearman r = 0,51; p < 0,05), o que

ressalta a importância do monitoramento da qualidade das águas onde são cultivados os moluscos bivalves.

Não foi observada correlação estatística entre contagens de coliformes a 35°C e parâmetros físico-químicos de temperatura (Spearman $r = -0,01$; $p = 0,9348$), salinidade (Spearman $r = -0,06$; $p = 0,5953$) e turbidez (Spearman $r = 0,06$; $p = 0,5505$).

5.3.2.2. Coliformes a 45°C

As contagens de coliformes a 45°C nas ostras variaram de < 3 a 8×10 NMP/g, sendo que 77% das amostras apresentaram contagens de < 3 NMP/g. A maior contagem foi observada no mês de dezembro, na região B, no entanto, a região E apresentou a maior média geométrica de coliformes a 45°C em relação às outras regiões.

Embora a legislação brasileira em vigor não estabeleça limites de coliformes a 45°C para moluscos bivalves *in natura* refrigerados ou congelados, se considerarmos a portaria 451/1997 do Ministério da Saúde, já revogada, a qual estabelecia como limite de coliformes a 45°C até 10^2 NMP/g, todas as amostras analisadas atenderiam a esta legislação.

Galvão, (2004), monitorando a qualidade de mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral de São Paulo, encontrou contagens de coliformes a 45°C que variaram de 3,2 a $3,3 \times 10^2$ NMP/g, valores estes superiores aos encontrados neste estudo. Pereira *et al*, (2006), encontraram níveis de contaminação em ostras *Crassostrea gigas* muito semelhantes aos obtidos neste estudo, considerando apenas a área de cultivo do Ribeirão da Ilha, mesma região deste estudo, com contagens que oscilaram entre < 3 e $9,3 \times 10$ NMP/g, sendo que 73% das amostras apresentaram contagens < 3 NMP/g.

Não foram observadas diferenças estatísticas nas médias de contaminação das diferentes regiões de cultivo da Baía Sul, como pode ser observado na tabela 8. Assim como a maior média geométrica, a região E apresentou o maior percentil 90.

Tabela 8 - Contagens de coliformes a 45°C nas ostras durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.

REGIÃO CULTIVO	MÉDIA GEOMÉTRICA (NMP/g)*	PERCENTIL 90 (NMP/g)*
A	2,09 ^a	2,5
B	2,68 ^a	4,0
C	2,11 ^a	3,0
D	2,60 ^a	6,0
E	4,31 ^a	23,5
F	2,74 ^a	6,5

Nota: * NMP/g = Número mais provável por grama;

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística a um nível de 5% ($H = 9,7551$; $p > 0,05$).

Foi observada uma correlação estatística positiva entre as contagens de coliformes a 45°C na água de cultivo e nas ostras (Spearman $r = 0,53$; $p = 0,00000$). No entanto, nas coletas em que foram obtidas as maiores contagens de coliformes a 45°C nas ostras, as águas onde os moluscos são cultivados apresentaram contagens inferiores às observadas na carne dos moluscos. A alimentação por filtração efetuada pelas ostras concentra os coliformes presentes no ambiente marinho. Um fator que pode explicar este fato é que os patógenos e indicadores bacterianos podem sobreviver mais tempo em bivalves do que em água do mar, além disso, nos bivalves eles podem se reproduzir (SOLIC *et al*, 1999).

Não foram observadas correlações estatísticas entre parâmetros físico-químicos e contagens de coliformes a 45°C nas ostras, como temperatura (Spearman $r = 0,12$; $p = 0,2510$), salinidade (Spearman $r = - 0,02$; $p = 0,8251$) e turbidez (Spearman $r = - 0,01$; $p = 0,9448$). Silva *et al*, (2003), também não encontraram correlações estatísticas significativas entre parâmetros físico-químicos (temperatura, salinidade e pH) e concentrações de coliformes totais (35°C) e coliformes fecais (45°C) em amostras de ostras.

Segundo a análise de regressão linear múltipla, avaliando as regiões independentemente, tanto o índice pluviométrico acumulado mensal ($\beta = 0,2684$; $p > 0,05$), quanto o acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta ($\beta = - 0,0682$; $p > 0,05$), não influenciaram a contagem de coliformes a 45°C nas ostras das diferentes regiões. No entanto, quando avaliamos a influência do índice pluviométrico, considerando a média de

contaminação das ostras da Baía Sul como um todo, o acumulado pluviométrico mensal apresentou uma influência significativa ($\beta = 0,537$; $p < 0,05$), enquanto o acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta não influenciou os resultados ($\beta = 0,323$; $p > 0,05$).

Da mesma maneira que ocorreu nas águas onde os moluscos são cultivados, foi observada uma correlação positiva significativa entre a contagem de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C na carne dos moluscos, como pode ser observado na figura 14.

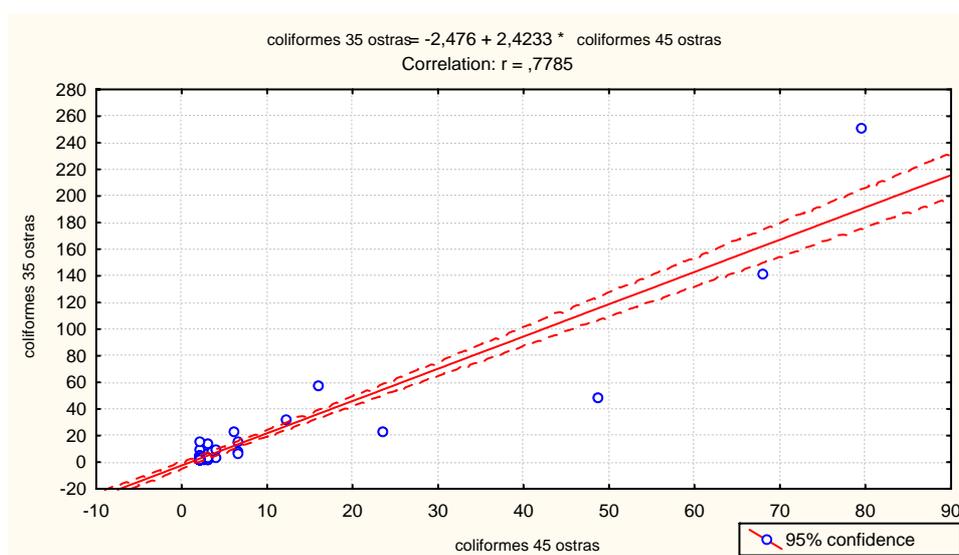


Figura 14 - Correlação entre as contagens de coliformes a 35°C e 45°C nas ostras provenientes de cultivos da Baía Sul.

5.3.2.3. *Escherichia coli*

Visto que a *E. coli* é melhor indicador de contaminação fecal que os outros gêneros e espécies do grupo dos coliformes, é desejável a determinação de sua incidência em uma população de coliformes (JAY, 2005). As contagens de *E. coli* obtidas nas ostras provenientes das seis diferentes regiões foram baixas, variando entre < 3 e $2,6 \times 10$ NMP/g, sendo que 86% (77/90) das contagens tiveram como resultado < 3 NMP/g. Em estudo realizado por Oliveira *et al.* (2006), monitorando a qualidade de ostras *Crassostrea gigas* cultivadas no Alasca, EUA, a contagem de *E. coli* nas ostras oscilou entre < 3 e $2,3 \times 10$ NMP/g, resultados muito semelhantes aos obtidos no presente estudo.

A maior contagem de *E. coli* nas ostras foi observada no mês de novembro, na região F, mesmo mês em que foram observados os maiores níveis de contaminação nas águas dos

cultivos, e registrado o maior acumulado pluviométrico, tanto mensal como na semana anterior a coleta. A região que apresentou a maior média geométrica de *E. coli* nos moluscos, assim como para coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, foi a região E, seguida da região D e F, enquanto na região A, todas contagens obtiveram como resultado < 3 NMP/g. Não foi observada diferença estatística entre as médias de contaminação por *E. coli* nas ostras provenientes das diferentes regiões de estudo (tabela 9). Assim como as médias geométricas, os maiores percentis 90 foram observados nas regiões E e D.

Tabela 9 - Contagens de *Escherichia coli* nas ostras durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul.

REGIÃO CULTIVO	MÉDIA GEOMÉTRICA (NMP/g)*	PERCENTIL 90 (NMP/g)*
A	2,0**	< 3,0
B	2,24 ^a	4,0
C	2,05 ^a	< 3,0
D	2,38 ^a	5,5
E	2,61 ^a	6,5
F	2,37 ^a	< 3,0

Nota: * NMP/g = Número mais provável por grama;

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística a um nível de 5% (H = 11,5408; p = 0,0417).

** Não foi isolada nenhuma cepa de *E. coli*

Observando a incidência de *E. coli*, nas amostras de ostras provenientes de diferentes regiões da Baía Sul, cerca de 10% (18/180) delas confirmaram sua presença, sendo que a região E apresentou a maior incidência, com 26,67% das amostras contaminadas, enquanto a região A não apresentou nenhuma amostra contaminada por *E. coli* (tabela 10).

Tabela 10 - Ocorrência de *E. coli* em amostras de ostras provenientes de diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.

Região	N° amostras analisadas	Amostras Positivas <i>E. coli</i>	
		N°	%
A	30	0	0,00
B	30	3	10,00
C	30	1	3,33
D	30	4	13,33
E	30	8	26,67
F	30	2	6,67
Total	180	18	10,00

Em estudo realizado por Pereira *et al*, (2006), foi encontrada *Escherichia coli* em 9% das amostras de ostras *Crassostrea gigas* coletadas em três diferentes áreas de cultivo de Florianópolis, Santa Catarina, estando de acordo com os resultados apresentados neste estudo.

Foi observada uma correlação estatística positiva entre as contagens de *E. coli* nas águas e nas ostras provenientes das diferentes regiões de cultivo (Spearman $r = 0,41$; $p < 0,05$).

Em relação aos parâmetros físico-químicos não foi observada correlação estatística entre contagens de *E. coli* nas ostras e temperatura da água de cultivo (Spearman $r = - 0,05$; $p > 0,05$), turbidez (Spearman $r = 0,10$; $p > 0,05$), no entanto foi observada uma fraca correlação negativa com o parâmetro salinidade (Spearman $r = - 0,25$; $p < 0,05$), diferente do que foi observado nas águas onde os moluscos são cultivados, onde a salinidade não apresentou correlação com *E. coli*, enquanto a turbidez apresentou uma fraca correlação.

Através da análise de regressão linear múltipla, analisando as regiões independentemente, foi possível observar que tanto o acumulado pluviométrico mensal ($\beta = 0,1698$; $p > 0,05$), quanto o acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta ($\beta = 0,1521$; $p > 0,05$), não influenciaram as contagens de *E. coli* nas amostras de ostras, no entanto, analisando a contaminação das ostras da Baía Sul como um todo, foi observada uma influência tanto do acumulado pluviométrico mensal ($\beta = 0,634$; $p < 0,05$), como do acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta ($\beta = 0,624$; $p < 0,05$).

Foi observada uma correlação positiva entre as contagens de coliformes a 35 e 45°C (figura 15), e contagens de *E. coli* nas amostras de ostras, da mesma maneira que foi observado nas águas onde os moluscos são cultivados, sendo que a correlação é mais forte em relação a coliformes a 45°C (Spearman $r = 0,79$; $p < 0,01$) do que a 35°C (Spearman $r = 0,63$; $p < 0,01$), o que já era esperado já que a maioria dos coliformes a 45°C presentes nas fezes são *Escherichia coli*.

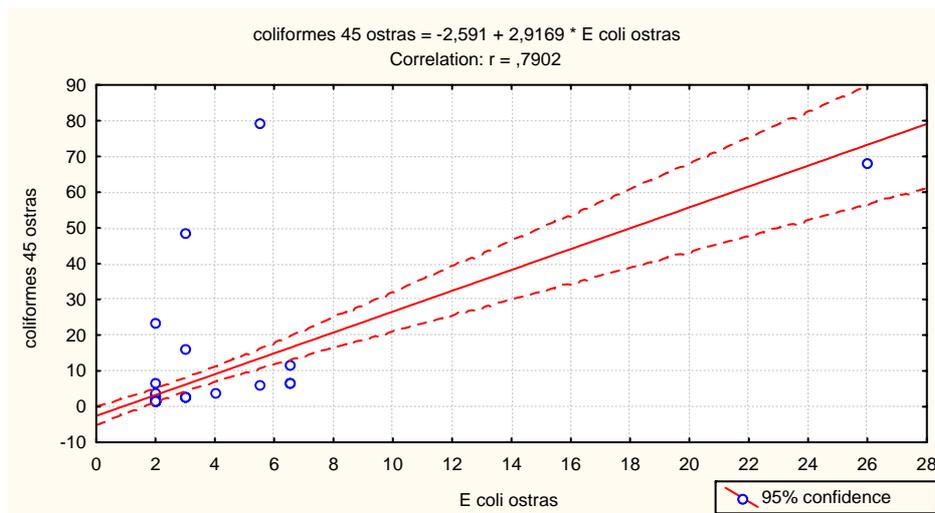


Figura 15 - Correlação entre as contagens de coliformes a 45°C e *E. coli* nas ostras provenientes de cultivos da Baía Sul.

5.3.2.4. Estafilococos coagulase positivo

As contagens de estafilococos coagulase positivo nas amostras de ostras variaram entre < 10 e 1×10^2 UFC/g de amostra (tabela 11). Sendo que as maiores contagens obtidas nas regiões C, D e E foram registradas no mês de setembro, o que não ocorreu nas outras regiões.

Tabela 11 - Contagens mínimas e máximas de estafilococos coagulase-positivos nas amostras de ostras das diferentes regiões.

Região	A	B	C	D	E	F
Contagem mínima (UFC/g)*	$< 10,0$	$< 10,0$	$< 10,0$	$< 10,0$	$< 10,0$	$< 10,0$
Contagem máxima (UFC/g)*	$5,5 \times 10$	$5,1 \times 10$	$2,5 \times 10$	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10$	$2,0 \times 10$

* Unidade formadora de colônia/grama de amostra.

Todas as amostras analisadas encontravam-se não só de acordo com os limites estabelecidos através da RDC 12/2001 – ANVISA, que determina que moluscos bivalves *in natura*, resfriados ou congelados, não consumidos crus, apresentem uma contagem máxima de 10^3 UFC/g de estafilococos coagulase positivo, como apresentando contagens muito aquém destes limites. Segundo Jay, (2005), pode-se esperar a presença de estafilococos, mesmo que em pequenas quantidades, em quase todos os alimentos de origem animal.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas, a um nível de 5%, entre as médias de contagens de estafilococos coagulase positivo nas diferentes regiões de estudo (H: 2,1008; $p > 0,05$).

Pereira *et al* (2006), avaliando 45 amostras de ostras provenientes de cultivos localizados na região de Florianópolis, encontraram uma única amostra (2,2%) contaminada por estafilococos coagulase positivo, enquanto Ayulo *et al*, (1994), avaliando amostras de mexilhões e berbigões, provenientes de regiões costeiras de Santa Catarina, detectaram a presença de *Staphylococcus aureus* em 60% das amostras. No presente estudo, cerca de 12% (11/90) das amostras apresentaram contaminação por estafilococos coagulase positivo.

Não foram observadas correlações estatísticas entre as contagens de estafilococos coagulase positivo na carne dos moluscos bivalves e parâmetros físico-químicos das águas onde os moluscos são cultivados, como podem ser observados na tabela 12.

Tabela 12 - Correlações entre parâmetros físico-químicos da água de cultivo e contagens estafilococos coagulase positivo.

Parâmetro físico-químico	N	Sperman r	p valor*
Temperatura	90	- 0,1273	0,2319
Turbidez	90	- 0,1186	0,2655
Salinidade	90	0,0890	0,4040
pH	90	- 0,1324	0,2134

* se $p > 0,05$, não houve correlação estatística entre as variáveis.

5.3.2.5. *Salmonella spp.*

Nenhuma das 180 amostras analisadas apresentaram presença de *Salmonella spp.*, atendendo a atual legislação vigente, RDC 12/2001 – ANVISA, a qual estabelece que moluscos bivalves *in natura*, resfriados ou congelados, não consumidos crus, apresentem ausência de *Salmonella spp.* em 25g de amostra. Pereira *et al*, (2006), não encontraram *Salmonella spp.* em nenhuma das 90 amostras analisadas, sendo 30 destas amostras provenientes da região do Ribeirão da Ilha, estando de acordo com os resultados encontrados neste estudo.

Galvão, (2004), avaliando a qualidade de mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral de São Paulo, isolou *Salmonella spp.* em 1 das 15 amostras analisadas, coincidindo com as maiores contagens de coliformes a 45°C registradas naquele estudo, no entanto, neste estudo não foi encontrada correlação entre as contagens de coliformes fecais e incidência de *Salmonella*. Outro estudo avaliando a prevalência de *Salmonella spp.* em ostras, nos Estados Unidos, encontrou a presença de *Salmonella* em 7,4% do total de ostras analisadas, sendo que o maior número de amostras positivas foram encontradas nos meses de verão (BRANDS *et al*, 2005).

Embora não se tenha isolado *Salmonella spp.* em nenhuma amostra deste estudo, esta bactéria está entre as mais importantes causadoras de doenças de origem alimentar, sendo portanto, o cozimento adequado deste produto anteriormente ao seu consumo, altamente recomendado.

5.3.2.6. *Vibrio spp.*

Das 180 amostras analisadas 25 (13,88%) apresentaram contaminação por *Vibrio spp.* A ocorrência de diferentes espécies de vibrios nestas amostras é apresentada na tabela 13. Matté, (1994) avaliando a distribuição de vibrios potencialmente patogênicos em ostras de região tropical do Brasil, armazenadas inapropriadamente, isolou sete espécies de vibrios, sendo que 81% das amostras apresentaram *V. alginolyticus*, 77% *V. parahaemolyticus*, 31% *V. cholerae* não-O1, 27% *V. fluvialis*, 19% *V. furnissii* e 12% *V. mimicus* e *V. vulnificus*.

Tabela 13 – Distribuição de diferentes espécies de vibrios em amostras de ostras contaminadas por *Vibrios spp* provenientes de seis regiões de cultivo da Baía Sul.

Espécie	25 Amostras Positivas	
	Nº	%
<i>V. alginolyticus</i>	17	68
<i>V. parahaemolyticus</i>	9	36
<i>V. vulnificus</i>	8	32
<i>V. cholerae</i>	4	16
<i>V. fluvialis</i>	1	4

De março a julho de 2006 não foi isolada nenhuma cepa de *Vibrio spp.* das ostras provenientes das seis diferentes regiões. Durante os meses de inverno foi isolada uma única cepa de *Vibrio vulnificus*, em agosto de 2006, enquanto nos meses de janeiro e fevereiro foram isoladas 38 cepas de diferentes espécies de vibrios, nas diferentes regiões de cultivo. Durante todo o monitoramento foram isoladas 39 cepas de vibrios, sendo que na região E a incidência foi maior em relação às outras regiões, e as regiões B e C tiveram a menor incidência (tabela 14). Em estudo realizado por Pereira *et al* (2004), que analisaram 50 amostras de moluscos bivalves, sendo estas 40 amostras de ostras provenientes de restaurantes do Rio de Janeiro, e 10 amostras de mexilhões provenientes de banco natural de Niterói, foram isoladas 141 cepas de *V. parahaemolyticus*.

Em outro estudo, realizado por Sousa *et al*, (2004), investigando a incidência de *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* em 12 amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), provenientes de um criadouro natural, no estuário do rio Cocó, Fortaleza, Ceará – Brasil, foram confirmadas a presença de *V. cholerae* em 4 amostras e *V. parahaemolyticus* em apenas 1 amostra. A ocorrência de *V. cholerae*, coincidiu com a ocorrência de chuvas locais e redução nos níveis de salinidade do curso de água.

Tabela 14 - Número de cepas de diferentes espécies de vibrios isoladas de ostras provenientes das diferentes regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina entre março 2006 e fevereiro 2007.

Espécies	A	B	C	D	E	F	Total
<i>V. alginolyticus</i>	4	4	2	4	2	1	17
<i>V. cholerae</i>	0	0	0	2	1	1	4
<i>V. fluvialis</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	0	0	2	3	2	8
<i>V. vulnificus</i>	2	0	2	0	3	2	9
Total região	8	4	4	8	9	6	39

A espécie de *Vibrio* mais freqüente foi o *V. alginolyticus*, seguido de *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. fluvialis*.

Além do isolamento, também foram realizadas contagens de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* nas amostras analisadas, sendo que estas variaram de < 3 a 7 NMP/g, para ambas espécies. No Brasil a Resolução RDC nº12/2001 – ANVISA (BRASIL, 2001), a qual

estabelece os critérios e padrões microbiológicos para alimentos, não estabelece limites para *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, em moluscos bivalves *in natura*, devido a isto se utiliza como parâmetro a Portaria 451/1997 do Ministério da Saúde, (BRASIL, 1997) já revogada, a qual estabelecia um limite de 5×10^3 NMP/g. de *V. parahaemolyticus* para moluscos *in natura*. Com base nesta legislação, as contagens realizadas apresentam resultados bastante inferiores aos permitidos.

A legislação brasileira não estabelece limites para *Vibrio vulnificus* e *Vibrio alginolyticus*, no entanto países como os Estados Unidos preconizam ausência de *Vibrio vulnificus* em 25g de amostra. A presença de *V. vulnificus* em amostras de ostras representa um importante achado microbiológico, visto que esta espécie possui elevado potencial patogênico para o homem podendo causar desde manifestações gastroentéricas, infecções extra-intestinais, até septicemia em indivíduos susceptíveis, em particular criança, idosos e portadores de doença crônico-degenerativas (NASCIMENTO *et al*, 2001).

Em estudo realizado por Archer & Moretto, (1994), foi pesquisada a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em quarenta amostras de mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) procedentes de banco natural da praia da Pinheira, município de Palhoça, Santa Catarina, durante um período de três meses, nas quais foi constatada a presença de *Vibrio parahaemolyticus*, em 52,5% das amostras, com níveis de contaminação entre < 3 e 93 NMP/g. Em outro estudo realizado por Pereira *et al* (2006), que analisaram 90 amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) provenientes de três diferentes áreas de cultivo de Florianópolis: Sambaqui, Cacupé e Ribeirão da Ilha, quanto a contaminação por *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, nenhuma das amostras analisadas apresentaram tais microrganismos.

A incidência de *vibrio spp.* em ostras (*Crassostrea gigas*), neste estudo, parece não ter sido influenciada pela salinidade das águas onde os moluscos são cultivados ($r = 0,1753$; $p > 0,05$), no entanto apresentou uma correlação positiva com a temperatura das águas onde os moluscos são cultivados ($r = 0,5085$; $p = 0,00001$), ou seja, a medida que observamos um aumento na temperatura das águas, também foi possível observar o aumento na incidência de *Vibrio spp.* nas ostras cultivadas (figura 16).

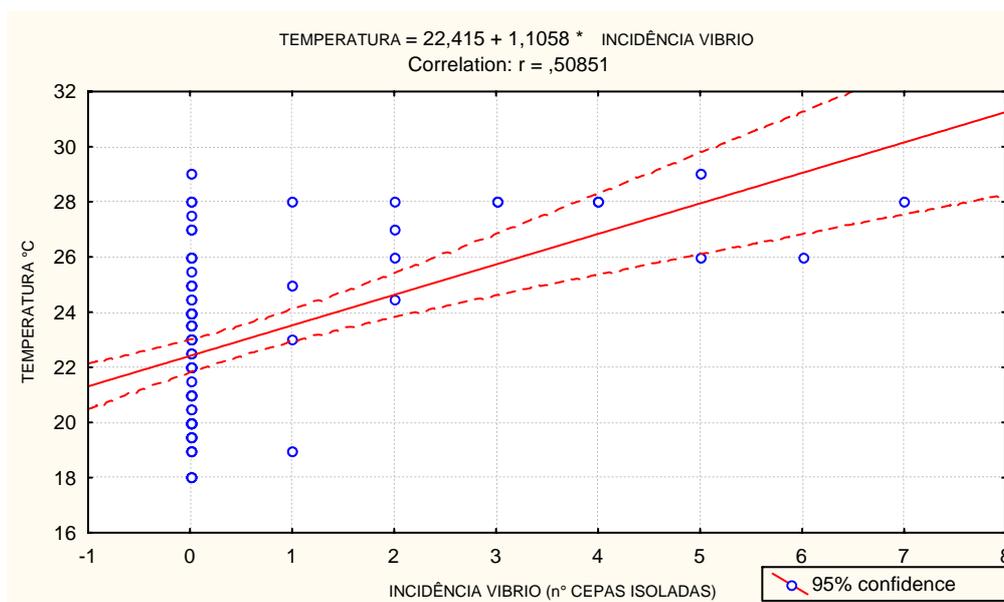


Figura 16 - Correlação entre incidência de vibrios nas ostras e temperatura das águas onde são cultivadas.

Chávez *et al* (2005), estudando a influência da temperatura da água e salinidade na ocorrência de *Vibrio cholerae* em ostras produzidas em Veracruz, no México, encontraram uma correlação positiva, tanto com a temperatura, como com a salinidade da água de cultivo. Segundo JAY, (2005), a quantidade de *V. alginolyticus* encontradas em ostras, correlaciona-se com a temperatura das camadas superiores da água, sendo os maiores números associados a águas mais quentes.

Segundo Hlady & Klontz (1996), a concentração de *V. parahaemolyticus* nas águas marinhas aumenta com o aumento da temperatura destas, e corresponde com um aumento sazonal na ocorrência de casos esporádicos de infecções nos meses mais quentes.

De acordo com o CDC, (1999), vários surtos de infecção por *V. parahaemolyticus* no Noroeste Pacífico e no Texas, ocorreram durante os meses de verão, e para reduzir o risco de contaminação por *V. parahaemolyticus* e outras infecções através da ingestão de moluscos bivalves, as pessoas devem evitar ingeri-los crus ou mal cozidos, particularmente durante os meses quentes. No entanto, as ostras são geralmente consumidas *in natura* sem cozimento prévio adicionada de algumas gotas de limão, procedimento que não torna o alimento seguro, enquanto a cocção (100°C) representa o método mais eficaz para que os moluscos sejam alimentos seguros sob o ponto de vista microbiológico (PEREIRA *et al*, 2007). Embora a RDC 12/2001- ANVISA (BRASIL, 2001) não tenha parâmetros estabelecidos para *Vibrios*

spp. em moluscos bivalves *in natura*, os padrões microbiológicos existentes são para moluscos bivalves *in natura* não consumidos crus, o que deve ser reavaliado pelas autoridades da Vigilância Sanitária, visto que embora seja microbiologicamente mais seguro não consumi-los crus, este é o principal modo de preparo, e deve ser considerado para que os limites microbiológicos estabelecidos estejam adequados as características do alimento que chega a mesa do consumidor.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados após um ano de monitoramento, foi possível concluir que as águas onde são cultivados os moluscos bivalves, especialmente ostras japonesas (*Crassostrea gigas*), nas diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, apresentaram contagens bacteriológicas de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* pertinentes a águas destinadas ao cultivo de moluscos bivalves, ou seja, atendendo a legislação brasileira, através da Resolução CONAMA 357/2005, estando, portanto todas as regiões aptas para desenvolvimento desta atividade.

A qualidade bacteriológica das ostras (*Crassostrea gigas*) refletiu a qualidade das águas, enfatizando a importância de um programa de monitoramento contínuo da qualidade das águas em áreas de cultivo de moluscos bivalves. Todas as amostras analisadas apresentaram qualidade higiênico-sanitária satisfatória, atendendo a RDC 12/2001-ANVISA, confirmando a qualidade das ostras produzidas nesta região.

Os parâmetros físico-químicos avaliados nas águas dos cultivos durante um ano, mostraram que a temperatura e salinidade média mantiveram-se em níveis superiores aos ideais para o cultivo desta espécie exótica, o que pode interferir no crescimento destes moluscos. A turbidez, salinidade e temperatura nas águas onde os moluscos são cultivados, apresentaram pouca ou nenhuma correlação com coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E. coli*, o mesmo ocorreu quando se analisou a correlação destes parâmetros com as bactérias analisadas nas ostras, com exceção do parâmetro temperatura das águas, que apresentou uma correlação positiva significativa com a incidência de *Vibrio spp.* na carne dos moluscos.

O índice pluviométrico influenciou significativamente as contagens bacteriológicas realizadas nas águas onde são cultivadas e conseqüentemente na qualidade das ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas nestas regiões quando se considerou a Baía Sul como um todo.

6.1. Recomendações

- Alertar tanto o poder público, quanto a população em geral, para necessidade de se implantar sistema de saneamento básico, em regiões onde são cultivados moluscos

bivalves destinados a alimentação humana, buscando, sobretudo a segurança alimentar do consumidor e crescimento econômico das atividades de maricultura;

- A manutenção de um programa de monitoramento constante da qualidade das águas onde os moluscos são cultivados de moluscos bivalves, permitindo assim a identificação e aplicação das medidas de controle adequadas;
- Capacitação constante dos maricultores e seus colaboradores, especialmente quanto à qualidade e sanidade dos produtos oriundos da aqüicultura, visando à saúde e o bem estar dos consumidores;
- Garantir subsídios à atividade, permitindo um desenvolvimento sustentável da aqüicultura, tanto para geração de emprego e renda, quanto para manutenção das populações locais.
- Por fim, garantir o desenvolvimento de pesquisas que busquem melhorar a qualidade dos produtos da aqüicultura destinados à alimentação humana, assim como a pesquisa de novos indicadores de qualidade para estes produtos, além do desenvolvimento de programas de qualidade que busquem a produção de alimentos seguros a alimentação humana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, F.E. **Seafood safety**. National Academy Press, Washington D.C., USA. 1991. 432p.

ANTONIOLLI, M.A. **Vida Útil do mexilhão *Perna perna* (L.) processado e mantido sob refrigeração**. 1999. 99f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA), WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21 ed, Ed. Washington, 2005. 1336p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed., Ed. Washington, D.C. 2001 1219p.

ARCHER, R. M. B.; MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em Mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de Banco Natural do Litoral do Município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v.10, n.3, p. 379-386, jul/set, 1994.

AYULO, A.M.R.; MACHADO, R.A.; SCUSSEL, V.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, n.1-2, p.171-178, 1994.

BARARDI, C. R. M., SANTOS, C. S. dos, SIMÕES, C. M. O. Ostras de qualidade em Santa Catarina. **Ciência Hoje**, v. 29, n. 172, p. 70-73, 2001.

BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados. Cap. 10: Moluscos**. 4.ed. São Paulo: Roca. 1984, 1179p.

BEIRÃO, L.H. *et al.* Processamento e industrialização de moluscos. In: SEMINÁRIO E WORKSHOP TECNOLOGIA PARA APROVEITAMENTO INTEGRAL DO PESCADO, Campinas, 2000. **Palestras**. Campinas: ITAL, Centro de Tecnologia de Carnes, 2000, p. 38-84.

BEIRÃO, L.H.; TEIXEIRA, E.; BATISTA, C.R.V. *et al.* **Tecnologia pós-captura de pescados e derivados**. In: POLI, C.R.; BASSANESI, A.T.; ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. *et al.* Aquicultura: experiências brasileiras. Ed. Multitarefa. Florianópolis, Brasil. 2004. p. 407-440.

BERTHELIN, C; KELLNER, K; MATHIEU, M. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle west coast of France). **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, France, v.125, n.3, p.359-369, mar.2000.

BRANDS, D.A. *et al.* Prevalence of *Salmonella spp.* in Oysters in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 893-897, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal RIISPOA. Brasília, DF, 1980. 165 p.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357 de 17 de março de 2005. Diário Oficial. Brasília 18 março de 2005.

BRASIL. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. Diário Oficial. Brasília 22 de setembro de 1997.

BRASIL. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. Diário Oficial. Brasília, 1 de janeiro de 2001.

CABELLI, V.J. *et al.* A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. **Journal of Water Pollution Control Federation**. V. 55. n.10, p.1306 – 1314. 1983.

CAMPOS, H. **Estatística Experimental Não paramétrica**. 4ª ed. Piracicaba, São Paulo – Brasil. 1983. 349 p.

CARVALHO, R. **Camarões marinhos: gestão de qualidade e rastreabilidade na fazenda**. 1º edição. Associação Brasileira de criadores de Camarão. Março 2005. 51 p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Foodborne Outbreaks Response and Surveillance Unit - Outbreaks United States, 2000–2005**. [online] disponível na internet via http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb . Capturado em 28/11/2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Infection Associated with Eating Raw Oysters and Clams Harvested from

Long Island Sound -- Connecticut, New Jersey, and New York, 1998. **Morbidity And Mortality Weekly Report**, v. 48, n.3, p.48–51. Janeiro, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Surveillance Summaries. Inside: Continuing Medical Education for U.S. Physicians and Nurses Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks —United States, 1993–1997. **Morbidity And Mortality Weekly Report**, March 17, 2000.

COMPANIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Variáveis de qualidade das águas**. [online] disponível na internet via <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp> capturado em 12/01/2007.

CHÁVEZ, M. del R.C. *et al.* Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n12, p. 1641-1648, 2005.

COELHO C. *et al.* Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.507–511, 2003.

COELHO, C., **Padronização de métodos moleculares para a detecção do vírus da hepatite A em ostras *Crassostrea gigas* experimentalmente inoculadas**. 2001. 151 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

COOK, D.W. Microbiology of bivalves molluscan shellfish. In: WARD, D.R.; HACKNEY, C. **Microbiology of marine food products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. cap..2. p.19-34.

CURTIUS, A. J. *et al.* Avaliando a contaminação por elementos traço em atividades de maricultura: resultados parciais de um estudo de caso realizado na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Química Nova**. v.26, n.1, p.44-52, jan./fev. 2003.

FAO, Food and Agriculture Organizations of the United Nations. **Fisheries and Aquaculture Department** . Cultured Aquatic Species Information Programme *Crassostrea gigas*. [online] disponível na internet via http://www.fao.org/fi/website/SwapLang.do?language=en&page=%2FFIRetrieveAction.do%3Fdom%3Dculturespecies%26xml%3DCrassostrea_gigas.xml#tcN1000DE Capturado em 21/03/2007.

FERREIRA, J. F.; BESEN, K.; WORMSBECHER, A. G.; SANTOS, R.F. dos. Physical-chemical parameters of seawater mollusc culture sites in Santa Catarina-Brazil. **Journal of Coastal Research**, v. 39, n. 1, p. 1122-1126, 2004.

FERREIRA, J.F.; OLIVEIRA NETO, F.M.; SILVESTRI, F. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. **Infopesca Internacional**, v. 28, p. 34-41, 2006.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FUNDAÇÃO INSTITUTO DA PESCA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FIPERJ/Instituto de Pesca). **Apoio ao desenvolvimento do cultivo de moluscos bivalves no Brasil (Relatório para a FAO)**. 1989. 181 p.

FURLAN, E.F. **Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz" - Universidade de São Paulo, São Paulo.

GALVÃO, J.A. **Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP**. 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz" - Universidade de São Paulo, São Paulo.

GALVÃO, J.A. *et al.* Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados na região de Ubatuba, SP. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.30, n. 6, p. 1124-1129, 2006.

GARCIA, A.N. **Contaminação microbiológica na área de cultivo de moluscos bivalves de Anchieta (Espírito Santo, Brasil)**. 2005. 68f. Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Oceanografia do Centro de Ciências Humanas e Naturais - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória – Espírito Santo.

GUTIÉRREZ, J.M.; MARTOS, P.G. Vibrios de origen marino em patologia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.15, p. 383-388. 1997.

HEINITZ, M.L.L. *et al.* Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. **Journal of Food Protection**, v.63, n.5, p.579-592. 2000.

HLADY, W.G.; KLONTZ, K.C. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. **The Journal of infectious diseases**. V. 173. p. 1176-1183, 1996.

HUSS, H.H. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. FAO. **Documento Técnico sobre as Pescas**. n.334. Roma, FAO. 1997. 176p.

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

IMAI, T. **The evolution of oyster culture**. In: IMAI, T. Aquaculture in shallow seas: progress in shallow sea culture. Rotterdam: A. A. Balkema, 1982. 615p.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6º edição. Editora Artmed, 2005. 711p.

JOSÉ, V.F. **Bivalves e a segurança do consumidor**. 1996. 157p. Dissertação (Mestrado). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LABORATÓRIO DE CULTIVO DE MOLUSCOS MARINHOS - LCMM - UFSC. **Aspectos gerais do Cultivo de Ostras, principalmente da espécie *Crassostrea gigas*, na forma como é realizado no Estado de Santa Catarina**. Florianópolis. [online] disponível na internet via www.lcmm.ufsc.br. Capturado em 17/06/2005.

LENOCH, R.. Saúde pública e os moluscos marinhos cultivados. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília / DF, n. 28/29, p. 65-70, 2003.

LINS, H.N. **Anatomia da maricultura de moluscos em Santa Catarina: Tradição, instituições e inovação**. Texto para discussão. Departamento de Ciências Econômicas da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. 2004. [online] disponível na internet via <http://www.cse.ufsc.br/~gecon/textos/hoyedo08.pdf>. Capturado em 01/11/2005.

MACHADO, M. **Maricultura como Base Produtiva geradora de Emprego e Renda: estudo de caso para o distrito de Ribeirão da Ilha no município de Florianópolis – SC – Brasil**. 2002. 206 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MAGALHÃES, A.R.M. **Teor de proteínas do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia), em função do ciclo sexual**. 1985. 117f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARTINEZ-MANZANARES, E. *et al.* Relation between classical indicators and several pathogenic microorganisms involved in shellfish-borne diseases. **Journal of Food Protection**, v.54, n.9, p.711-717, 1991.

MARTÍNEZ, O.C; RODRIGUEZ, L.M. **Manual de buenas prácticas de producción acuícola de moluscos bivalvos para la inocuidad alimentaria**. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. SENASICA - México. 2003.

MATTÉ, G. R. *et al.* Distribution of Potentially Pathogenic Vibrios in Oysters from a Tropical Region. **Journal of Food Protection**, v. 57, n.10, p. 870-873, 1994.

NASCIMENTO, S.M.M *et al.* *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 43, n. 5, p. 263-266. 2001

NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS. Microbiological criteria for raw molluscan shellfish. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 6, p.463-480, 1992.

NUNES, A.J.P. & PARSONS, G.L. Dynamics of tropical coastal aquaculture systems and the consequences to waste production. **World Aquaculture**, v. 29, n. 2, p. 27-37, 1998.

OLIVEIRA, A.C.M. *et al.* Quality of alaskan mariculture oysters (*Crassostrea gigas*): a one-year survey. **Journal of Food Science**. V. 71, n.9, p. 532-543, 2006.

OLIVEIRA NETO, F.M. **Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina**. Epagri/Cedap, Florianópolis 2004.

OLIVEIRA NETO, F.M. **Síntese informativa da produção de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras) no estado de Santa Catarina em 2006** – Epagri/Cedap. Florianópolis, 2007. [online] disponível na internet via <http://www.epagri.rct-sc.br/> Capturado em 05/05/2007.

PEREIRA, C. S; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 24, n. 4, p. 591-595, 2004.

_____ Vibrios patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes no Rio de Janeiro: um alerta para a Saúde Pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 3, 2007.

PEREIRA, M.A. *et al.* Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 2, 2006.

POLI, C.R. & LITTLEPAGE, J. **Desenvolvimento do Cultivo de Moluscos no Estado de Santa Catarina.** [online] disponível na internet via www.bwa.floripa.com.br Capturado em 03/11/2005.

POLI, C.R. **Cultivo de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*, 1852).** In: POLI, C.R.; BASSANESI, A.T.; ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. *et al.* Aquicultura: experiências brasileiras. Ed. Multitarefa. Florianópolis, Brasil. 2004. p. 251-266.

RUPP, G.S. **Introdução à biologia das ostras.** In: FERREIRA, J.F. *et al.* Cultivo de ostras. Laboratório de cultivo de moluscos marinhos. 1999. p. 15-24.

SALÁN, E.O. **Tratamento térmico de mexilhões *Perna perna* como forma de assegurar a qualidade - Avaliação do crescimento de *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.** 2005. 103f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz" - Universidade de São Paulo, São Paulo.

SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA – SEAP/PR - **Programa Nacional de Controle Higiénico-Sanitário de Moluscos Bivalves.** [online] disponível na internet via [http://200.198.202.145/seap/didaq/html2/prog_nac_controle_higienico\(MoluscosBivalves\).html](http://200.198.202.145/seap/didaq/html2/prog_nac_controle_higienico(MoluscosBivalves).html). Capturado em 20/03/2007.

SILVA, A. I. M. *et al.* Bactérias de origem fecal contaminantes de ostra *Crassostrea rhizophorae*, oriundas do estuário do Rio Cocó, Estado do Ceará, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology.**, vol.35, n.1-2, p.126-130, jan./jun. 2003.

SILVA, F.C da. **Cultivo.** In: FERREIRA, J.F. *et al.* Cultivo de ostras. Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos. 1999. p. 25-41.

SILVA, N. da *et al.* **Manual de métodos de análises microbiológica de água.** Campinas: ITAL, 2000. 99 p.

SILVEIRA JR., N. **Predadores, incrustantes e enfermidades. In: Manual de cultivo de ostras.** Laboratório de cultivo de moluscos marinhos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. p. 39-55. 1997.

SIMMONS, G. *et al.* Raw oyster consumption and outbreaks of viral gastroenteritis in New Zealand: evidence for risk to the public's health. **Journal of Public Health**, v.25, n.3, p.234-240. June. 2001.

SOLIC, M. *et al.* The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. **Enviroment International**, v. 25, n. 8, p. 991-1000, 1999.

SOUZA FILHO, J. *et al.* Custo de produção da ostra cultivada. Florianópolis: Instituto Cepa/SC. **Cadernos de indicadores agrícolas**, 23 p. 2003.

SOUSA, O. V. de *et al.* Isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* em ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas em um criadouro natural no estuário do rio Cocó, Fortaleza, Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 2, 2004.

SUPLICY, F. M. **Ensaio sobre a depuração do mexilhão *Perna perna* (L., 1758)**. 1998. 81f.. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

TÉLLEZ, S. J. *et al.* Evaluación de la calidad microbiológica del ostión de “La laguna madre” de Tamaulipas (México). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.2, n. 3, p. 152-157, 1999.

UNITED STATES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER OF FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION (US FDA/CFSAN). **National shellfish sanitation program model ordinance**. 2005. cap. 4 . [online] disponível na internet via www.cfsan.fda.gov/~ear/nss3-toc.html Acessado em 20/01/2007.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION (US FDA/CFSAN). **Bacteriological Analytical Manual 8° ed. (BAM) Online**. 2001. Disponível em: <http:// www.cfsan.fda.gov>. Acessado em 05/11/2005.

VALLE, R.P., PROENÇA, C.E.M. **Evolução e perspectivas da aqüicultura no Brasil**. In: VALENTI, W. C. *et al.* Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. c. 13. p. 383-398. Brasília: CNPq / Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. 399p.

APÊNDICE A

Artigo I:

HYGIENIC AND SANITARY QUALITY OF OYSTERS (*CRASSOSTREA GIGAS*)
CULTIVATED AT BAÍA SUL IN FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA STATE –
BRAZIL

Roberta J Ramos¹; Murilo A Pereira¹; Leticia A Miotto¹; Nelson Silveira Jr²; Renata D Faria¹; Cleide
R V Batista¹

Artigo submetido à revista Brazilian Journal of Microbiology em junho de 2007.

**HYGIENIC AND SANITARY QUALITY OF OYSTERS (*CRASSOSTREA GIGAS*)
CULTIVATED AT BAÍA SUL IN FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA STATE –
BRAZIL**

Roberta J Ramos¹; Murilo A Pereira¹; Letícia A Miotto¹; Nelson Silveira Jr²; Renata D Faria¹; Cleide R V Batista^{1*}

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

² Associação de Maricultores do Sul da Ilha (AMASI), Florianópolis, SC, Brasil.

ABSTRACT

The safety of those who consume bivalve mollusks, depends on the sanity of these products which, in its turn, depends on the physical, chemical, and microbiological conditions of their original environment, on the handling and post-capture technology, as well as on the existence of appropriate legislation. The aim of this work was to monitor the hygienic and sanitary quality of oysters (*Crassostrea gigas*) from sea farms located in six different geographical regions at Baía Sul in Florianópolis, Santa Catarina state, over a period of 12 months, totaling 15 collections, from March 2006 through February 2007. 180 samples were analyzed; each sample consisted of a pool of 12 oysters. They were collected directly from their cultivation sites. Microbiological assays were carried out for counts of coliforms at 35°C, coliforms at 45°C, *Escherichia coli*, positive coagulase *Staphylococcus*, and detection of *Salmonella* sp. The pH of the oyster samples was also analyzed. All the samples analyzed showed absence of *Salmonella*, and 18 (10%) samples showed presence of *Escherichia coli*. The counts of positive-coagulase *Staphylococcus* varied from <10 to 1×10^2 CFU/g, whereas the counts of coliforms at 35°C, 45°C and *E. coli* ranged from <3.0 to 2.5×10^2 MPN/g, <3 to 8×10 MPN/g and <3 and 2.6×10 MPN/g, respectively. Positive correlations were found among counts of coliforms at 35°C, 45°C and *E. coli* in the oysters. The average pH varied between 5.70 and 6.64, and statistical differences were observed in the pH averages throughout the different seasons of the year. Based on the results of the microbiological assays, the samples analyzed showed acceptable bacteriological quality, i.e., within the parameters established in the Brazilian Legislation.

Key words: oyster, bacteriological quality, pH, *Crassostrea gigas*

RESUMO

A segurança do consumidor de moluscos bivalves depende da sanidade destes, que por sua vez depende das condições físicas, químicas e microbiológicas do ambiente de origem, do manuseio e tecnologia pós-captura, bem como da existência de legislação adequada. O presente trabalho teve por objetivo monitorar a qualidade higiênico-sanitária de ostras (*Crassostrea gigas*), provenientes de fazendas marinhas localizadas em seis diferentes regiões geográficas da baía Sul da Ilha de Santa Catarina, por um período 12 meses, totalizando 15 coletas, no período de março de 2006 a fevereiro de 2007. Foram analisadas 180 amostras, cada uma composta por um *pool* de 12 ostras, coletadas diretamente das áreas de cultivo. Foram realizados ensaios microbiológicos para contagens de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C, *Escherichia coli*, Estafilococos coagulase positivo, e detecção de *Salmonella* sp. Também foi analisado o pH das amostras de ostras. Todas as amostras analisadas tiveram ausência de *Salmonella* e 18 (10 %) das amostras confirmaram presença de *Escherichia coli*. As contagens de Estafilococos coagulase positivo variaram de < 10 a 1×10^2 UFC/g. Já as contagens de coliformes a 35°C, 45°C e *E. coli* variaram de < 3,0 a $2,5 \times 10^2$ NMP/g, < 3 a 8×10 NMP/g e < 3 e $2,6 \times 10$ NMP/g, respectivamente. Foram encontradas correlações positivas entre contagens de coliformes a 35°C, 45°C e *E. coli* nas ostras. O pH médio variou entre 5,70 e 6,64, sendo que foram observadas diferenças estatísticas nas médias de pH nas diferentes estações do ano. Baseado nos resultados dos ensaios microbiológicos, as amostras analisadas apresentaram qualidade bacteriológica satisfatória, ou seja, atendendo os parâmetros estabelecidos na Legislação Brasileira.

Palavras-Chave: ostra, qualidade bacteriológica, pH, *Crassostrea gigas*.

*Corresponding Author. Mailing address: Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi. 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. Tel.: (+5548) 3721-5380, Fax: (+5548) 3721-9943. Email: cbatista@mbox1.ufsc.br

INTRODUCTION

The *Crassostrea gigas* oyster, also known as Pacific Oyster or Japanese Oyster, is natural to the coast of Japan, China, and Korea (17). It is a bivalve mollusk, which feeds on organic and inorganic materials, phytoplankton, suspended particles present in water and on microorganisms, by means of branchial filtration (13;14).

According to the Food and Agriculture Organizations of the United Nations (12), the global production of oysters (*Crassostrea gigas*) increased in 4.38 million tons, higher than any other fish, mollusk or crustacean species, between 1950 and 2003.

Similarly to products from traditional fishing, products originating from aquaculture, such as bivalve mollusks, also undergo deterioration and are subjected to the action of pathogenic microorganisms and, therefore, need the same basic care during manipulation and processing for their introduction to the different commercialization venues (3).

The safety of those who consume mollusks, such as oysters and mussels, depends on the sanity of these products which, in its turn, depends not only on the physical, chemical, and microbiological conditions of their original environment, but also on the handling and post-capture technology, as well as on the existence of appropriate legislation, based on the supervision of all the production stages (16).

Due to its favorable climatic conditions and its geographical quality, Santa Catarina state is home to the largest sea farming hub in Brazil. In Santa Catarina the water temperature is around 15°C during the winter. Its coast comprises a great number of bays facilitating the cultivation of the bivalve mollusks on sea farms (10). All these factors make Santa Catarina state the largest oyster producer in Brazil. In 2006 it produced a total of 3,152.4 tons (Figure 1), regaining the 25% average growth rate achieved in 2003 and 2004 (20).

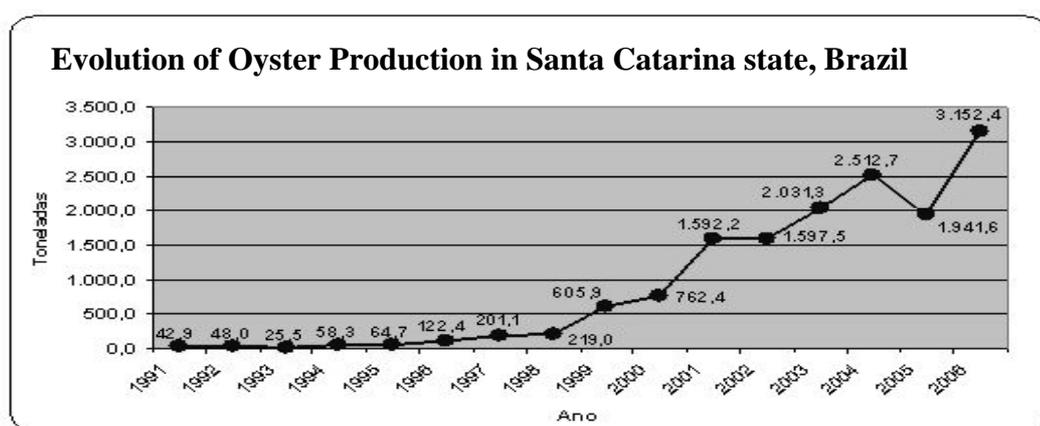


Figure 1 – Oyster production in Santa Catarina state, Brazil.

According to the Centers for Disease Control and Prevention - CDC (9), ten outbreaks of alimentary toxoinfections linked to ingestion of oysters polluted with pathogenic bacteria were registered in the USA between 2000 and 2005. Of these, 70% were caused by *Vibrio parahaemolyticus*, 20% by *Vibrio cholerae* and 10% by *Salmonella typhi*, afflicting approximately 120 people.

The aim of this research was to monitor the hygienic and sanitary quality of oysters (*Crassostrea gigas*) from sea farms located at Baía Sul in Florianópolis, Santa Catarina, over a period of one year.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection

The collection sites studied are located in six different geographical regions in the district of Ribeirão da Ilha, the largest production site of cultivated oysters in Brazil: Caieira da Barra do Sul (27°48'849" S; 48° 33'981" W); Tapera do Ribeirão (27° 46'989" S; 48° 34'318" W); Costeira do Ribeirão (27° 44'350" S; 48° 33'890" W); Freguesia do Ribeirão (27° 43'17.4" S; 48° 33'57.8" W), Barro Vermelho (27° 42'11.1" S; 48° 33'33.7") and Tapera da Base Aérea (27° 41'397" S; 48° 34'230" W), which were identified, respectively, as regions: A, B, C, D, E and F (Figure 2).



Figure 2 – Collection sites in the six different regions at Baía Sul in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

The collections were carried out from March 2006 through February 2007, totaling 15 collections. Each sample composed of a pool of 12 oysters. Two monthly samples were collected from each of the six cultivation areas over a period of nine months, and during the months of December, January, and February biweekly collections were performed, i.e., four monthly samples from each one of the six regions, totaling 180 samples over a twelve-month period. The oysters were transported to the Laboratory of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology at the Federal University of Santa Catarina, in isothermal boxes with packaged potable ice. They were then washed and any material stuck to the shells was scraped and brushed off in good quality current water, and then dried outdoors on trays disinfected with alcohol 70%.

For the calculation of the results of the microorganism counts in the oyster samples, the arithmetic mean was calculated between the two samples collected from the same site in each collection, expressing a single result in the counts, totaling 90 samples, whereas for the analyses of presence or absence, the 180 samples were considered individually.

Sample preparation

The oysters were opened with a sterile knife and the intervalvar liquid and the meat were aseptically transferred to sterile bags, making up the pool of each sample, from which two samples of 25 g each were later weighed.

For the microbiological analyses of coliforms at 35° C, coliforms at 45° C, *Escherichia coli* and positive coagulase staphylococci, 25 g of the sample was weighed, added to 225 ml of peptone water 0.1% and afterwards disintegrated in a Bagmixer[®] blender. From this dilution (10^{-1}), the other decimal dilutions were made to perform the analyses. For the *Salmonella sp.* analysis, a pre-enrichment of 25g of sample was performed in 225 mL of buffered peptone water (BPW) which was incubated at 35° C ($\pm 1^\circ$ C) for 24 hours.

Microbiological analyses

The oyster samples were submitted to enumeration of coliforms at 35°C, coliforms at 45°C, *Escherichia coli* and positive coagulase staphylococci, and to detection of *Salmonella sp.*

Coliforms at 35°C, coliforms at 45°C, and *Escherichia coli* (1)

The dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} were used, inoculating 1 mL in each tube of a set of three tubes for each dilution containing Lauryl Sulphate Tryptose broth (LST); they were incubated

at 35° C (\pm 1° C) for 48 hours. From each tube of LST with turbidity and production of gas, 100 μ l from the positive tubes were transferred to tubes containing Brilliant Green Lactose bile broth 2% (BGL) and to tubes containing Escherichia coli broth (EC). The tubes of BGL were incubated at 35° C (\pm 1° C) for 48 hours and the tubes of EC in water bath at 45.0° C \pm 0.5° C, for 48 hours. From the tubes of EC with turbidity and production of gas, inoculation was performed in plates of Eosin-Methylene Blue Agar (EMB) by means of streaking; incubating them at 35 °C (\pm 1° C) for 24 hours. The typical colonies of *Escherichia coli* were submitted to the biochemical test: Indole, Methyl Red, Voges Proskauer and Citrate (IMViC). The final result of coliforms at 35°C and 45°C was expressed through the table of the Most Probable Number (MPN), for the combination of the number of positive tubes, i.e., with turbidity and production of gas; while the counts of *E. coli* were performed from the confirmation of the isolated colonies in EMB, in the biochemical test IMViC, also expressed by the positive isolated combination, through the MPN table.

Positive coagulase staphylococci (1)

The analyses were performed by direct plating in surface of the first three dilutions. From each one of these first three dilutions, 1 mL was distributed into 3 Baird Parker agar plates (BP), which were incubated at 35° C (\pm 1° C) for 48 hours. Three typical colonies were selected, which were subcultured for Brain-Heart Infusion broth (BHI) and incubated at 35° C (\pm 1° C) for 24 hours, to subsequently perform the biochemical test for coagulase. For interpretation and calculation of results, the cultures that were considered as positive coagulase Staphylococci were those with positive-coagulase reaction. In case of doubt in relation to the result of the coagulase, the additional DNase tests and morphology study through Gram coloring were used. When the coagulase reaction was negative, the result was expressed as <10 Colony Forming Units per gram of sample (CFU/g).

***Salmonella spp.* (1)**

After 24 hours of pre-enrichment, aliquots were transferred simultaneously to tetrathionate broth (TT) and Rappaport-Vassiliadis broth (RV) and were incubated at 42°C (\pm 1° C) for 24 hours. The selective enrichment cultures were streaked on the surface of Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose Agar (BPLS) and Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar plates, and they were incubated at 35° C (\pm 1° C) for 24 hours. The typical colonies of *Salmonella sp.* were submitted to biochemical screening in triple sugar iron agar

(TSI), lysine iron agar (LIA), and urea agar, and when typical reaction of *Salmonella sp.* occurred in the biochemical screening, they were then submitted to the complementary biochemical tests: Dulcitol, Indole, Malonate, MRVP - Methyl Red Voges Proskauer and Citrate.

Determination of the pH of the oysters

The pH of the oysters was verified from the remainder of the pool of 12 oysters from each sample with a Quimis[®] Q-400A digital pHmeter and performed in triplicate.

Statistical analysis of data

The statistical analyses of the data were performed with the *Statistica*[®] 6.0 software. For the comparison of pH averages, the results were submitted to an ANOVA variance analysis with a significance level of 5%. When difference among the averages occurred, Tukey test was performed to compare them. The results of the microbiological analyses of coliforms at 35° C, coliforms at 45°C, and *E. coli* were submitted to the non-parametric Kruskal-Wallis test to compare the averages of contamination. When statistical difference at a level of 5% occurred, tests of multiple comparisons were performed, with $\alpha = 0.05$ and $\alpha = 0.10$ (8). The correlation among the counts of coliforms at 35°C, coliforms at 45°C, and *E. coli* was performed through Spearman's non-parametric correlation test.

For statistical calculation purposes, whenever the results obtained in the MPN table were <3 MPN/g, they were substituted by the whole number immediately below, that is, 2 NMP/g.

RESULTS AND DISCUSSION

The pH values of oysters from different regions of Baía Sul ranged between 5.70 and 6.64; the average pH noted was of 6.14. The RIISPOA - Regulation of Industrial and Sanitary Inspection of Products of Animal Origin (5) does not establish pH limits for mollusks; only for fish.

Galvão (15) points out the need of specific studies in relation to pH limits for bivalve mollusks, since they show diversified centesimal composition in comparison to other fish species, showing a different decomposition pattern and alteration in pH. According to Cook, (11), pH above 6.0 for oyster meat is considered good, and pH of 6.5 was noted for live Pacific oysters (*Crassostrea gigas*).

When monitoring the quality of oysters (*Crassostrea virginica*) over a period of six months in "La Laguna Madre", in Mexico, Téllez *et al*, (23), found pH values between 6.0 and 7.0. Oliveira *et al*, (2006), who monitored the quality of oysters (*Crassostrea gigas*) cultivated in Alaska, USA, over a period of one year, found pH values between 6.57 and 6.91, showing an alteration smaller than 0.4, throughout the whole year, whereas in this present study we found differences of up to 0.96 over a period of one year.

Statistical differences at a significance level of 5% were not observed among the pH averages of the oysters from the different cultivation areas; however, a significant statistical difference was noted in relation to the average pH of oysters noted in the different seasons of the year. In the summer a significantly smaller average pH in the meat of mollusks was found in relation to the other seasons, and in the winter an inverse situation was observed; with a significantly larger average pH value, in relation to the other seasons (Table 1).

Table 1 - pH in the oyster samples, according to the different seasons of the year.

Seasons	Autumn	Winter	Spring	Summer
Average pH	6.2 ^a	6.4 ^b	6.2 ^a	6.0 ^c

Averages followed by different letters showed statistical difference at the level of 5% (F = 25.03; p=0.00000).

In relation to the counts of coliforms at 35°C, they varied from <3.0 to 2.5 x 10² MPN/g, and the oysters from regions E, D and F showed the highest geometric averages of contamination, respectively.

In a research carried out by Pereira *et al*, (21), to evaluate *Crassostrea gigas* oysters from three cultivation areas in Florianópolis, Santa Catarina, the counts obtained were between < 3 and > 1.1 x 10³ MPN/g. However, considering only the area of Ribeirão da Ilha, which is the same area of this study, the counts were lower, ranging between <3 and 1.5 x 10² MPN/g. Such values are similar to those found in this study. Silva *et al*, (22), noted counts of coliforms at 35°C between < 1.8 and > 1.6 x 10³ MPN/g in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) collected in Rio Cocó's estuary, in Ceará state, Brazil, showing a wider range of contamination in relation to the results obtained in this study; unlike Oliveira *et al*, (19), who found a small range of contamination, with counts of coliforms at 35°C between < 3 and 3 x 10 MPN/g in *Crassostrea gigas* oysters cultivated in Alaska.

A statistical difference was noted between the averages of contamination, at a level of significance of 10%, among the oysters from region E and from region A, i.e., the area where

the oysters showed the highest and the lowest counts of coliforms at 35°C, respectively (Table 2).

Table 2 - Counts of coliforms at 35°C in the oysters from the 15 collections in the different cultivation areas at Baía Sul.

CULTURE REGION	GEOMETRIC AVERAGE (MPN/g)*
A	2.09 ^a
B	3.14 ^{a b}
C	2.47 ^{a b}
D	4.17 ^{a b}
E	6.26 ^b
F	3.84 ^{a b}

Note: * MPN/g = most probable number per gram; Averages that do not show letters in common among each other show statistical difference at a level of 10% (H = 32.40940; p < 0.05).

The counts of coliforms at 45°C in the oysters ranged from < 3 to 8 x 10 MPN/g, and 77% of the samples showed counts equal to < 3 MPN/g. The highest count was noted in the month of December, in region B; however, region E showed the highest geometric average of coliforms at 45°C in relation to the other areas.

Although the Brazilian legislation in force does not establish limits of coliforms at 45°C for *in natura*, refrigerated, or frozen bivalve mollusks, if we take into consideration Government Directive n. 451 (6) of the Ministry of Health, which has been revoked, and had determined a limit for coliforms at 45°C up to 10² MPN/g, all the samples analyzed would comply with such legislation.

When monitoring the quality of mussels *Perna perna* cultivated on the coast of São Paulo state, Galvão, (16), noted counts of coliforms at 45°C which ranged from 3.2 to 3.3 x 10² MPN/g; those values are higher than the ones found in this study. Pereira *et al*, (21), found levels of contamination in oysters *Crassostrea gigas* from the cultivation area in Ribeirão da Ilha, with counts that ranged between <3 and 9.3 x 10 MPN/g, and 73% of the samples showed counts equal to < 3 MPN/g. Such levels are very similar to those obtained in this study.

No statistical differences were noted in the contamination averages of the different areas of cultivation at Baía Sul, as shown in Table 3.

Table 3 – Counts of coliforms at 45°C in the oysters from the 15 collections in the different areas of cultivation at Baía Sul.

CULTURE REGION	GEOMETRIC AVERAGE (MPN/g)*
A	2.09 ^a
B	2.68 ^a
C	2.11 ^a
D	2.60 ^a
E	4.31 ^a
F	2.74 ^a

Note: * MPN/g = Most probable number per gram; Averages followed by the same letter do not show statistical difference $\alpha = 0.05$ and $\alpha = 0.10$ ($H = 9.7551$; $P > 0.05$).

A significant positive correlation between the counts of coliforms at 35°C and 45°C ($r = 0.7785$; $p < 0.05$) was observed in the meat of the mollusks, as shown in Figure 3.

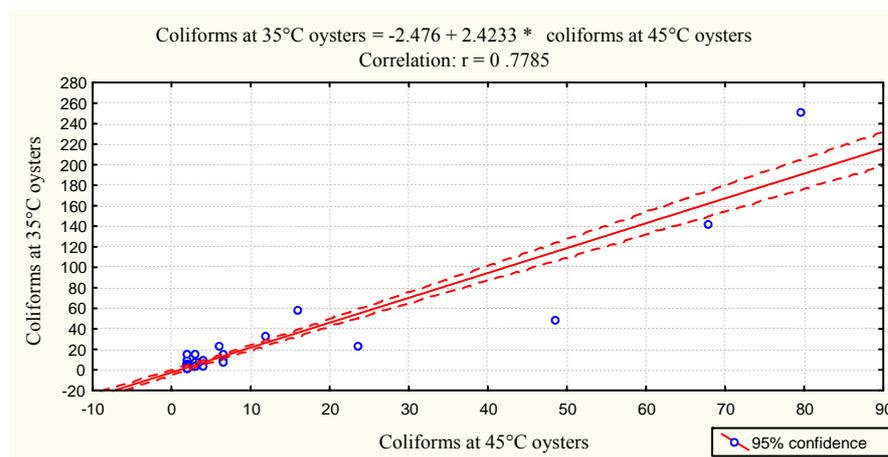


Figure 3 - Correlation between the counts of coliforms at 35°C and 45°C in oysters from the cultivations at Baía Sul.

Because *E. coli* is a better indicator of fecal contamination than the other genres and species of the coliforms group, determination of its incidence in a coliform population is desirable (18). The counts of *E. coli* obtained in the oysters from the six different regions

were low, ranging between < 3 and 2.6×10 MPN/g, and 86% (77/90) of the counts resulted in < 3 MPN/g. In a study carried out by Oliveira *et al*, (19), monitoring the quality of oysters *Crassostrea gigas* cultivated in Alaska, USA, the count of *E. coli* in the oysters ranged between < 3 and 2.3×10 MPN/g; these results are very similar to the ones obtained in this present study.

The region that showed the highest geometric average of *E. coli* in the mollusks, as well as for coliforms at 35°C and 45°C, was region E, followed by region D and region F, while in the region A, all counts obtained were of < 3 MPN/g. No statistical difference was observed among the averages of contamination by *E. coli* in the different study areas (Table 4).

Table 4 - Counts of *Escherichia coli* in the oysters from the 15 collections in the different areas of cultivation at Baía Sul.

CULTURE REGION	GEOMETRIC AVERAGE (MPN/g)*
A	2.00**
B	2.24 ^a
C	2.05 ^a
D	2.38 ^a
E	2.61 ^a
F	2.37 ^a

Note: * MPN/g = Most probable number per gram; Averages followed by the same letter do not show statistical difference at a level of 5% (H = 11.5408; p = 0.0417); ** No strain of *E. coli* was isolated;

When observing the incidence of *E. coli* in the samples of oysters from different regions at Baía Sul, approximately 10% (18/180) of them confirmed its presence, and region E showed the highest incidence, with 26.67% of the samples contaminated, while region A did not show any sample contaminated by *E. coli* (Table 5).

In a study performed by Pereira *et al*, (21), *Escherichia coli* was found in 9% of the samples of oysters *Crassostrea gigas* collected in three different cultivation areas in Florianópolis, Santa Catarina. Such results are in agreement with the results shown in this study.

Table 5 - Occurrence of *E. coli* in samples of oysters from different regions at Baía Sul, Florianópolis, Santa Catarina.

REGION	N° ANALYZED SAMPLES	POSITIVE SAMPLES N°	<i>E. coli</i> %
A	30	0	0.00
B	30	3	10.00
C	30	1	3.33
D	30	4	13.33
E	30	8	26.67
F	30	2	6.67
Total	180	18	10.00

A positive correlation was observed among the counts of coliforms at 35 and 45°C, and counts of *E. coli* in the samples of oysters, and the correlation is stronger in relation to coliforms at 45°C (Spearman R = 0.79; p = 0.000000) than at 35°C (Spearman R = 0.63; p = 0.000000), as shown in Figures 4 and 5.

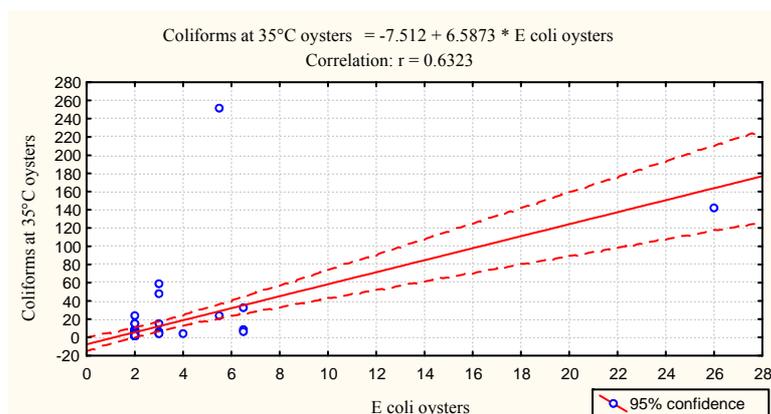


Figure 4 - Correlation between the counts of coliforms at 35°C and *E. coli* in the oysters from cultivations at Baía Sul.

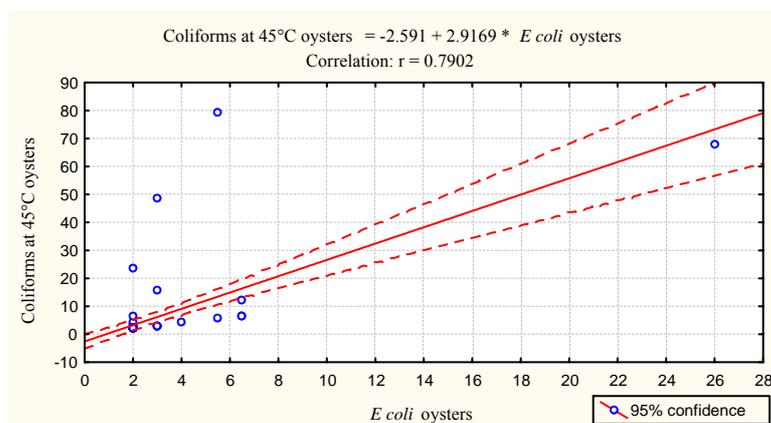


Figure 5 - Correlation between the counts coliforms AT 45°C and *E. coli* in the oysters from cultivations at Baía Sul.

The counts of positive coagulase staphylococci in the samples ranged between <10 and 1×10^2 CFU/g of sample (Table 6); the highest counts obtained in regions C, D, and E were registered in the month of September. This did not happen in the other regions.

Table 6 - Minimum and maximum counts of coagulase positive staphylococci in the samples of oysters from the different cultivation regions.

Região	A	B	C	D	E	F
Minimum counting (CFU/g)*	<10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0	< 10.0
Maximum counting (CFU/g)*	5.5×10	5.1×10	2.5×10	1.0×10^2	2.0×10	2.0×10

* Colony forming unit/gram of sample

All the samples analyzed were in agreement with the limits established by the RDC 12/2001 – ANVISA, which determines that *in natura*, refrigerated, or frozen bivalve mollusks, which are not to be consumed raw, show a maximum count of 10^3 CFU/g of positive coagulase staphylococcus (7). The samples analyzed also showed counts well below such limits. According to Jay, (18), presence of staphylococcus can be expected, even if in small amounts, in almost all foods of animal origin.

No significant statistical differences were observed at a level of significance of 5 between the averages of counts of positive coagulase staphylococcus in the different study regions (H: 2.1008; $p > 0.05$).

When evaluating 45 samples of oysters from cultivations located in Florianópolis, Pereira *et al*, (21), found only one sample polluted by positive coagulase staphylococci, while Ayulo *et al*, (2), evaluating samples of bivalve mollusks from coastal regions of Santa Catarina, detected the presence of *Staphylococcus aureus* in 60% of the samples. In this present study, about 12% (11/90) of the samples showed contamination by positive coagulase staphylococci.

All of the 180 samples analyzed showed absence of *Salmonella sp.*, complying with the current effective legislation, by the RDC 12/2001 - ANVISA, which establishes that *in natura*, refrigerated, or frozen bivalve mollusks, which are not to be consumed raw, show absence of *Salmonella sp.* in 25g of sample (7). Pereira *et al*, (21), did not find *Salmonella sp.* in any of the 90 samples analyzed; 30 of which were from the Ribeirão da Ilha region. Such result is in agreement with the results found in this study.

When evaluating the quality of *Perna perna* mussels cultivated on the coast of São Paulo, Galvão, (16), isolated *Salmonella sp.* in 1/15 of the samples analyzed, coinciding with the highest counts of coliforms at 45°C registered in that study. However, in this study no correlation between the counts of fecal coliforms or incidence of *Salmonella* was found. Another study evaluating the prevalence of *Salmonella sp.* in oysters, in the United States, found the presence of *Salmonella* in 7.4% of the total of oysters analyzed, and the largest number of positive samples was found during the summer months (4).

Although *Salmonella sp.* was not isolated in any of the samples of this study, this bacterium is among the most important causers of foodborne diseases; therefore, the appropriate cooking of this product prior to its consumption is highly recommended.

ACKNOWLEDGEMENTS

To CNPq SECIS/MCT - National Council of Scientific and Technological Development SECIS/Ministry of Science and Technology, Brazil; CT-Agro – Fund for the Agribusiness Sector; and to CT- Hidro - Fund for the Water Resources Sector; for financing the Project: “Hygienic and sanitary monitoring of the cultivation waters and of sea mollusks produced at Baía Sul, Florianópolis, Santa Catarina”, Brazil.

REFERENCES

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4 ed., Ed. Washington, D.C. 2001 1219p.
2. Ayulo, A.M.R.; Machado, R.A.; Scussel, V.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern of Brazil. *Int. J Food Microbiol.*, v.24, n.1-2, p.171-178, 1994.
3. Beirão, L.H; Teixeira, E; Meinert, E. M; Espírito Santo, M. L. P. *Processamento e industrialização de moluscos*. In: Seminário e Workshop Tecnologia para Aproveitamento Integral do Pescado, Campinas, 2000. *Palestra*. Campinas: ITAL, Centro de Tecnologia de Carnes, 2000, p. 38-84.
4. Brands, D. A., Inman, A.E; Gerba C.P.; Maré, C.J.; Billington,S.J.; Saif, L.A.; Levine J. F. and Joens, L.A. Prevalence of *Salmonella spp.* in Oysters in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 2, p. 893-897, 2005.
5. Brasil. Ministério da Agricultura. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal RIISPOA. Brasília, DF, 1980. 165 p.

6. Brasil. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. *Diário Oficial*. Brasília 22 de setembro de 1997.
7. Brasil. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. *Diário Oficial*. Brasília, 1 de janeiro de 2001.
8. Campos, H. *Estatística Experimental Não paramétrica*. 4ª ed. Piracicaba, São Paulo – Brasil. 1983. 349 p.
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Foodborne Outbreaks Response and Surveillance Unit - Outbreaks United States, 2000–2005*. [online] disponível na internet via http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb. Capturado em 28/11/2005.
10. Coelho, C; Heinert, A. P.; Simões, C.M.O.; Barardi, C.R.M. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, v.66, n.3, p.507–511, 2003.
11. Cook, D.W. Microbiology of bivalves molluscan shellfish. In: WARD, D.R.; HACKNEY, C. *Microbiology of marine food products*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. cap.2; p.19-34.
12. Food and Agriculture Organizations of the United Nations (FAO). *Fisheries and Aquaculture Department*. Cultured Aquatic Species Information Programme *Crassostrea gigas*. [online] disponível na internet via http://www.fao.org/fi/website/SwapLang.do?language=en&page=%2FFIRetrieveAction.do%3Fdom%3Dculturespecies%26xml%3DCrassostrea_gigas.xml#tcN1000DE Capturado em 21/03/2007.
13. Freitas, R.P.C.M. *Relatório de aula prática: Anatomia dos moluscos bivalves*. 2001 [online] disponível na internet via www.geocities.com/rui_biologia/tramabio.htm Capturado em 23/10/2006
14. Furlan, E.F. *Vida útil dos mexilhões Perna perna cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos*. 2004. 106p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz" - Universidade de São Paulo, São Paulo.
15. Galvão, J.A.; Furlan, E.F.; Sálán, E. de O.; Porto, E.; Oetterer, M. Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados na região de Ubatuba, SP. *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v.30, n. 6, p. 1124-1129, 2006.
16. Galvão, J.A. *Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP*. 2004. 109p. Dissertação

- (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz" - Universidade de São Paulo, São Paulo.
17. Imai, T. *Aquaculture in shallow seas: progress in shallow sea culture*. Rotterdam: A. A. Balkema, 1982. 615p.
 18. Jay, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6ª edição. Editora Artmed, 2005. 711p.
 19. Oliveira, A.C.M.; Himelbloom, B; Crapo, C.A.; Vorholt, C.; Fong, Q.; Ralonde, R. Quality of alaskan maricultures oysters (*Crassostrea gigas*): a one-year survey. *Journal of Food Science*. V. 71, n.9, p. 532-543, 2006.
 20. Oliveira Neto, F.M. *Síntese informativa da produção de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras) no estado de Santa Catarina em 2006* – Epagri/Cedap. Florianópolis, 2007. [online] disponível na internet via <http://www.epagri.rct-sc.br/> Capturado em 05/05/2007.
 21. Pereira, M.A.; Nunes, M.M.; Nuernberg, L.; Schulz, D; Batista, C.R.V. Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis - *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 37, n. 2, 2006.
 22. Silva, A. I. M.; Vieira, R. H. S. F.; Menezes, F. G. R.; Fonteles-Filho, A.; Torres, R.C.O; Santanna, E. S. Bactérias de origem fecal contaminantes de ostra *Crassostrea rhizophorae*, oriundas do estuário do Rio Cocó, Estado do Ceará, Brasil. *Braz. J. Microbiol.*, vol.35, n.1-2, p.126-130, jan./jun. 2003.
 23. Téllez, S.J.; Oliva, M.; Ramírez de León, J.A.; Vázquez, M. Evaluación de la calidad microbiológica del ostión de “La laguna madre” de Tamaulipas (México). *Cienc. Technol. Aliment.*, v.2, n. 3, p. 152-157, 1999.

APÊNDICE B**Artigo II:**

MONITORAMENTO DE *Vibrios sp.* EM OSTRAS (*Crassostrea gigas*) E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE ÁGUAS DE CULTIVO NA BAÍA SUL DA ILHA DE SANTA CATARINA

RAMOS, Roberta Juliano¹; PEREIRA, Murilo Anderson¹; MIOTTO, Leticia Adélia¹; SILVEIRA JR., Nelson²; FARIA, Renata D'Aquino¹; BATISTA, Cleide Rosana Vieira¹

Artigo sendo traduzido para ser submetido à revista Food Microbiology.

**MONITORAMENTO DE *Vibrios sp.* EM OSTRAS (*Crassostrea gigas*) E
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE ÁGUAS ONDE OS MOLUSCOS SÃO
CULTIVADOS DA BAÍA SUL DA ILHA DE SANTA CATARINA***

**RAMOS, Roberta Juliano¹; PEREIRA, Murilo Anderson¹; MIOTTO, Leticia Adélia¹; SILVEIRA JR.,
Nelson²; FARIA, Renata D'Aquino¹; BATISTA, Cleide Rosana Vieira¹**

RESUMO

As ostras são frequentemente ingeridas cruas ou parcialmente cozidas, devido a isto, o controle dos problemas sanitários que afetam a saúde pública é essencial para o desenvolvimento da aqüicultura como atividade econômica. Algumas espécies de vibrios, que podem estar naturalmente presentes no ambiente marinho, são patogênicas ao homem, e frequentemente envolvidas em surtos de infecção alimentar pelo consumo de ostras. Este trabalho monitorou a incidência e nível de contaminação por *vibrios sp.* em ostras (*Crassostrea gigas*), e acompanhou os parâmetros: temperatura, salinidade e pH das águas onde os moluscos são cultivados. Foram analisadas 180 amostras, provenientes de seis regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, durante um ano. As análises foram realizadas de acordo com BAM/FDA (2001). Os parâmetros temperatura e salinidade foram verificados *in loco*, e o pH no laboratório. Foram isoladas 39 cepas de vibrios em 25 amostras (13,88%). As espécies isoladas foram: *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. fluvialis*. Foram realizadas contagens de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, as quais ficaram entre <3 e 7 NMP/g, para ambas. Não houve diferença significativa entre as médias nas contagens de vibrios, salinidade, temperatura e pH nas diferentes regiões, sendo que o parâmetro temperatura apresentou uma correlação positiva com a incidência de vibrio. Estes resultados indicam a necessidade de um monitoramento constante, tanto destas bactérias, como da temperatura das águas nos cultivos, devido à presença, ainda que em baixas contagens, de espécies patogênicas.

PALAVRAS-CHAVE: ostras, vibrios, monitoramento, parâmetros físico-químicos, *Crassostrea gigas*.

INTRODUÇÃO

Face ao grande declínio dos recursos pesqueiros costeiros, ocasionado principalmente pela intensa exploração, aliada a degradação ambiental, os mexilhões e as ostras têm garantido a subsistência de parte da população ligada à pesca artesanal, tanto em termos de consumo como de comércio, em vários estados litorâneos brasileiros (SOUZA FILHO *et al*, 2003²¹; MACHADO, 2002¹⁴; VALENTI *et al*, 2000²⁴). Além de desenvolver uma forte consciência ecológica, a proteção das águas marinhas, da qual depende a qualidade do produto (POLI *et al*, 2004¹⁹).

* Parte de Dissertação de Mestrado do primeiro autor, em 2007, no Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias – UFSC – Florianópolis – SC – Brasil.

1 Núcleo de Microbiologia de Alimentos (NUMICAL) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL) – Centro das Ciências Agrárias (CCA) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Santa Catarina – Brasil.

2 Associação de Maricultores do Sul da Ilha (AMASI) – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil.

O desenvolvimento da maricultura como atividade econômica no litoral de Santa Catarina, passa por um momento importante, aonde a produção vem gradativamente aumentando e a oferta vem se equilibrando. Em função da transformação da aquicultura em um dos maiores setores da produção de alimentos, a avaliação apropriada e o controle dos problemas sanitários que afetam a saúde pública tornam-se atividades de essencial importância para seu desenvolvimento. Iguais aos produtos da pesca tradicional, os oriundos da aquicultura, como os moluscos bivalves, também sofrem deterioração e ação de patógenos e, portanto, necessitam dos mesmos cuidados básicos durante a manipulação ou processamento para a introdução nos diferentes canais de comercialização (BEIRÃO *et al*, 2000²).

Na aquicultura, os aspectos de saúde pública relacionados com o consumo de produtos provenientes desta atividade, se enfocam principalmente a evitar a presença de perigos biológicos e químicos. Estes perigos só podem ser eliminados por meio da introdução de programas de boas práticas nos locais de produção, assim como com a emissão e vigilância de normas e regulamentos específicos por parte das autoridades competentes (MARTÍNEZ & RODRIGUEZ, 2003¹⁵).

O consumo de moluscos, conforme registro em literatura especializada é responsável por inúmeros surtos epidêmicos e responde diretamente pelos problemas de saúde pública ocasionados, principalmente, quando os moluscos são ingeridos *in natura* e a qualidade sanitária do ambiente aquático onde eles são capturados está comprometida (JOSÉ, 1996¹²).

Os vibrios fazem parte da microbiota marinha e ambientes estuários, e algumas espécies podem causar infecções em humanos que consomem frutos do mar ou, que se expõem as águas marinhas (SOUSA *et al*, 2004²²). A concentração de vibrios depende das condições geográficas e hidrográficas, sua presença em organismos filtrantes é determinada por fatores como espécie, localização na coluna d'água, e tempo de permanência na água (LEE & YOUNGER, 2002¹³). PUJALTE *et al*²⁰, encontraram um predomínio de vibrios associados com ostras de cultivo, estando em concentrações acima de 6.5×10^5 UFC/g nas ostras, enquanto a quantidade na água do mar era de 10^2 UFC/ml.

Segundo o CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION⁶ (CDC), entre os anos de 2000 e 2005, foram registrados nos EUA, dez surtos de toxinfecções alimentares envolvendo a ingestão de ostras contaminadas por bactérias patogênicas. Destes, 70 % foram causados por *Vibrio parahaemolyticus*, 20% por *Vibrio cholerae* e 10% por *Salmonella typhi*, envolvendo, no total, cerca de 120 pessoas.

Esta pesquisa teve por objetivo monitorar a incidência e o nível de contaminação por *Vibrios sp.* em ostras (*Crassostrea gigas*), acompanhar e analisar os parâmetros físico-químicos nas águas onde os moluscos são cultivados provenientes de fazendas marinhas da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

Os pontos de coleta estudados encontram-se localizados em seis diferentes regiões no distrito do Ribeirão da Ilha, local de maior produção de moluscos bivalves no município de Florianópolis: Caieira da Barra do Sul (27° 48'849" S; 48° 33'981" W); Tapera do Ribeirão (27° 46'989" S; 48° 34'318" W); Costeira do Ribeirão (27° 44'350" S; 48° 33'890" W); Freguesia do Ribeirão (27° 43' 17,4" S; 48° 33'57,8" W), Barro Vermelho (27° 42'11,1" S; 48° 33'33,7") e Tapera da Base Aérea (27° 41'397" S; 48° 34'230" W), as quais foram identificadas, respectivamente, como pontos: A, B, C, D, E e F (Figura 1).

As coletas ocorreram entre março de 2006 e fevereiro de 2007, num total de 15 coletas. Cada amostra era composta por um *pool* de 12 ostras, Foram coletadas concomitantemente, duas amostras mensais, de cada uma das seis regiões de cultivo durante nove meses, e nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro foram realizadas coletas quinzenais, ou seja, quatro amostras mensais em cada uma das seis regiões, totalizando em doze meses 180 amostras. As ostras eram transportadas em caixas isotérmicas com gelo potável embalado, até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFSC, onde eram lavadas e todo material aderido às conchas era raspado e escovado sob água corrente de boa qualidade, para serem secas ao ar livre em bandeja desinfetada com álcool 70%.



Figura 1. Pontos de coleta nas seis diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.

Análises microbiológicas

As ostras foram abertas com faca estéril e, o líquido intervalvar e a carne, transferidos assepticamente para saco estéril, constituindo o *pool* de cada amostra, de onde eram pesadas 50g da amostra e adicionadas de 450 mL de tampão fosfato salina (PBS). Posteriormente, era desintegrada em Bagmixer. A partir dessa diluição (10^{-1}), eram efetuadas as diluições decimais seguintes para proceder à análise. Foi utilizada metodologia descrita no Bacteriological Analytical Manual 8^o ed. (2001)²³, que utiliza a Técnica do Número Mais Provável (NMP), em três séries de três tubos em diluições decimais e consecutivas, com incubação em estufa bacteriológica por 18-24h a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) em água peptonada alcalina (APW), e posterior isolamento em Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) com incubação a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). As colônias suspeitas de ser *Vibrios* sp. foram submetidas ao teste de motilidade, em ágar motilidade (SIM), teste da oxidase, utilizando fitas de oxidase da marca Newprov, e coloração de Gram para estudo da morfologia bacteriana. As cepas suspeitas nestes testes, e com características morfológicas de bacilos Gram negativos foram submetidas à identificação bioquímica das espécies através da utilização do kit API 20E da Biomérieux, a partir de uma suspensão bacteriana das culturas suspeitas, contendo 3% NaCl. O resultado das contagens foi obtido pela utilização da Tabela do NMP.

Parâmetros físico-químicos das águas onde os moluscos são cultivados

No momento da coleta dos moluscos, eram realizadas análises da temperatura e salinidade das águas onde os moluscos são cultivados, sendo a temperatura verificada utilizando termômetro portátil de mercúrio com graduação de 0,5° C e a salinidade foi verificada utilizando salinômetro portátil da marca Alkafit, modelo 211. Para verificar o pH, eram coletadas amostras de 1 litro, em frascos plásticos estéreis, e transportadas até laboratório, onde era verificado em pHmetro digital da marca Quimis, modelo Q-400A.

Análise estatística dos dados

As médias obtidas tanto nas contagens de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, como dos parâmetros físico-químicos nas diferentes regiões, foram submetidos a uma análise de variância ANOVA, através do programa *Statistica*[®] 6.0, utilizando um nível de significância de 5%. Quando observadas diferenças entre as médias das contagens e também nas médias

dos parâmetros físico-químicos, foi aplicado o teste de Tukey para compará-las. Para avaliar a correlação entre os parâmetros físico-químicos e incidência de *Vibrios sp.* foi utilizada Regressão Linear Múltipla e Correlação de *Pearson*, através da utilização do programa *Statistica*® 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento, identificação e contagens de *Vibrios sp.*

Das 180 amostras analisadas 25 (13,88%) apresentaram contaminação por *Vibrio spp.* A ocorrência de diferentes espécies de vibrios nestas amostras é apresentada na tabela 1. Matté, (1994) avaliando a distribuição de vibrios potencialmente patogênicos em ostras de região tropical do Brasil, armazenadas inapropriadamente, isolou sete espécies de vibrios, sendo que 81% das amostras apresentaram *V. alginolyticus*, 77% *V. parahaemolyticus*, 31% *V. cholerae* não-O1, 27% *V. fluvialis*, 19% *V. furnissii* e 12% *V. mimicus* e *V. vulnificus*.

Tabela 1 – Distribuição de diferentes espécies de vibrios em amostras de ostras contaminadas por *Vibrios spp* provenientes de seis regiões de cultivo da Baía Sul.

Espécie	25 Amostras Positivas	
	Nº	%
<i>V. alginolyticus</i>	17	68
<i>V. parahaemolyticus</i>	9	36
<i>V. vulnificus</i>	8	32
<i>V. cholerae</i>	4	16
<i>V. fluvialis</i>	1	4

De março a julho de 2006 não foi isolada nenhuma cepa de *Vibrio spp.* das ostras provenientes das seis diferentes regiões. Durante os meses de inverno foi isolada uma única cepa de *Vibrio vulnificus*, em agosto de 2006, enquanto nos meses de janeiro e fevereiro foram isoladas 38 cepas de diferentes espécies de vibrios, nas diferentes regiões de cultivo. Durante todo o monitoramento foram isoladas 39 cepas de vibrios, sendo que na região E a incidência foi maior em relação às outras regiões, e as regiões B e C tiveram a menor incidência (tabela 2). Em estudo realizado por Pereira *et al* (2004), que analisaram 50 amostras de moluscos bivalves, sendo estas 40 amostras de ostras provenientes de restaurantes

do Rio de Janeiro, e 10 amostras de mexilhões provenientes de banco natural de Niterói, foram isoladas 141 cepas de *V. parahaemolyticus*.

Em outro estudo, realizado por Sousa *et al*, (2004), investigando a incidência de *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* em 12 amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), provenientes de um criadouro natural, no estuário do rio Cocó, Fortaleza, Ceará – Brasil, foram confirmadas a presença de *V. cholerae* em 4 amostras e *V. parahaemolyticus* em apenas 1 amostra. A ocorrência de *V. cholerae*, coincidiu com a ocorrência de chuvas locais e redução nos níveis de salinidade do curso de água.

Tabela 2 - Número de cepas de diferentes espécies de vibrios isoladas de ostras provenientes das diferentes regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina entre março 2006 e fevereiro 2007.

Espécies	A	B	C	D	E	F	Total
<i>V. alginolyticus</i>	4	4	2	4	2	1	17
<i>V. cholerae</i>	0	0	0	2	1	1	4
<i>V. fluvialis</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	0	0	2	3	2	8
<i>V. vulnificus</i>	2	0	2	0	3	2	9
Total região	8	4	4	8	9	6	39

A espécie de *Vibrio* mais freqüente foi o *V. alginolyticus*, seguido de *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. fluvialis*.

Além do isolamento, também foram realizadas contagens de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* nas amostras analisadas, sendo que estas variaram de < 3 a 7 NMP/g, para ambas espécies. No Brasil a Resolução RDC nº12/2001⁵, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual estabelece os critérios e padrões microbiológicos para alimentos, não estabelece limites para *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, em moluscos bivalves *in natura*, devido a isto se utiliza como parâmetro a Portaria 451/1997⁴, já revogada, a qual estabelecia um limite de 5×10^3 NMP/g. de *V. parahaemolyticus* para moluscos *in natura*. Com base nesta legislação, as contagens realizadas apresentaram resultados bastante inferiores aos permitidos.

Em estudo realizado por ARCHER & MORETTO¹, (1994), foi pesquisada a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em quarenta amostras de mexilhões *Perna perna*

(Linnaeus, 1758) procedentes de banco natural da praia da Pinheira, município de Palhoça, Santa Catarina, durante um período de três meses, nas quais foi constatada a presença de *Vibrio parahaemolyticus*, em 52,5% das amostras, com níveis de contaminação entre <3 e 93 NMP/g. Em outro estudo realizado por PEREIRA¹⁸, (2006), que analisou 90 amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) provenientes de três diferentes áreas de cultivo de Florianópolis: Sambaqui, Cacupé e Ribeirão da Ilha, quanto a contaminação por *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, nenhuma das amostras analisadas apresentaram tais microrganismos.

Parâmetros físico-químicos das águas onde os moluscos são cultivados

Não foi observada diferença estatística entre as médias de temperatura e salinidade, durante as quinze coletas, nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul, como pode ser observado na tabela 3, embora, as maiores temperaturas e menores salinidades tenham sido observadas nas regiões D, E e F, localizadas ao norte desta Baía, de onde aproximadamente 60% das cepas de *Vibrios sp.* foram isoladas.

Tabela 3. Médias de temperatura e salinidade das 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.

Região	Média Temperatura (°C)	Média Salinidade (‰)
A	22,27*	33,97**
B	22,57*	34,03**
C	23,03*	33,47**
D	23,17*	33,33**
E	23,50*	33,13**
F	23,57*	32,90**

* $p = 0,8439$, não havendo diferença estatística entre as médias;

** $p = 0,6702$, não havendo diferença estatística entre as médias;

Observando as figuras 1 e 2, é possível visualizar o comportamento da temperatura e salinidade da água de cultivo, respectivamente, nas diferentes regiões durante as quinze coletas realizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina. A temperatura mínima registrada foi de 18°C e a máxima 29°C, sendo a temperatura média das águas onde os moluscos são

cultivados da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina de 23°C. Já a salinidade mínima ficou em 24‰ e a máxima 37‰, sendo a salinidade média encontrada de 33,5‰. GALVÃO⁹, (2004), estudando áreas de cultivos de moluscos bivalves na região litorânea de São Paulo, encontrou uma amplitude de variação reduzida em relação a este estudo, ficando as temperaturas naquela região entre 25 e 30°C.

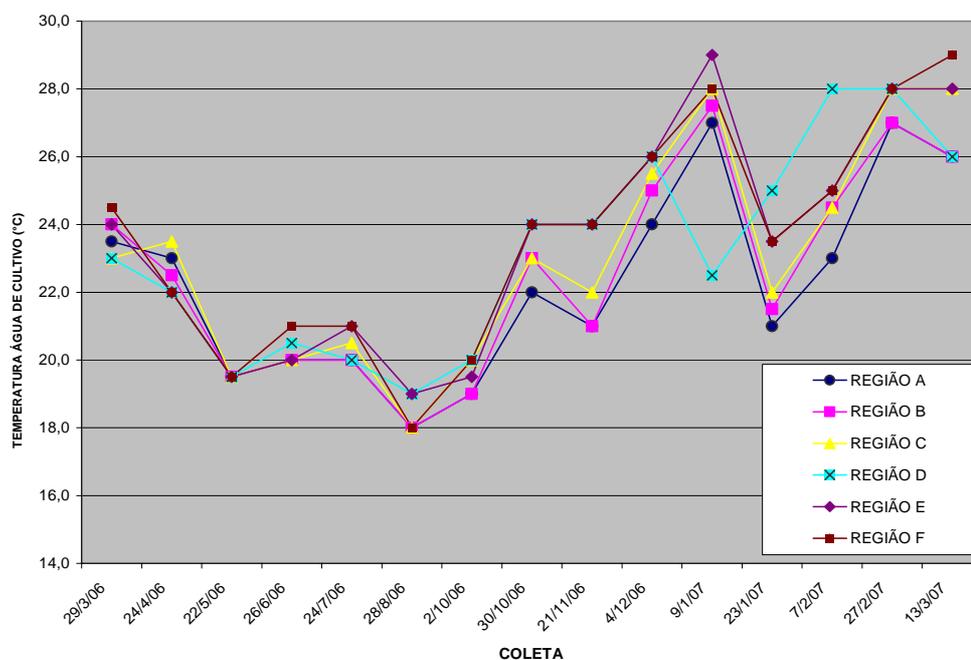


Figura 1. Temperatura nas seis regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina nas quinze coletas realizadas.

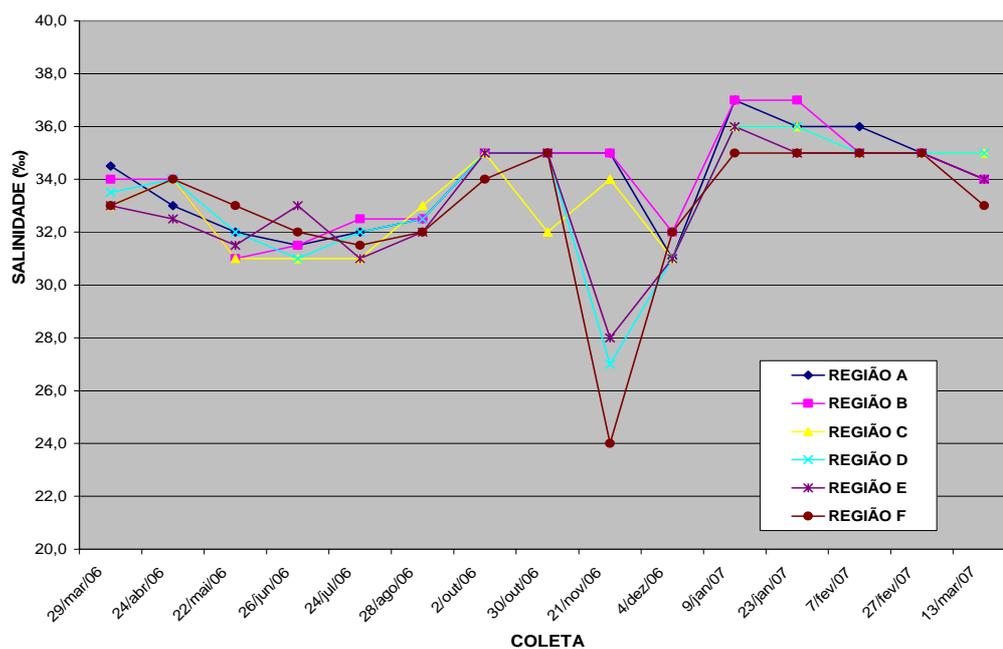


Figura 2. Salinidade nas seis regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina nas quinze coletas realizadas.

Em relação ao pH das amostras de água de cultivo, não houve diferença significativa, ao nível de 5%, entre as médias nas seis diferentes regiões ($p > 0,05$), sendo a amplitude de pH observada foi de 7,87 a 8,3. Todos os valores observados atendem a atual legislação brasileira, através da resolução CONAMA 357/2005³, que estabelece que o pH para águas salinas e salobras, deve estar entre 6,5 e 8,5.

Influência da temperatura e salinidade

A incidência de *vibrio sp.* em ostras (*Crassostrea gigas*), neste estudo, parece não ter sido influenciada pela salinidade das águas onde os moluscos são cultivados ($r = 0,1753$; $p = 0,75048$), no entanto apresentou uma correlação positiva com a temperatura das águas onde os moluscos são cultivados ($r = 0,5085$; $p = 0,00001$), ou seja, a medida que observamos um aumento na temperatura das águas, também foi possível observar o aumento na incidência de *vibrios sp.* nas ostras cultivadas (figura 3). CHÁVEZ et al⁸, (2005), estudando a influência da temperatura da água e salinidade na ocorrência de *Vibrio cholerae* em ostras produzidas em Veracruz, no México, encontrou uma correlação positiva, tanto com a temperatura, como com a salinidade da água de cultivo. Segundo JAY¹¹, (2005), a quantidade de *V. alginolyticus* encontradas em ostras, correlaciona-se com a temperatura das camadas superiores da água, sendo os maiores números associados a águas mais quentes.

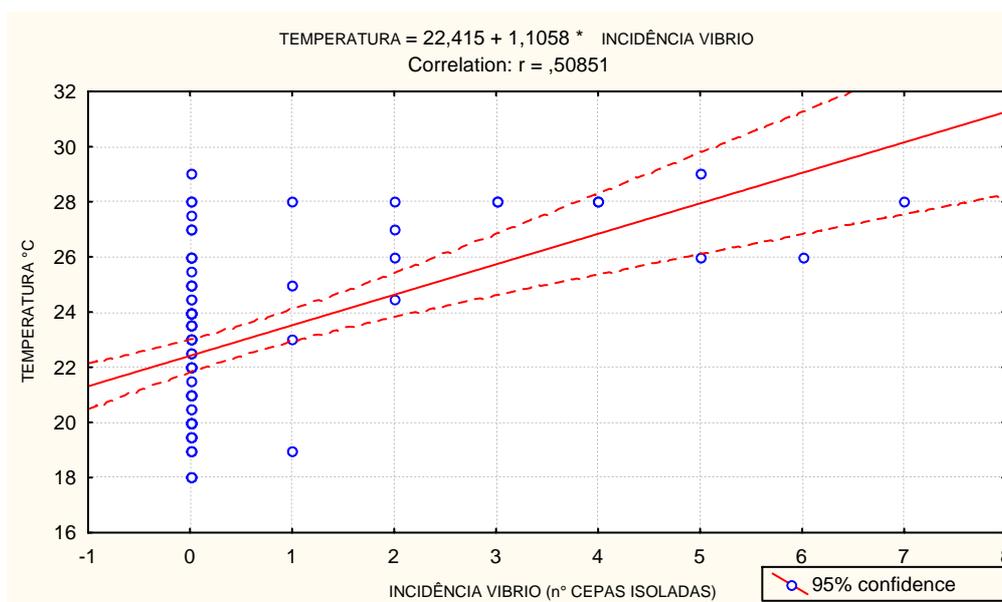


Figura 3 - Correlação entre incidência de vibrios nas ostras e temperatura das águas onde os moluscos são cultivados.

Segundo HLADY & KLONTZ, (1996)¹⁰, a concentração de *V. parahaemolyticus* nas águas marinhas aumenta com o aumento da temperatura destas, e corresponde com um aumento sazonal na ocorrência de casos esporádicos de infecções nos meses mais quentes.

De acordo com o CDC, (1999)⁷, vários surtos de infecção por *V. parahaemolyticus* no Noroeste Pacífico e no Texas, ocorreram durante os meses de verão, e para reduzir o risco de contaminação por *V. parahaemolyticus* e outras infecções através da ingestão de moluscos bivalves, as pessoas devem evitar ingeri-los crus ou mal cozidos, particularmente durante os meses quentes. O monitoramento das condições ambientais, como temperatura da água e salinidade, pode ajudar a determinar quando as áreas de cultivo de moluscos bivalves estarão abertas ou fechadas para coleta.

CONCLUSÃO

A presença de diferentes espécies de vibrios nas ostras de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, mesmo que em quantidades muito reduzidas, enfatiza a importância do monitoramento, principalmente das espécies conhecidamente patogênicas ao homem, especialmente nos meses de verão, quando as temperaturas das águas onde os moluscos são cultivados estão mais elevadas, frequentemente acima dos 25°C, o que parece influenciar no aumento da incidência dos vibrios nas ostras. Cabe destacar que, mesmo quando os moluscos, coletados diretamente dos cultivos, apresentam baixas contagens de vibrios, estas informações são muito importantes, pois enfatizam a necessidade do controle da temperatura desde a coleta até a distribuição das ostras oriundas dos cultivos, evitando assim uma multiplicação acelerada e indesejada destes microrganismos, que poderia ocorrer caso estes moluscos permanecessem expostos à temperatura ambiente. Desta maneira, o monitoramento de *vibrios sp.* tanto em ostras de cultivo, como em outras espécies de moluscos bivalves, é mais uma ferramenta a ser utilizada no controle de qualidade de produtos aquícolas, garantindo a sanidade do produto e conseqüente segurança alimentar para os consumidores finais.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq SECIS/MCT, CT-Agro e CT-Hidro, pelo financiamento do Projeto: “Monitoramento higiênico-sanitário das águas onde os moluscos são cultivados e de moluscos marinhos produzidos na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.”

ABSTRACT

The oysters are frequently ingested raw or undercooked, and had to this, the control of the sanitary problems that affect the public health is essential for the development of the aquaculture as economic activity. Some vibrios species that may be naturally present at the marine environment are pathogenic to men and are frequently involved in outbreaks of foodborne for the oysters' consumption. This work monitored the incidence and level of contamination for *vibrio sp.* in oysters (*Crassostrea gigas*), and followed the parameters: temperature, salinity, and culture waters pH. 180 samples, proceeding from six regions of culture had been analyzed of the South bay of the Island of Santa Catarina, during one year. The analyzes had been carried through in accordance with BAM/FDA (2001). The parameters temperature and salinity had been verified in lease, and pH in the laboratory. The isolated species had been: *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* and *V. fluvialis*. Counts of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* were performed which stayed between < 3 and 7 MPN/g, for both of them. These results indicate the necessity of a constant monitorament, as much of these bacteria, as of the temperature of the culture waters, due to presence, despite in low counting, of pathogenic species.

KEYWORDS

Oyster, Vibrios, *Crassostrea gigas*, parameters physicist-chemistries, monitorament;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARCHER, R. M. B; MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em Mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de Banco Natural do Litoral do Município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 10 (3): 379-386, jul/set, 1994.
2. BEIRÃO, H; TEIXEIRA, E; MEINERT, E.M., *et al.* **Processamento e industrialização de moluscos**. In: SEMINÁRIO E WORKSHOP TECNOLOGIA PARA APROVEITAMENTO INTEGRAL DO PESCADO, Campinas, 2000. Palestras. Campinas: ITAL, Centro de Tecnologia de Carnes, 2000. P. 38-84.
3. BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357 de 17 de março de 2005. **Diário Oficial**. Brasília 18 março de 2005.

4. BRASIL. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. **Diário Oficial**. Brasília 22 de setembro de 1997.
5. BRASIL. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. **Diário Oficial**. Brasília, 1 de janeiro de 2001.
6. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC Foodborne Outbreaks Response and Surveillance Unit - Outbreaks United States, 2000–2005. (online) disponível na internet via http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb Capturado em 28/11/2005
7. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1999. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Infection Associated with Eating Raw Oysters and Clams Harvested from Long Island Sound -- Connecticut, New Jersey, and New York, 1998. **Morbidity And Mortality Weekly Report**. Rep. 48. p.48–51.
8. CHÁVEZ, M. del R.C. et al. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. **Marine Pollution Bulletin**, vol. 50, no12, p. 1641-1648, 2005.
9. GALVÃO, J.A. Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP. São Paulo, 2004. 109f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz" - Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2004.
10. HLADY, W.G.; KLONTZ, K.C. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. **The Journal of infectious diseases**.V. 173. p. 1176-1183, 1996
11. JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª edição. Editora Artmed, 2005. 711p.
12. JOSÉ, V.F. Bivalves e a segurança do consumidor. São Paulo, 1996. 157f. Dissertação (Mestrado). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
13. LEE, R.J.; YOUNGER, A.D. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol.50, nº 3, p 177-183, 2002.
14. MACHADO, M. **Maricultura como Base Produtiva geradora de Emprego e Renda: estudo de caso para o distrito de Ribeirão da Ilha no município de Florianópolis – SC – Brasil**. (Tese de Doutorado). UFSC. Florianópolis, SC. 2002.

15. MARTÍNEZ, O.C ;RODRIGUEZ, L.M. **Manual de buenas prácticas de producción acuícola de moluscos bivalvos para la inocuidad alimentaria.** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. SENASICA - México. 2003.
16. MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H.; RIVERA, I. G.; MARTINS, M. T. Distribution of Potentially Pathogenic Vibrios in Oysters from a Tropical Region. **Journal of Food Protection**, v. 57, n° 10, p. 870-873, 1994.
17. PEREIRA, C. S; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.**, Campinas, v. 24, n. 4, 2004.
18. PEREIRA, M. A. *et al.* Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis – Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 2, 2006.
19. POLI,C.R.**Cultivo de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*, 1852).** In: POLI,C.R.; BASSANESI, A.T.; ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. *et al.* Aquicultura: experiências brasileiras. Ed. Multitarefa. Florianópolis, Brasil. 2004. p. 251-266.
20. PUJALTE, M. J. *et al.* Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. **International Microbiology**. V.2. p. 259–266. 1999.
21. SOUZA FILHO, J. *et al.* Custo de produção da ostra cultivada. Florianópolis: Instituto Cepa/SC. 23 p. **Cadernos de indicadores agrícolas**, 2003.
22. SOUSA, O. V. de *et al.* Isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* em ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas em um criadouro natural no estuário do rio Cocó, Fortaleza, Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 46, n. 2, 2004.
23. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION (US FDA/CFSAN). **Bacteriological Analytical Manual 8° ed.** (BAM) Online. 2001. Disponível em: <[http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)>. Acessado em 05/11/2005.
24. VALLE, R.P., PROENÇA, C.E.M. **Evolução e perspectivas da aquíicultura no Brasil.** In: VALENTI, W. C. *et al.* **Aquíicultura no Brasil: bases para um**

desenvolvimento sustentável. c. 13. p. 383-398. Brasília: CNPq / Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. 399p.