

UFRB

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA**

CARLA SILVA DA SILVEIRA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E OSTRAS EM UMA ÁREA DE
CULTIVO DE MOLUSCOS BIVALVES NO ESTUÁRIO DO RIO GRACIOSA,
TAPERÓA, BAHIA**

**CRUZ DAS ALMAS
2012**

CARLA SILVA DA SILVEIRA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E OSTRAS EM UMA ÁREA DE
CULTIVO DE MOLUSCOS BIVALVES NO ESTUÁRIO DO RIO GRACIOSA,
TAPERÓA, BAHIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à Coordenação do Curso
de Graduação em Engenharia de
Pesca, da Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, como requisito
parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Norma Suely
Evangelista Barreto

**CRUZ DAS ALMAS
2012**

CARLA SILVA DA SILVEIRA

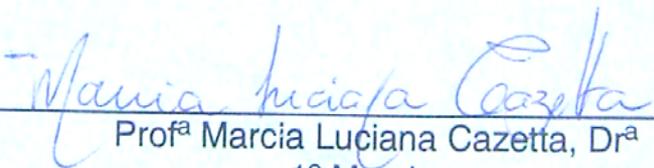
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E OSTRAS EM UMA ÁREA
DE CULTIVO DE MOLUSCOS BIVALVES NO ESTUÁRIO DO RIO
GRACIOSA, TAPEROÁ, BAHIA

Este trabalho de Conclusão de Curso foi submetido à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

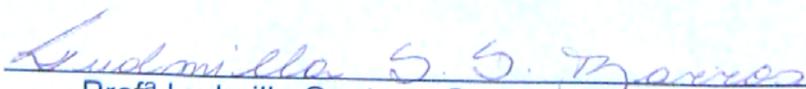
Aprovada em 08 de março de 2012



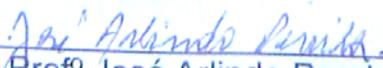
Prof^a Norma Suely Evangelista Barreto, Dr^a
Orientador
UFRB



Prof^a Marcia Luciana Cazetta, Dr^a
1^o Membro
UFRB



Prof^a Ludmilla Santana Soares e Barros, Ph. D.
2^o Membro
UFRB



Prof^o José Arlindo Pereira, Dr^o.
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

AGRADECIMENTOS

À Deus, sem a fé nada haveria de concreto;

À minha mãe Marilêde e meu pai Carlos, tão atenciosos, carinhosos e preocupados comigo, em relação ao meu sono, minha alimentação, minha saúde e em todos os aspectos;

Ao meu futuro marido Ednaldo, por toda a força e paciência que teve comigo durante o tempo de universidade, suportando a distância e ficando sempre na torcida da minha vitória, beijos, te amo!

Aos meus queridos irmãos Aldo e Adson, cunhadas Thamires e Telma, que torcem pelo meu sucesso;

Aos meus sobrinhos que me fazem rir nos momentos de descontração com a família;

A professora Soraya Fonteles, pois se não fosse por ela, eu não teria conhecido o curso de Engenharia de Pesca;

A minha orientadora Norma Suely Evangelista Barreto que me proporcionou a oportunidade de trabalhar na área de microbiologia. Obrigada pela confiança, atenção e apoio durante todo o estudo e pela amizade que se estabeleceu durante esse período de convivência;

As meninas do laboratório, em especial Rebeca, pois tudo que hoje sei agradeço à sua dedicação e paciência;

A equipe de coleta, pois sem vocês o trabalho não teria acontecido;

A todos que de forma direta e indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“À MINHA FAMÍLIA POR TODA
FORÇA, INCENTIVO E
CORAGEM ME TRANSMITIDOS
DURANTE ESTES CINCO ANOS
DE ESTUDO. FAMÍLIA, AMO
VOCÊS!”

RESUMO

O cultivo de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) no município de Graçiosa-BA tem como influência as águas da desembocadura do rio Una, corpo d'água que sofre com o lançamento de esgotos domésticos pela falta de saneamento básico no município. Com base nisto, este trabalho teve como objetivo analisar a qualidade microbiológica da água e das ostras em uma área de cultivo de moluscos bivalves, usando como bioindicadores o grupo dos coliformes e *Salmonella* sp. Para isso foram realizadas 11 coletas de água e 12 de ostras no período de dezembro de 2010 a novembro de 2011, com amostragens mensais em três pontos de água e uma de ostra. O Número Mais Provável de coliformes termotolerantes nas amostras de água no Ponto P1 (a montante do cultivo) variou de $<1,8$ a $2,4 \times 10^4$ NMP/100 mL, no Ponto P2 (área do cultivo) variou de $< 1,8$ a $1,6 \times 10^5$ NMP/100 mL e o no Ponto P3 (a jusante do cultivo) os valores foram de $<1,8$ a $5,4 \times 10^5$ NMP/100 mL. Nas amostras de ostras o NMP/100 g foi de $<1,8$ a $3,5 \times 10^4$. A presença de *Salmonella* sp., foi observada tanto nas amostras de água (12%) quanto nas amostras de ostras (25%). A elevada carga microbiana nas amostras analisadas demonstra que a área do estuário do rio Una, não é propícia ao cultivo de moluscos bivalves, a não ser que os organismos passem por um processo de depuração ou tratamento térmico antes de serem encaminhados para o consumidor.

ABSTRACT

The cultivation of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the city of Graçiosa-BA is to influence the waters of the mouth of the Una river, water body that suffers with the release of domestic sewage by a lack of sanitation in the city. On this basis, this study aimed to analyze the microbiological water quality and oyster cultivation in an area of bivalve molluscs, using the group as bioindicators of fecal coliforms and *Salmonella* sp. Were performed to 11 samples of water and 12 of oysters in the period December 2010 to November 2011 with monthly sampling at three points of water and one oyster. The Most Probable Number of thermotolerant coliform in water samples at the point P1 (upstream of cultivation) ranged from <1.8 to 2.4×10^4 NMP/100 mL, the point P2 (cultivation area) ranged from $<1, 8$ to 1.6×10^5 NMP/100 mL Point and P3 (downstream of cultivation) values were <1.8 to 5.4×10^5 NMP/100mL. In the oyster samples NMP/100 g was <1.8 to 3.5×10^4 . The presence of *Salmonella* sp. was observed both in the samples water (12%) as the oyster samples (25%). The high microbial load in the samples shows that the area of the estuary of the river Una, not favors the cultivation of bivalve molluscs, except that the bodies pass through a purification process or heat treatment before being forwarded to the consumer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1. Contaminação do ambiente e doenças transmitidas pelo consumo de moluscos.....	14
3.2. Cultivo de moluscos bivalves.....	16
3.3. Ostras (<i>Crassostrea rhizophorae</i>).....	16
3.4. Bactérias entéricas.....	17
3.5. Micro-organismos indicadores.....	18
3.6. O gênero <i>Salmonella</i>	20
3.7. <i>Escherichia coli</i>	23
3.8. Controle sanitário da produção de moluscos bivalves.....	24
4. MATERIAL E METÓDOS.....	27
4.1. Área de estudo.....	27
4.2. Coleta da água e da ostra.....	28
4.3. Análise microbiológica da água e da ostra.....	29
4.3.1. Contagem de coliformes termotolerantes.....	29
4.3.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	33
4.4. Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Mapa com a localização da área de estudo em Valença, Bahia.	27
FIGURA 2 – Transporte das amostras de água.....	28
FIGURA 3 – Lavagem das ostras.....	28
FIGURA 4 – Esquema para a quantificação e identificação de coliformes termotolerantes isolados em amostras de água e ostra de cultivo.....	30
FIGURA 5 – Teste Vermelho de Metila.....	32
FIGURA 6 – Teste Voges-Proskauer.....	32
FIGURA 7 – Teste do Citrato de Simmons.....	33
FIGURA 8 – Crescimento típico de <i>Salmonella</i> sp. nos meios seletivos XLD e BS.....	34
FIGURA 9 – Reação positiva para <i>Salmonella</i> sp. nos meios da triagem.....	35
FIGURA 10 – Teste de Uréia.....	37
FIGURA 11 – Teste do indol.....	37
FIGURA 12 – Teste do malonato.....	38
FIGURA 13 – Soroaglutinação.....	38
FIGURA 14 – Número Mais Provável (Log/100 mL) de coliformes termotolerantes nas amostras de água no estuário do Rio Graciosa, durante o período de dezembro de 2010 a novembro de 2011.....	41
FIGURA 15 – Percentual de cepas de <i>Salmonella</i> sp., presente nas amostras de água no estuário do rio Graciosa.....	44
FIGURA 16 – Percentual de cepas de <i>Salmonella</i> sp., presente nas amostras de ostra.....	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número Mais Provável de coliformes termotolerantes em amostras de água coletados no estuário do Rio Una durante o período de dezembro de 2010 a novembro de 2011.....	39
TABELA 2 – Número Mais Provável de coliformes termotolerantes, presença de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> nas amostras de ostras de cultivo analisadas durante o período de dezembro/2010 a novembro/2011.....	42
TABELA 3 – Classificação das amostras de ostra, conforme The European Union Shellfish Quality Assurance Programme (EUSQAP).....	43

LISTA DE SIGLAS

DTA's – Doenças Transmitidas por Alimentos

DIP – Doenças Infecciosas e Parasitárias

OMS – Organização Mundial da saúde

SIRVETA – Sistema Regional de Informação sobre Vigilância Epidemiologia das
Enfermidades Transmitidas por Alimentos

INPPAZ – Instituto Panamericano de Proteção de Alimentos e Zoonoses

OPS – Organização Panamericana de Saúde

SIM – Sistema de Informações Hospitalares

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

DAEC – *Escherichia coli* difusa aderente

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SIF – Serviço de Inspeção Federal

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

FDA – Food and Drug Administration

NMP – Número Mais Provável

TSA – Tryptic Soy Agar

BPW – Água Peptona Alcalina

XLD – Agar Lisina Desoxicolato Xilose

BS – Agar Bismuto Sulfito

TSI – Agar Triplice Ferro

LIA – Agar Lisina Ferro

EUSQAP – The European Union Shellfish Quality Assurance Programme

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o nível de contaminação nos ambientes marinhos vem aumentando devido à ação humana, crescimento demográfico e desenvolvimento industrial, fazendo com que a água se torne um elemento paradoxal, sendo ao mesmo tempo um recurso indispensável e um veículo de contaminantes (SCHNURSTEIN e BRAUNBECK, 2001).

As doenças de veiculação hídrica são causadas, principalmente, por micro-organismos patogênicos de origem entérica, animal ou humana, transmitidas basicamente pela rota fecal-oral, ou seja, são excretados nas fezes de indivíduos infectados (NIKAIDO *et al.*, 2004).

Dentre as principais doenças de veiculação hídrica transmitida pela água contaminada, destacam-se a febre tifóide, a cólera, a salmonelose, a shigelose, a poliomielite, a hepatite A, parasitoses e gastroenterites que são responsáveis por vários surtos epidêmicos e por elevadas taxas de mortalidade infantil. Em decorrência disso, conhecer a qualidade microbiológica da água é importante para a saúde pública (FREITAS, BRILHANTE e ALMEIDA, 2001).

O lançamento de esgotos domésticos e industriais tem sido a principal fonte de contaminação dos ambientes costeiros, sendo responsável pelas principais alterações na qualidade destes ecossistemas, diminuindo a sua eficiência e comprometendo a qualidade dos organismos que ali vivem (CHALER *et al.*, 2004), principalmente da pesca que é um componente importante como meio de subsistência da população em diversas partes do mundo, em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

O consumo de moluscos bivalves marinhos é uma prática crescente em todas as regiões litorâneas do Brasil, devido às riquezas dos recursos naturais do ecossistema aquático. As ostras, *Crassostrea rhizophorae*, são geralmente consumidas *in natura* sem prévio cozimento e adicionada de algumas gotas de limão. Essa característica de preparo do alimento torna-o um risco potencial para a saúde humana, pois os moluscos alimentam-se, por processo de filtração, de partículas e micro-organismos em suspensão na água, permitindo a retenção e acúmulo de poluentes e bactérias patogênicas (PEREIRA, VIANA e RODRIGUES, 2007).

As ostras têm a capacidade de filtrar cerca de 2 a 5 litros de água/hora, assimilando, além do alimento, contaminantes bióticos e abióticos presentes na água (JOSÉ, 1999). Em virtude disso, a qualidade microbiológica da carne de ostra está intimamente relacionada às condições do ambiente em que a mesma se encontra, principalmente quando se trata de poluentes fecais. Os moluscos bivalves, quando cultivados ou extraídos de águas com elevado índice de poluição, podem acumular em seus tecidos diversas bactérias, como os gêneros *Salmonella*, *Escherichia* e *Shigella* e, por isso tornam-se um risco a Saúde Pública, devido à veiculação de micro-organismos patogênicos ao homem (PEREIRA *et al.*, 2006).

A *Salmonella* é uma bactéria amplamente distribuída na natureza, sendo o seu principal reservatório o trato intestinal do homem e animais de sangue quente e frio, com exceção dos peixes, moluscos e crustáceos, que são contaminados após a pesca ou sua extração (COSTA *et al.*, 2007). Surtos de salmonelose têm aumentado ao redor do mundo, envolvendo principalmente alimentos de origem marinha (NUNES, 2007).

O grupo dos coliformes termotolerantes são encontrados normalmente no intestino do homem e animais de sangue quente, são eliminados em grandes quantidades nas fezes, e por isso, utilizados como indicadores de péssimas condições sanitárias. A *Escherichia coli* é uma bactéria estritamente de origem fecal, isolada a partir de fezes humanas e de animais e a sua presença na água indica contaminação recente, através do lançamento de dejetos domésticos e/ou industriais. Isso a caracteriza como melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o presente momento (SILVA *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a qualidade microbiológica da água e ostras cultivadas no estuário do Rio Graciosa – Taperóia - Bahia.

2.2. Objetivos específicos

- Quantificar as bactérias entéricas coliformes termotolerantes, na água e no tecido das ostras;
- Avaliar a presença de *Salmonella* sp. na água de cultivo e no tecido das ostras.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Contaminação do ambiente e doenças transmitidas pelo consumo de moluscos

A bacia hidrográfica é a unidade a ser considerada quando se deseja a preservação de recursos hídricos, uma vez que o volume e a qualidade da água de um manancial dependerão dos seus afluentes e das ações desenvolvidas em torno da bacia. Os mananciais, de um modo em geral, vêm sofrendo degradações em suas bacias hidrográficas, devido ao avanço desordenado da região urbana, associado à carência de coleta e tratamento de esgoto (TSUTIYA, 2006).

Em cidades litorâneas, a contaminação dos corpos d'água é um problema de saúde público, podem causar diversas enfermidades aos banhistas e comprometer a qualidade do pescado retirado daquela região (CERUTTI, 1996). A contaminação dos ambientes aquáticos por micro-organismos patogênicos constitui-se um veículo potencial causador de doenças, tanto de origem viral quanto bacteriana (PARASHAR *et al.*, 2003).

Para Pitt (1995) uma das principais fontes de contaminação se deve à degradação do ambiente, muitas vezes decorrente do lançamento de efluentes domésticos, industriais e agrícolas, sendo que um dos efeitos mais graves do escoamento superficial urbano de uma região é o comprometimento da qualidade sanitária das águas.

Os surtos que podem ser transmitidos pela água pertencem ao grupo de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP), estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e são doenças infecciosas intestinais caracterizadas por gastroenterites (TSUTIYA, 2006).

Devido ao fato dos estuários se encontrarem próximos à costa, os moluscos estão sujeitos a receber uma maior carga poluidora proveniente de esgotos, principalmente quando se trata de grandes centros urbanos. O perigo dessa poluição é a presença de bactérias e vírus patogênicos ao homem, tornando-se um problema de saúde pública, decorrente do consumo de moluscos *in natura* ou levemente cozidos (BEIRÃO *et al.*, 2000).

Segundo Sincero (2005), nos últimos anos foi detectado um aumento da poluição em locais de cultivo de moluscos no Estado de Santa Catarina, comprovados pela presença de patógenos virais e bacterianos nos moluscos e na água de cultivo.

Gillespie *et al.* (2001) relataram que 33% dos surtos envolvendo moluscos na Inglaterra e País de Gales entre 1992 a 1999 foram associados a patógenos virais, enquanto Bean *et al.* (1997) relataram que 7% dos casos de salmonelose nos Estados Unidos foram diretamente ligados ao consumo de moluscos bivalves.

As doenças associadas ao consumo de moluscos podem ser divididas em dois principais grupos: doenças causadas por bactérias residentes no ecossistema aquático como o *Vibrio parahaemolyticus* e o *Vibrio cholerae* ou bactérias presentes no ambiente proveniente de contaminação fecal como *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli* (FELDHUSEN, 2000).

A microflora bacteriana presente na carne das ostras reflete as condições do ambiente onde elas se encontram. Fatores como a temperatura, a salinidade e a variação da maré no ambiente de cultivo, bem como a forma de coleta e as condições de transporte e armazenamento das ostras, também têm influência sobre a sua qualidade higiênico-sanitária (GERMANO, GERMANO e OLIVEIRA, 1998).

De acordo com dados do Sistema Regional de Informação sobre Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (SIRVETA), coordenado pelo Instituto Panamericano de Proteção de Alimentos e Zoonoses (INPPAZ) da Organização Panamericana de Saúde (OPS/OMS), mesmo apesar do subregistro, ocorreram 6.930 surtos de DTA's em países da América entre os anos de 1993 a 2002, dos quais 17,8% foram associados ao consumo de pescado e 16,1% à água (OPAS/OMS, 2005, apud SANTOS, 2010).

No Brasil, segundo os dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, entre os anos de 1999 a 2004 ocorreram mais de 3.400 internações por DTA's, com uma média de 570 mil casos por ano (CARMO *et al.* 2005).

3.2. Cultivo de moluscos bivalves

O cultivo de moluscos marinhos está concentrado principalmente na Região Sul do Brasil, mais precisamente em Santa Catarina, em virtude das características ambientais propícias ao desenvolvimento desses organismos, que necessitam de águas com temperatura amena e rica em nutrientes (BEIRÃO *et al.*, 2000).

No Brasil, a mitilicultura foi responsável por 84,5% das 13.107 t de moluscos produzidos em 2009, com a produção de ostras respondendo por 15,5% do total, no mesmo período (MPA, 2007).

Dentre os bivalves cultivados as ostras se destacam, devido à sua alta fecundidade, rápido crescimento e rentabilidade comercial (HERNÁNDEZ, TROCCOLI e MILLIÁN, 1998).

A principal vantagem do cultivo está relacionada ao fato de permitir o controle, praticamente total, dos problemas de toxicidade e contaminação microbiológica, quando comparados com os moluscos bivalves capturados diretamente do ambiente (IVERSEN, 1982 apud PEREIRA, 2003).

Para Brandini *et al.* (2000) o cultivo de moluscos bivalves no Brasil possui grande potencial, graças à grande quantidade de baías, enseadas e regiões estuarinas, e à excelente produtividade natural das águas brasileiras, apresentando vantagem quando comparado a outros países produtores.

O cultivo de moluscos bivalves constitui uma atividade que se caracteriza pelo baixo custo de implantação e manutenção e pelo retorno relativamente rápido do capital investido. Isto faz com que seja considerado como uma opção de trabalho e renda para as populações de pescadores artesanais, podendo ser consorciado com o cultivo de outros organismos, como camarões e peixes (VALENTIM, 2005).

3.3. Ostras (*Crassostrea rhizophorae*)

As ostras são moluscos bivalves, que pertencem à família Ostreidae e ao filo Mollusca, caracterizadas por serem organismos com estrutura física composta por um corpo macio, protegido por duas conchas calcárias duras e unidas por um ligamento tipo dobradiça em uma das extremidades (WHEATON, 2007).

Esses organismos possuem uma distribuição geográfica que abrange desde a região sul do Caribe, passando pela Venezuela, Suriname e Brasil até o Uruguai, ocupando uma zona de entremarés, fixando-se nas raízes do *Rhizophora mangle* e, quando presente na praia, se fixa em rochas (RIOS, 1994). São animais hermafroditas sequências, isto é, em um mesmo indivíduo, um período de sua vida pode ser do sexo masculino e depois do sexo feminino (POLI, POLI e TEIXEIRA, 2006).

A carne da ostra propriamente dita está ligada à sua concha nas extremidades do músculo adutor e possui importante valor econômico e nutricional, sendo considerado um alimento ideal pelo alto teor de proteínas, vitaminas e sais minerais (BARNABÉ, 1996).

O alimento que provém da água, passa pelas brânquias, que funcionam como um filtro, e concentram partículas orgânicas, como microalgas e zôoplancton que servem de alimento para o animal. A capacidade filtradora de uma ostra pode chegar a 10L de água por hora e cerca de 200L ao dia (WARD, 1996).

Por apresentar essas características, as ostras são consideradas reservatórios de diversos patógenos humanos, podendo bioacumular primariamente bactérias, vírus entéricos e protozoários, relacionados à contaminação fecal nos locais de cultivo (LEE; PANICKER; BEJ, 2003). Por isso, se faz necessário o monitoramento de áreas de cultivos, uma vez que as ostras são consumidas na forma *in natura*.

3.4. Bactérias entéricas

As bactérias que habitam o trato gastrointestinal de humanos e alguns animais de sangue quente pertencem à família das Enterobacteriaceae. Esta família possui uma ampla distribuição e apresenta uma ecologia bastante heterogênea (BERGEYS MANUAL, 1994).

As bactérias desta família podem ser patogênicas para os humanos, animais invertebrados e até mesmo para os vegetais. Um grande número de espécies causa doenças gastrointestinais, febre tifóide e a disenteria bacilar. Algumas são residentes permanentes, enquanto outras são encontradas somente em uma fração da população e outras, ainda, são somente agentes de doenças (CORRÊA, 2006).

Dentre os micro-organismos considerados um risco à saúde destacam-se a *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* enteropatogênica, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia* spp., *Vibrios* spp. entre outros. A presença de qualquer um desses micro-organismos, em águas estuarinas ou marinhas, podem conseqüentemente contaminar os moluscos presentes (LEE e YOUNGER, 2003).

As enterobactérias, que se encontram no pescado, são resultado da contaminação fecal em decorrência da poluição das águas naturais ou dos ambientes aquáticos, onde estes micro-organismos podem sobreviver durante um longo período (HUSS, 1997).

3.5. Micro-organismos indicadores

A avaliação da qualidade sanitária das águas e mariscos deve ser realizada através de programas de monitoramento com a utilização de micro-organismos indicadores, que avaliam as respostas da exposição destes aos contaminantes presentes no ambiente aquático (MELANCON, 1995).

Para que um micro-organismo seja considerado um bom indicador de contaminação fecal ele deve apresentar características diferentes dos agentes patogênicos, estar intimamente ligado à área proveniente de esgotos e deve apresentar maior número que os patógenos no ambiente. Bons indicadores são incapazes de se reproduzir em ambientes aquáticos e podem ser facilmente isolados, enumerados e ter seu crescimento inibido. Outra característica importante a ser observada é se estes micro-organismos têm sua densidade diretamente relacionada com o grau de contaminação fecal e/ou se há risco à saúde, dependendo do grau de poluição (RIBEIRO, 2002).

A realização de testes de colimetria, utilizado na pesquisa de coliformes, para a classificação das águas onde os moluscos bivalves são cultivados ou coletados, é de grande importância para os órgãos de fiscalização e controle dos alimentos, pois a presença desses micro-organismos indica deficiência no controle das condições higiênico sanitário (LIRA *et al.*, 2000).

O grupo de micro-organismos mais utilizados como indicadores de contaminação são as bactérias e dentre elas, destacam-se a *Escherichia coli* e a

Salmonella sp., como indicadores de contaminação do ambiente de cultivo (FELDHUSEN, 2000).

Os coliformes totais são bactérias que apresentam a forma de bastonetes Gram-negativos, são aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Este grupo inclui cerca de 20 espécies, dentre elas encontram-se bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente e também espécies de bactérias não entéricas, como a *Serratia* e *Aeromonas*. Em virtude disso, a enumeração dos coliformes totais em amostras de água e alimentos possui uma menor representatividade de indicação fecal, do que a quantificação de coliformes termotolerantes e *E. coli* (SILVA *et al.*, 2010).

O grupo dos coliformes termotolerantes tem sido utilizado como indicador de poluição fecal, devido à sua presença em grande quantidade nas fezes e por ser facilmente isolado e identificado a partir de técnicas simples e rápidas. A alta densidade de coliformes termotolerantes em águas marinhas indica um alto nível de contaminação pelo lançamento de esgotos, podendo afetar a saúde dos banhistas e a qualidade dos moluscos provenientes da região (CETESB, 2003). Dentro deste grupo estão inclusos pelo menos três gêneros, que são *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais os dois últimos incluem cepas de origem não fecal. As principais vantagens do grupo dos coliformes como indicadores de poluição é o fato de serem encontrados no intestino de humanos e animais de sangue quente, por serem eliminados em quantidade significativa nas fezes e estar presente em esgotos, podendo ser quantificados em águas recentemente contaminadas (SILVA *et al.*, 2010).

Para Martins (1983) apud GALVÃO, (2004), a pesquisa de *Salmonella* e *Vibrio* em moluscos bivalves é de grande importância para a saúde pública, pois estes micro-organismos estão relacionados a casos de gastroenterites e toxinfecções em indivíduos que consomem o alimento cru ou mal cozido.

A restrição da utilização de outros micro-organismos no estudo de indicadores de poluição está ligada à pequena presença destes micro-organismos em água poluída e a dificuldade das técnicas de isolamento dos mesmos (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1996).

3.6. O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae que abrange bacilos Gram-negativos não esporogênicos, anaeróbios facultativos, capazes de produzir gás a partir da glicose (exceção *Salmonella* sorovar typhi) e utilizam o citrato como única fonte de carbono. A maioria das espécies são móveis, com flagelos peritríquios, exceto as espécies *S. pullorum* e *S. gallinarum*, que não apresentam motilidade. A temperatura ideal de multiplicação deve estar compreendida entre 35-37°C, tendo a mínima de 5°C e a máxima de 47°C, com o pH próximo de 7,0, além de não tolerarem alta concentração de sal (FRANCO e LANDGRAF, 2006).

São bactérias patogênicas que causam febre tifóide, febre entérica, gastroenterites e septicemia. Mundialmente, esse gênero é reconhecido como um importante agente etiológico de doenças relacionadas ao consumo de alimentos (LI, BOUDJELLAB e ZHAO, 2000). A *Salmonella* é amplamente distribuída na natureza e tem como principal reservatório o trato intestinal de animais de sangue quente e frio, com exceção dos peixes, moluscos e crustáceos, que podem ser contaminados após a pesca ou a sua extração (COSTA *et al.*, 2007). Animais como os cães, gatos, pássaros e outros podem ser portadores de *Salmonella*, representando assim um risco para as crianças. Vários surtos de infecção causados por *Salmonella* são relatados envolvendo vários tipos de alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 2006).

O gênero *Salmonella* é composto por apenas duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*. Esta nomenclatura reflete o entendimento atual da taxonomia da *Salmonella*. O número atual de sorovares para cada uma das espécies e subespécies de *Salmonella* é de 2.610, onde 1.547 pertencem a *S. enterica* subsp. *entérica*, 513 a *S. enterica* subsp. *salamae*, 100 a *S. enterica* subsp. *arizonae*, 341 a *S. enterica* subsp. *diarizonae*, 73 a *S. enterica* subsp. *houtenae*, 13 a *S. enterica* subsp. *indica* e 23 a *Salmonella bongori* (TINDALL *et al.*, 2005).

Sorovares que pertencem a *S. enterica* subsp. *enterica* são tipicamente designados por um nome geralmente relacionado com o lugar geográfico onde o sorovar foi isolado pela primeira vez. O nome do sorovar não é escrito em itálico, utilizam-se letras romanas, sendo a primeira letra maiúscula. Sorovares pertencentes a outras subespécies são designados pela sua fórmula antigênica, seguindo o nome da subespécie (GRIMONT e WEILL, 2007).

Dentre os vários sorotipos existentes, os que mais estão presente em humanos são *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, sendo responsáveis por 75% dos casos de doenças. *Salmonella* Enteritidis tem sido bastante documentada em surtos relacionados ao consumo de produtos aviários, particularmente ovos, enquanto *S. Typhimurium* tem sido relacionada à contaminação de alimentos de origem animal (LIEBANA, 2002).

Os alimentos contaminados por esta bactéria normalmente são de origem animal, apresentando aparência e cheiro normal. O alimento pode ser contaminado através das mãos do manipulador, que não realiza de forma correta a higienização das mãos, embora através do cozimento seja possível a eliminação da bactéria (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2009).

Indivíduos com salmonelose apresentam diarreia, febre e cólicas abdominais. Os sintomas se iniciam de 12 a 72 horas após a ingestão do alimento contaminado, durando de quatro a sete dias. A maioria das pessoas se recupera sem tratamento específico, mais existem casos em que, devido à severidade da diarreia, o paciente necessita de internamento e cuidados especiais, caso contrário, a bactéria poderá se espalhar na corrente sanguínea, causando septicemia ou até mesmo a morte. Crianças, idosos ou indivíduos com o sistema imunológico comprometidos são os mais vulneráveis a ter problemas graves (CDC, 2009).

De acordo com Baudart *et al.* (2000) a contaminação do ambiente marinho por *Salmonella* se dá através de excretas de humanos e animais portadores da bactéria, chuvas que promovem a lixiviação de solo e rochas, o vento e a mudança da maré. Se presente no ambiente esta bactéria acaba se concentrado nos organismos ali presentes.

Devido ao seu hábito alimentar, os moluscos bivalves tornam-se um bom receptáculo para a concentração dessa bactéria, constituindo-se assim um risco para quem consumir o alimento *in natura* (LOPES *et al.*, 1979 apud NUNES, 2007).

Segundo Kramer *et al.* (1996) apesar da presença de *Salmonella* em ambientes aquáticos constituírem um problema de saúde pública, apenas sorovares patogênicos estão relacionados com um grande número de surtos oriundos de água e alimentos contaminados.

No Brasil, são vários os relatos de surtos alimentares por salmonelas, entre eles o ocorrido em Araraquara-SP, por *Salmonella enterica* sorotipo Bredeney, afetando 561 funcionários de uma empresa, onde 42 foram hospitalizados (LANDGRAF *et al.*, 1985 apud GATTI JUNIOR, 2011). Em Pontalinda, Noroeste do Estado de São Paulo, um surto de salmonelose de origem alimentar em uma escola afetou 211 pessoas sendo na sua maioria, crianças de 6-10 anos (KAKU *et al.*, 1995).

O sorotipo predominante causador de infecções alimentares tem mudado nas últimas décadas de *S. Agona*, *S. Hadar* e *S. Typhimurium* para *S. Enteritidis*, sendo esta última a causa predominante de salmonelose em diversos países (SILVA e DUARTE, 2002).

O consumo de moluscos bivalves provenientes de áreas de cultivo deve ser avaliado com relação aos riscos na veiculação de doenças por micro-organismos patogênicos, o que tem representado um risco à saúde pública (JOSÉ, 1999). Levando-se em consideração esta observação, se faz necessário o monitoramento das áreas de cultivo desses organismos.

As ostras devem ser submetidas a um processo de depuração simples e econômico, capaz de eliminar as bactérias do grupo dos coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. dentre outros (NGOWRATTHANAPANTHIKOO, 1996).

Na depuração, os moluscos bivalves são mantidos por aproximadamente 6 horas (tempo mínimo), em tanques com água devidamente tratada por filtração e esterilização. A filtração é feita a partir de equipamentos, consistindo em um filtro tipo piscina e dois microfiltros de cartucho, que retém da água partículas. A esterilização é feita por meio de sistema ultravioleta. Neste processo, as ostras eliminam as substâncias retidas em seus tecidos, eliminando a maior parte dos organismos patogênicos, tornando-as próprias para o consumo do ponto de vista microbiológico (MACHADO *et al.*, 2002).

Lee e Younger (2003) ao analisarem 3.200 amostras de ostras no litoral do Reino Unido, observaram que a presença de *Salmonella* é influenciada pelo local de

coleta. A influência variou de acordo com a descarga de esgotos e o tipo de agricultura executada na região.

3.7. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* pertence à família Enterobacteriaceae, é caracterizada por possuir a enzima β -galactosidase e β -glucuronidase e crescer a temperatura de 44-45°C, embora algumas cepas possam crescer a 37°C. Fermentam a lactose e manitol com a produção de gás e ácido, produzindo indol na presença de triptona (WORD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 1999).

O habitat natural da *E. coli* é o intestino do homem e animais de sangue quente, sendo eliminada em grande quantidade nas fezes. Normalmente não é uma bactéria patogênica, no entanto, podem ocorrer casos de infecções do trato urinário e também causar a diarreia do viajante devido à enterotoxinas liberadas por certas linhagens da espécie (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Escherichia coli é considerada a bactéria indicadora mais específica de uma contaminação fecal recente, podendo indicar ainda a presença de micro-organismos patogênicos entéricos no ambiente (BRASIL, 2001). Ela está presente em 95% dos coliformes existentes nas fezes humanas e de outros animais. Sua introdução no ambiente pode se dar a partir de fontes fecais e não fecais. Isso a caracteriza como melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o presente momento (SILVA *et al.*, 2010).

Esta espécie possui linhagens com três antígenos, são eles o somático (O), antígenos de invólucro (K) e os flagelares (H), os quais são responsáveis por diversas doenças e infecções intestinais e do trato urinário, sendo responsáveis também por infecções de meningite em recém-nascidos (MAHON e MANUSELIS Jr, 1995)

O elevado número de *E. coli* em moluscos bivalves pode causar, pelo menos, seis tipos de infecções intestinais. A *E. coli* enteropatogênica (EPEC), tem sido responsável por 30% dos casos de diarreia aguda em indivíduos com idade inferior a seis meses de idade. Os sintomas estão associados à diarreia intensa, acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre, podendo durar de seis horas até três dias. A infecção por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), a chamada diarreia do

viajante, acomete adultos que visitam áreas onde a infecção é endêmica. A infecção é contraída por alimentos e águas contaminadas, e os sintomas são diarreia aquosa, febre baixa, dores abdominais e náuseas e quando intensa, pode causar diarreia severa semelhante à da cólera. A dose infectante de ETEC para adultos foi estimada em pelo menos 10^8 células, mas os jovens, os idosos e os doentes podem estar sujeitos a níveis inferiores. A *E. coli* enteroinvasora (EIEC) causa infecções em jovens e adultos, a transmissão se dá por água e/ou alimentos contaminados e pelo contato interpessoal. Os sintomas são diarreia profunda, cólicas abdominais, febre, dor de cabeça e dores musculares. Através de estudos, a dose infecciosa de EPEC em adultos saudáveis foi estimada em 10^6 células. Já a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) é caracterizada por dores abdominais severas, diarreia aguda com grande quantidade de sangue nas fezes e ausência de febre. A dose infecciosa para O157:H7 é estimada entre 10 a 100 células. A *E. coli* enteroagregativa (EAEC) está associada à diarreia infantil persistente, que pode durar mais de 14 dias e, finalmente, a *E. coli* difusamente aderente (DAEC) causa diarreia aquosa sem ocorrência de sangue na maioria dos pacientes infectados (VIEIRA, 2004).

A *Escherichia coli* é uma bactéria que não faz parte da microbiota natural do pescado marinho, por isso a sua presença no alimento está associada à contaminação fecal da água no local de captura ou cultivo (BARROSO *et al.*, 2006). Por serem capazes de sobreviver em ambientes estuarinos, esta bactéria acaba levando o risco de contaminação aos moluscos ali cultivados (RHODES e KATOR, 1988 apud FARIAS, 2008).

Pommeypuy *et al.* (1996) relataram que as bactérias relacionadas a surtos de DTA's, como a *Escherichia coli*, podem manter-se cultiváveis após a ingestão pelas ostras, o que explica altas contagens bacterianas em moluscos mesmo quando as contagens na água não indicam restrições para coleta e consumo dos organismos.

3.8. Controle sanitário da produção de moluscos bivalves

No Brasil, na atual legislação, a resolução nº 12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, não está incluso a avaliação de coliformes termotolerantes para moluscos *in natura*, exigindo somente a análise de *Salmonella*

spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva para moluscos bivalves não consumidos crus (BRASIL, 2001).

A comercialização de moluscos bivalves para fora das fronteiras estaduais necessita de um certificado de inspeção sanitária do Serviço de Inspeção Federal (SIF), cujo órgão emissor é o Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. A falta do selo de garantia e o conhecimento da origem do produto têm dificultado o comércio dos moluscos. Para conseguir o selo de qualidade dos moluscos o produtor precisa seguir uma série de determinações do Ministério da Agricultura, que vão desde a construção das instalações, uniforme utilizado pelos funcionários e a certificação da qualidade microbiológica dos moluscos (RIGOTTO, 2003).

Através do decreto nº 5.564, de 19 de outubro de 2005 (BRASIL, 2005), foi instituído o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves, formado pelos órgãos do Ministério de Aquicultura e Pesca, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Agência Nacional. Este comitê foi criado com a finalidade de estabelecer e avaliar os critérios para garantir a qualidade higiênico-sanitária dos moluscos bivalves.

Nos Estados Unidos o programa de controle sanitário da produção de moluscos bivalves o National Shellfish Sanitation Program, tem por objetivo promover e valorizar a produção de moluscos no país. Este programa apresenta medidas regulamentadas a partir de acordos comerciais interestaduais, aceitos pela Food and Drug Administration (FDA) (NATIONAL SHELLFISH SANITATION PROGRAM - NSSP, 2003).

Já a Diretriz Européia 91/492/EEC de 15 de Julho de 1991 (EUROPEAN COMMUNITIES, 1991), estabelece normas sanitárias que regem a produção e a colocação de moluscos bivalves vivos no mercado europeu. As áreas delimitadas para o cultivo são consideradas de acordo com a qualidade microbiológica da carne dos moluscos produzidos no país. As áreas são classificadas em classes, sendo a classe A a que apresenta 90% das amostras com uma concentração de coliformes termotolerantes (CT) menor que 300 NMP/100g (número mais provável/ 100 g de carne) e uma concentração de *E. coli* menor que 230 NMP/100g. Neste caso, os moluscos podem ser introduzidos diretamente no mercado para o consumo humano. São classificadas como classe B áreas nas quais os moluscos cultivados não excedem 6.000 NMP de CT por 100g e 4.600 NMP de *E. coli* por 100g. Já se os

moluscos apresentarem um número entre 6.000 NMP a 60.000 NMP de CT por 100g de carne, as áreas são classificadas como classe C. Após determinada a classe a qual o molusco pertence, avalia-se o tipo de tratamento que deverá ser aplicado ao produto para que a produção seja comercializada. Os moluscos provenientes da classe B só poderão ser colocados à venda após um tratamento de depuração ou após transposição para áreas classificadas como A por tempo determinado descrito pela diretriz. A produção de bivalves em áreas da classe C, obrigatoriamente, deve passar por um período mínimo de dois meses de transposição, juntamente com um tratamento de depuração.

Segundo Corrêa (2006) métodos de processamento têm sido de grande importância na redução das doenças relacionadas ao consumo de moluscos bivalves. As técnicas mais utilizadas são o cozimento, a depuração e o uso de alta pressão hidrostática. O cozimento, a pasteurização e o envasamento, fazem com que ocorra o aumento da durabilidade do produto, sabendo-se que a utilização de altas temperaturas é eficiente na inativação de bactérias e vírus.

Para Rodrick e Schneider (2003), o processo de depuração é praticado há vários anos e teve início no Reino Unido, devido a casos de surtos de febre tifóide associados ao consumo de moluscos crus.

A finalidade da depuração é a eliminação de patógenos presentes nos tecidos dos moluscos, através das fezes e pseudofezes. Esse processo é realizado a partir do processo de filtração exercido pelos moluscos bivalves (RICHARDS, 1988).

Pesquisas realizadas mostram que em relação ao tempo do processo de depuração, ocorre a diferenciação na eliminação das bactérias presentes no alimento, a *Escherichia coli* é a primeira a ser eliminada quando comparada a patógenos como *Vibrios* spp. e *Salmonella* spp. (MARINO, LOMBARDO e FIORENTINO, 2005).

Em virtude disso, algumas organizações internacionais vêm procurando criar princípios e normas, com o objetivo de estabelecer controle das condições sanitárias para a água de cultivo, para que se obtenha um alimento de boa qualidade.

As atividades de maricultura devem ser constantemente monitoradas a fim de detectar e minimizar possíveis contaminações por agentes causadores de doenças, como bactérias e vírus. O desenvolvimento de programas de monitoramento da qualidade sanitária em áreas de cultivo é uma forma de minimizar ou evitar que o

ambiente se transforme numa fonte de micro-organismos patogênicos ao homem (BARARDI, SANTOS e SIMÕES, 2001).

Visando a melhoria da qualidade dos produtos cultivados, Ceccarelli (2001) recomenda a depuração de moluscos bivalves, antes do consumo. O mesmo autor recomenda ainda que o consumo de moluscos sem cozimento prévio seja evitado ou prevenido.

4. MATERIAL E METODOS

4.1. Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Valença-Bahia ($13^{\circ}22'13''$ S e $39^{\circ}04'23''$ W) ao longo do rio Graciosa que apresenta em seu entorno áreas de manguezais que abrigam recursos pesqueiros importantes para a sustentação socioeconômica das comunidades ribeirinhas e com baixo índice de desenvolvimento social da região.

As amostras de água foram coletadas em três unidades amostrais distribuídas na região do estuário. O Ponto P1 encontra-se localizado a montante da área de cultivo das ostras, o Ponto P2 no interior da área de cultivo e o Ponto P3 a jusante do cultivo. As amostras de ostras foram coletadas no cultivo localizado no município de Taperoá – BA (Figura 1).

O estudo foi realizado mensalmente, durante o período de dezembro de 2010 a novembro de 2011, totalizando 33 amostras de água e 12 amostragens de ostras.

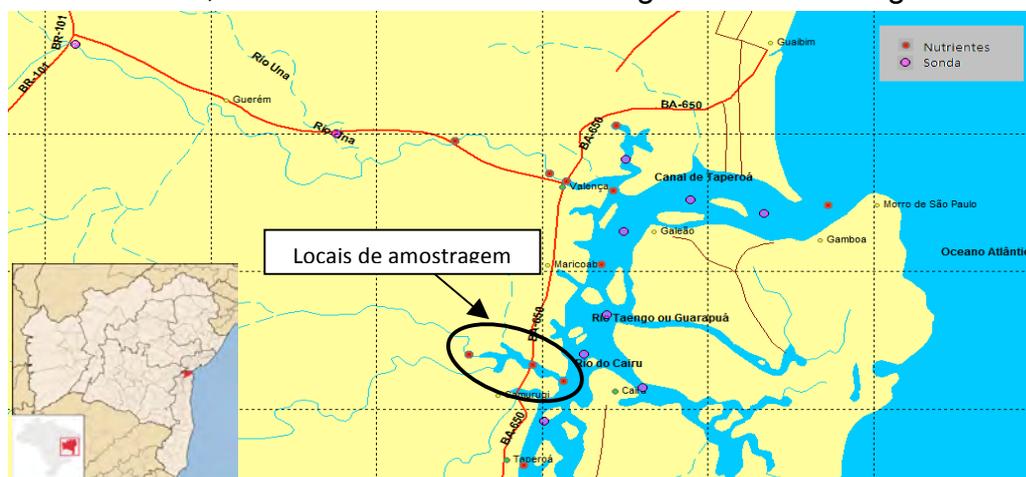


Fig. 1 – Mapa com a localização da área de estudo em Valença, Bahia.

4.2. Coleta da água e de ostras

Para a coleta da água foram utilizadas garrafas de vidro âmbar com capacidade de 1000 mL, as quais foram previamente autoclavadas a 121°C/15 minutos.

A coleta da amostra foi feita manualmente. A garrafa foi mergulhada a aproximadamente 15 cm abaixo da superfície, em sentido contrário à corrente de água, com o intuito de permitir a saída de ar e o enchimento da mesma, fazendo com que o enchimento não fosse completo, permitindo a homogeneização da amostra no momento da análise. Após a coleta da água, as garrafas foram identificadas e estocadas em caixas térmicas contendo gelo e transportadas até o laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental (Figura 2).



Fig. 2 – Transporte das amostras de água.

Coletaram-se uma dúzia de ostras no sistema de cultivo do município de Taperoá – Valença, e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental, onde foram submetidas à análise de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp.

No laboratório, as ostras foram lavadas assepticamente em água corrente para a retirada do material incrustante que se encontrava nas conchas, e após a limpeza, as mesmas foram abertas de forma asséptica (Figura 3).



Fig. 3 – Lavagem das ostras.

4.3. Análises Microbiológicas

4.3.1. Contagem de coliformes termotolerantes

- Diluição da amostra

As amostras de água, ao chegar ao laboratório, foram homogeneizadas, medidos 25 mL e colocadas em 225 mL de solução salina a 0,85%, sendo esta à diluição 10^{-1} . As demais diluições (10^{-2} a 10^{-4}) foram realizadas a partir da diluição 10^{-1} . Onde transferiu-se 1mL para tubos contendo 9 mL de solução salina a 0,85% sendo está a diluição 10^{-2} e assim sucessivamente.

Para as amostras de ostras pesou-se assepticamente 50 g do *pool* e homogeneizou-se (liquidificador sanitizado) em 450 mL de solução salina a 0,85%, correspondendo à diluição 10^{-1} . As demais diluições (10^{-2} a 10^{-4}) foram realizadas a partir da diluição 10^{-1} . Onde transferiu-se 1mL para tubos contendo 9 mL de solução salina a 0,85% sendo está a diluição 10^{-2} e assim sucessivamente.

- Número Mais Provável (NMP) para coliformes termotolerantes

O NMP foi determinado através da técnica dos tubos múltiplos com uma sequência de cinco tubos, segundo a metodologia proposta por Silva *et al.* (2010). A análise foi realizada nas amostras de água e ostra. O teste é realizado em três etapas distintas: prova presuntiva, confirmatória e bioquímica (Figura 4).

Teste Presuntivo

Para o teste presuntivo, inoculou-se 1 mL de cada diluição em Caldo Lauryl Sulfato contendo tubos de Durham invertidos. Os tubos foram incubados a 37°C/48 horas, após o período de incubação observou-se a produção de gás e turvação do meio (fermentação da lactose), caracterizando reação positiva.

Teste Confirmatório

Os tubos que apresentaram reação positiva no teste presuntivo foram inoculados em Caldo E.C. contendo tubos de Durham invertidos e incubados em banho-maria a 44,5°C/24 horas. A prova foi considerada positiva quando os tubos apresentaram turvação do meio e produção de gás. A partir da combinação de tubos positivos foi consultada a tabela de Hoskins, para o cálculo do Número Mais Provável (NMP) por 100 mL e 100 gramas da amostra (SILVA *et al.*, 2010).

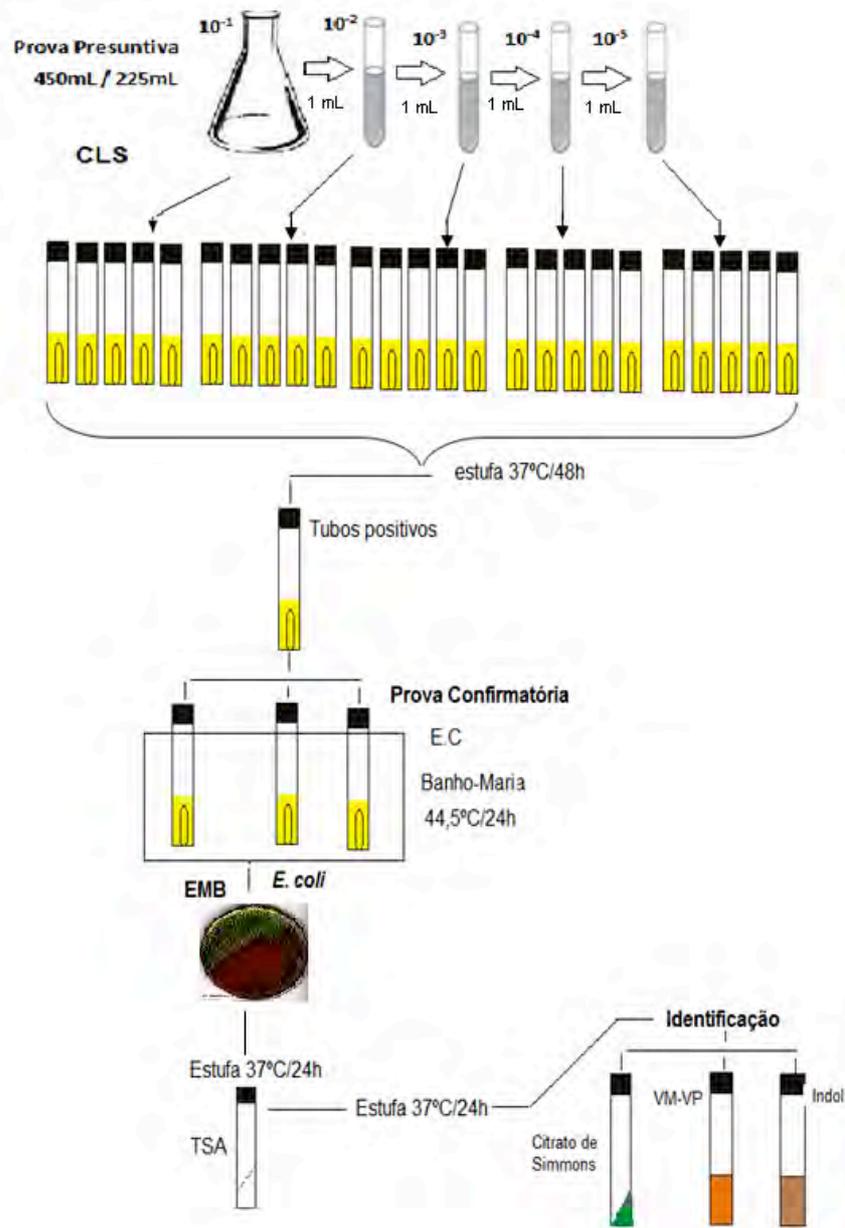


Fig. 4 – Esquema para a quantificação e identificação de coliformes termotolerantes isolados em amostras de água e ostra de cultivo.

Prova Bioquímica

De cada tubo de Caldo E.C positivo, foi retirada uma alçada e estriada em placas contendo o meio Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), e em seguida as placas foram incubadas em estufas a 37°C/24 horas. Após o período de incubação foi observado o crescimento de colônias típicas de *Escherichia coli* (colônias negras com ou sem brilho metálico). Em seguida foram selecionadas três colônias que possuíam características da bactéria e transferidas para Tryptic Soy Agar inclinado (TSA) e incubadas a 37°C/24 horas. Para a identificação bioquímica de *E. coli* foi realizado o teste do IMViC, que são os testes de Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato de Simmons.

✓ **Produção de Indol**

Com uma agulha flambada foi transferida uma alíquota do crescimento de 24 horas da cepa em TSA, para o meio Ágar SIM (meio semi sólido), que foi mantido em estufa a 37°C/24 horas. Após o tempo de incubação observou-se o crescimento da bactéria ao longo do inóculo. Em seguida, foi adicionado de duas a quatro gotas do Reativo de Kovac's e observado a formação de um anel vermelho no meio, indicando teste positivo. A *E. coli* ao utilizar o triptofano produz indol que reage com o Reagente de Kovac's.

✓ **Teste Vermelho de Metila (VM)**

A partir do crescimento de 24 horas em agar TSA, foi inoculada uma alçada em Caldo VM-VP e incubado a 37°C/96 horas, e após o período de incubação foram adicionado duas gotas do reagente vermelho de metila. O aparecimento de um anel vermelho no meio indica a positividade do teste. A *E. coli* é positiva para este teste (Figura 5).

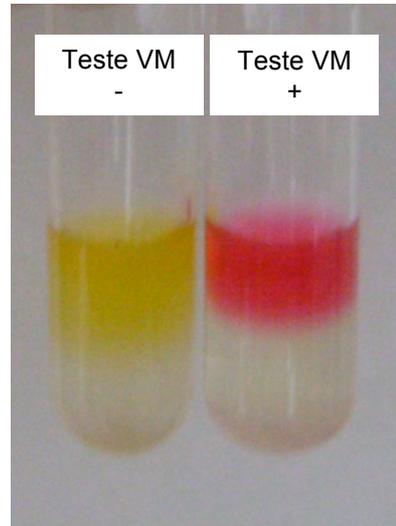


Fig. 5 – Teste Vermelho de Metila

✓ **Teste de Voges-Proskauer (VP)**

A partir do crescimento de 24 horas em agar TSA, foi inoculada uma alçada no Caldo VM-VP e incubado a 37°C/48 horas. Após o período de incubação foi adicionado para cada mL do caldo, 0,6 mL de alfa-naftol e 0,2 mL de NaOH. A positividade do teste é indicada pelo desenvolvimento de uma cor vermelha ou rósea no meio de cultura. A *E. coli* é negativa para este teste (Figura 6).

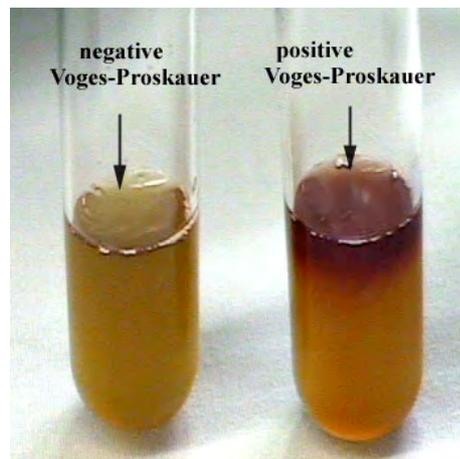


Fig. 6 – Teste Voges-Proskauer

✓ Teste do Citrato de Simmons

A partir do crescimento de 24 horas em agar TSA, foi inoculada uma alçada no meio Agar Citrato de Simmons inclinado e incubado a 37°C/96 horas e, após o período de incubação, foi observada a mudança na coloração do meio. A viragem alcalina, alterando a cor do meio de verde para azul é indicativo de teste positivo. A *E. coli* é negativa para este teste (Figura 7).

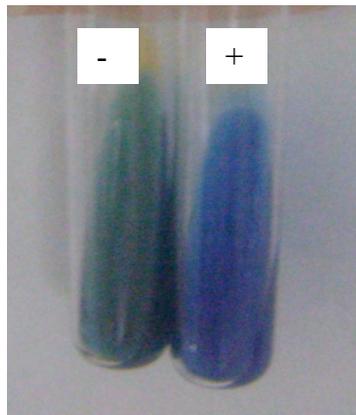


Fig. 7 – Teste do Citrato de Simmons

Algumas bactérias utilizam o citrato como única fonte de carbono, provocando a elevação do pH do meio, ocasionado pela metabolização do citrato e modificando a cor do meio de verde para o azul (RODRIGUES, LÁZARO e REIS, 2006).

4.3.2. Pesquisa de *Salmonella* sp.

Pré-enriquecimento

As amostras de água foram homogeneizadas, filtradas em gases e incubadas em Água Peptonada Tamponada (BPW) a 37°C/ 24 horas.

Para as análises de ostras, pesou-se 25 g da amostra e adicionou-se em Água Peptonada Tamponada (BPW) com incubação a 37°C/ 24 horas.

Enriquecimento seletivo

Após o período de incubação foram transferidos 1,0 mL do Caldo de Enriquecimento (BPW) para o Caldo Tetracionato (TT) e 0,1 mL para o Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e incubados a 37°C/24 horas em estufa bacteriológica e 42,5°C/24 horas em banho-maria, respectivamente.

Meios Seletivos

Após o período de incubação, com o auxílio de uma alça de níquel cromo foram estriados inóculos dos Caldos de enriquecimento nos meios seletivos, Agar Lisina Desoxicolato Xilose (XLD) e Agar Bismuto Sulfito (BS) e incubados a 37°C/24 horas, com o intuito de se obter colônias típicas de *Salmonella*. Após o período de incubação foi observado o crescimento de colônias características da bactéria no meio Agar XLD (colônias cor de rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada transparente ao redor) e no meio Agar BS (colônias castanhas, cinzas ou pretas, com ou sem brilho metálico). Em seguida, foram selecionadas três colônias e transferidas para Tryptic Soy Agar inclinado (TSA) e incubadas a 37°C/24 horas (Figura 8).

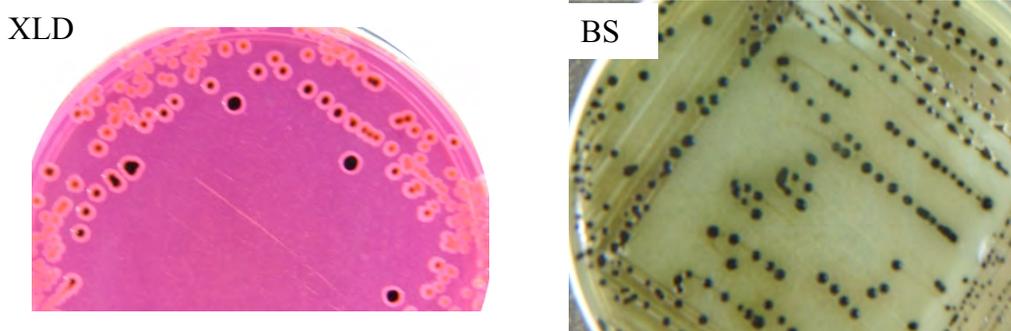


Fig. 8 – Crescimento típico de *Salmonella* nos meios seletivos XLD e BS. (Fonte: RODRIGUES, LÁZARO e REIS, 2006).

Provas Bioquímicas

A partir do crescimento de 24 horas em agar TSA, as cepas foram submetidas aos testes de triagem:

Agar Tríplice Ferro (TSI)

Com auxílio de uma agulha, transferiu-se o inóculo do crescimento em agar TSA, para o tubo contendo o meio de cultura, inoculado com uma picada no fundo e estrias na rampa, em seguida incubado a 37°C/ 24 horas.

Este meio é utilizado com base na fermentação de três carboidratos (0,1% glicose – 1% lactose – 1% sacarose), produção de sulfeto de hidrogênio e gás. Propicia a verificação da fermentação da glicose pela bactéria, conferindo coloração amarela na base, gás na profundidade e superfície alcalina (vermelha). Caso haja fermentação da lactose e/ou sacarose a colocação da parte superior do tubo será o amarela. A produção de H₂S é indicada pela cor negra na base do tubo e a produção de gás, indicada pela formação de bolhas ou rachaduras no meio. As cepas de *Salmonella* apresentam as seguintes características no meio: Rampa Alcalina e base ácida com ou sem produção de H₂S (RODRIGUES, LÁZARO e REIS, 2006). (Figura 9).

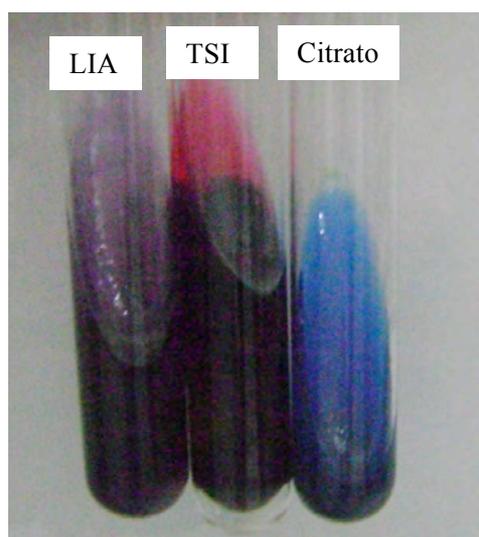


Fig. 9 – Reação positiva para *Salmonella* sp. nos meios da triagem

Ágar Lisina Ferro (LIA)

Com auxílio de uma agulha, transferiu o inóculo do crescimento em agar TSA, para o tubo contendo o meio de cultura, inoculado com duas picadas no fundo e estrias na rampa, em seguida incubou-se a 37°C/ 24 horas.

É um meio para identificação presuntiva de enterobactérias. A descarboxilação da lisina é evidenciada pela coloração púrpura (alcalina) na base que neutraliza o ácido (amarelo) formado pela fermentação da glicose. A desaminação da lisina é vista no ápice (vermelho) e a produção de H₂S (negro) na base do tubo. As cepas de *Salmonella* mantêm o meio com base e rampa violeta (RODRIGUES, LÁZARO e REIS, 2006).

Agar Citrato de Simmons

Com auxílio de uma agulha, transferiu o inóculo do crescimento em agar TSA, para o tubo contendo o meio de cultura, picando o fundo e estriando a rampa e, em seguida, incubou-se a 37°C/ 96 horas.

A partir deste teste é possível determinar se a bactéria é capaz de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono para o seu metabolismo e crescimento. O meio contém o indicador azul de bromotimol e na presença de reação positiva ocorre a viragem de pH acima de 7,6, sendo evidenciado pela mudança na cor do meio. As cepas de *Salmonella* são citrato positivo (RODRIGUES, LÁZARO e REIS, 2006).

Caldo Uréia (UA)

Com auxílio de uma alça, transferiu-se o inóculo do crescimento em agar TSA, para tubo contendo Caldo Uréia e em seguida incubou-se a 37°C/ 24 horas.

Existem bactérias que possuem a enzima urease que degrada a uréia presente no meio, fazendo com que ocorra a liberação de amônia, CO₂ e H₂O. A partir da reação da amônia, ocorre a formação do carbonato de amônia, que

alcaliniza o meio. O indicador de pH vermelho de fenol, presente no meio, faz com que este apresente a coloração magenta. A coloração rosa no meio é suficiente para considerar o teste positivo. As cepas de *Salmonella* são uréia negativas (RODRIGUES, LÁZARO e REIS, 2006). (Figura 10).

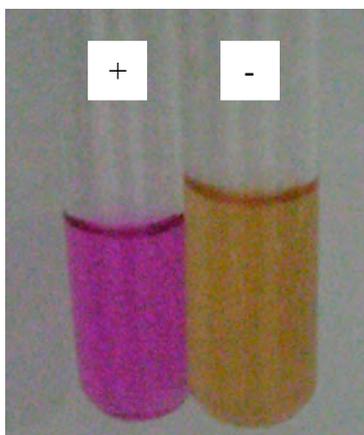


Fig. 10 – Teste de uréia

Teste de indol

Com auxílio de uma alça, transferiu-se o inóculo do crescimento em agar TSA, para tubo contendo Caldo Triptona 1% e em seguida incubou-se a 37°C/ 24 horas.

O indol é um dos produtos metabólicos de degradação do aminoácido triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de hidrolisar e desaminar o triptofano com produção de indol, ácido pirúvico e amônia. A prova está baseada na formação de um complexo de cor vermelha quando o indol reage com o grupo aldeído do p-dimetilaminobenzaldeído (reativos de Kovacs). As cepas de *Salmonella* são indol negativas (RODRIGUES, LÁZARO e REIS, 2006). (Figura 11).

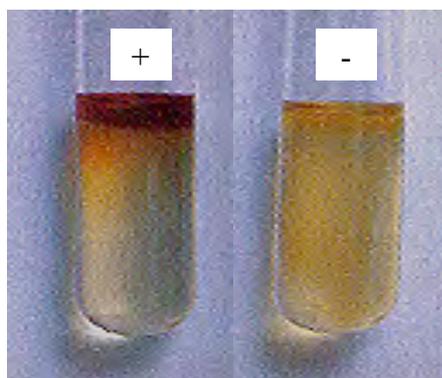


Fig. 11 – Teste do indol (Fonte: RODRIGUES, LÁZARO e REIS, 2006)

Caldo Malonato

A partir da cultura de Caldo Triptona 1%, inoculou-se três alçadas em tubo contendo Caldo Malonato e, em seguida, incubou-se a 37°C/ 48 horas.

Este teste determina a capacidade do micro-organismo de utilizar o malonato com única fonte de carbono, alcalinizando o meio, usando o indicador azul de bromotimol. O malonato liga-se à desidrogenase succinica, impedindo sua ação catalítica sobre o ácido succínico, interrompendo o Ciclo de Krebs, tirando da bactéria sua principal fonte de energia e impedindo assim a formação de outros intermediários necessários ao metabolismo. As cepas de *Salmonella* são malonato negativas (Figura 12).

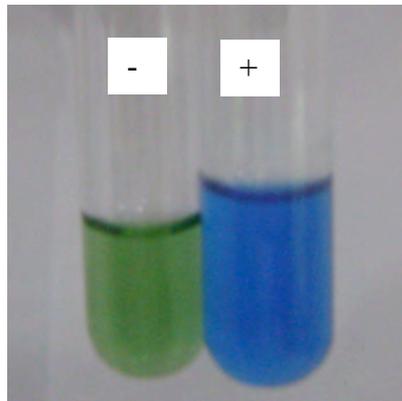


Fig 12 – Teste do malonato

Teste Sorológico

As cepas que apresentaram positividade nos testes de triagem, foram inoculadas em Agar Nutriente e incubadas a 37°C/18 horas.

A partir do crescimento em Agar Nutriente foi realizado à soroaglutinação rápida, utilizando os soros polivalente somático e polivalente flagelar.



Fig. 13 – Soroaglutinação (Fonte: RODRIGUES, LÁZARO e REIS, 2006)

4.4. Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o teste t, para comparação do grau de contaminação por coliformes termotolerantes no ponto P2 e nas amostras de ostras, tendo-se transformado os valores das variáveis NMP/100 mL (água) e NMP/100 g (ostra) por logaritimização, com objetivo de homogeneizar a variância entre as amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Número Mais Provável (NMP/100 mL) de coliformes termotolerantes nas amostras de água no Ponto P1 variou de $<1,8$ a $2,4 \times 10^4$ NMP/100 mL, no Ponto P2 de $< 1,8$ a $1,6 \times 10^5$ NMP/100 mL e no Ponto P3 de $<1,8$ a $5,4 \times 10^5$ NMP/100 mL (Tabela 1).

Tabela 1 - Número Mais Provável de coliformes termotolerantes em amostras de água coletadas no estuário do Rio Graciosa durante o período de dezembro de 2010 a novembro de 2011.

Meses	Pontos de coleta	Coliformes termotolerantes (NMP/100 mL)	<i>Salmonella</i> sp.
Dezembro/2010	P1	$3,9 \times 10^3$	Ausente
	P2	$1,7 \times 10^3$	
	P3	$1,3 \times 10^3$	
Janeiro/2011	P1	$4,5 \times 10^2$	Ausente
	P2	$4,0 \times 10^2$	
	P3	$<1,8$	
Fevereiro/2011	P1	$2,3 \times 10^3$	Presente
	P2	$4,5 \times 10^2$	
	P3	$2,3 \times 10^3$	
Março/2011	P1	$2,0 \times 10^2$	Ausente
	P2	$2,0 \times 10^2$	
	P3	$2,0 \times 10^2$	
Abril/2011	P1	$<1,8$	Ausente
	P2	$6,8 \times 10^2$	
	P3	$2,0 \times 10^2$	
Maio/2011	P1	$2,0 \times 10^2$	Ausente
	P2	$2,0 \times 10^2$	
	P3	SC	
Junho/2011	P1	$2,0 \times 10^2$	Ausente
	P2	$< 1,8$	
	P3	$< 1,8$	
	P1	$2,4 \times 10^4$	

Julho/2011	P2	$9,2 \times 10^4$	Ausente
	P3	$5,4 \times 10^5$	
Agosto/2011	P1	$2,4 \times 10^4$	Ausente
	P2	$2,4 \times 10^4$	
	P3	$2,4 \times 10^4$	
Outubro/2011	P1	$2,0 \times 10^2$	Ausente
	P2	<1,8	
	P3	<1,8	
Novembro/2011	P1	$2,0 \times 10^2$	Ausente
	P2	$1,6 \times 10^5$	
	P3	$1,6 \times 10^5$	

SC = não houve coleta

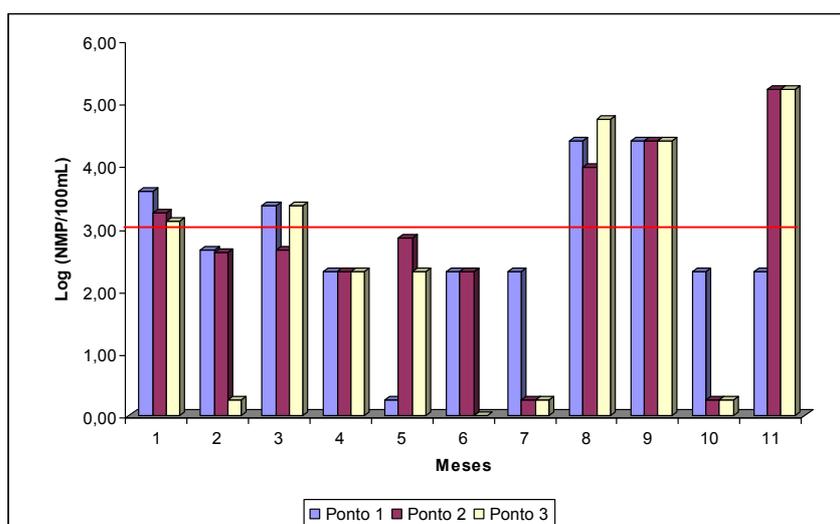
A Resolução do CONAMA nº 357 de 2005, estabelece para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana (Classe II, seção IV), uma média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mililitros, 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 (BRASIL, 2005).

De acordo com essa resolução toda a área amostrada é imprópria para o cultivo de moluscos bivalves, visto que a densidade geométrica de coliformes termotolerantes encontra-se bastante acima do estabelecido (88/100 mL, para águas salobras destinadas à proteção das comunidades aquáticas, à aquicultura e à atividade de pesca). No Ponto P1 a média geométrica encontrada foi de 548 CT/100 mL, no Ponto P2, 655 CT/100 mL e no Ponto P3, 413 CT/100 mL. Vale destacar que no Ponto P2, onde foi observada a maior média geométrica para os CT, existe um cultivo de ostras implantado pela comunidade local.

Resultados diferentes foram citados por Vieira *et al.* (2008), que relataram uma média geométrica de 27 CT/100 mL durante 15 coletas mensais no estuário do Rio Pacoti, em uma área de extração de moluscos bivalves.

Farias *et al.* (2010) estudando a água do estuário do rio Ceará em Fortaleza-CE, relataram valores de coliformes termotolerantes variando de $3,2 \times 10^2$ a $4,8 \times 10^3$ NMP/100 mL, mostrando uma contaminação menor do que a descrita neste trabalho.

Entretanto, quando utilizada para os demais usos (pesca amadora, recreação de contato secundário, navegação e harmonia paisagística) as águas do estuário do Rio Graciosa são satisfatórias visto que, segundo a Resolução CONAMA, a água não deverá exceder o limite de 1.000 coliformes termolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos seis amostras coletadas durante o período de um ano, com periodicidade bimestral. De acordo com a Figura 13 observa-se que esse limite foi excedido em apenas 36% nas amostras dos Pontos P1 e P2 e em 50% nas amostras do Ponto P3.



— Limite máx. de coliformes termotolerantes na água utilizada para demais usos.

Fig. 14 – Número Mais Provável (Log/100 mL) de coliformes termotolerantes nas amostras de água no estuário do Rio Graciosa, durante o período de dezembro de 2010 a novembro de 2011.

A colimetria das águas provenientes de áreas de cultivo de moluscos bivalves destinados ao consumo humano se constitui de um subsídio científico útil para as autoridades sanitárias envolvidas na fiscalização e no controle de qualidade desses alimentos, devido ao hábito de serem consumidos crus ou mal cozidos (WOOD, 1996).

Com relação às amostras de ostras, os valores encontrados para os coliformes termotolerantes foram $<1,8$ a $3,5 \times 10^4$ NMP/100 g (Tabela 2).

Tabela 2 – Número Mais Provável de coliformes termotolerantes, presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* nas amostras de ostras obtidas de cultivo durante o período de dezembro/2010 a novembro/ 2011.

Meses	Coliformes		
	termotolerantes (NMP/100g)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.
Dezembro/2010	2,2 x 10 ⁴	Ausente	Ausente
Janeiro/2011	1,7 x 10 ³	Presente	Ausente
Fevereiro/2011	6,8 x 10 ²	Presente	Ausente
Março/2011	4,9 x 10 ³	Presente	Ausente
Abril/2011	< 1,8	Ausente	Ausente
Maio/2011	1,4 x 10 ³	Ausente	Ausente
Junho/2011	1,1 x 10 ⁴	Ausente	Ausente
Julho/2011	3,5 x 10 ⁴	Presente	Presente
Agosto/2011	3,3 x 10 ⁴	Presente	Ausente
Setembro/2011	<1,8	Ausente	Presente
Outubro/2011	<1,8	Ausente	Presente
Novembro/2011	2,4 x 10 ⁴	Ausente	Ausente

No Brasil não há legislação que estabeleça limites para os coliformes termotolerantes em moluscos bivalves. Em virtude disso, buscou-se os parâmetros de qualidade usados pelo The European Union Shellfish Quality Assurance Programme – EUSQAP (RODGERS, 2001) para avaliar a qualidade das ostras. De acordo com esse programa as ostras são classificadas em três classes: classe A que compreende valores < 300 NMP de coliformes a 45°C em 100 g e ausência de *Salmonella* em 25g de carne, permitindo o consumo *in natura*; classe B com valores < 6.000 NMP de coliformes a 45°C em 100 g e ausência de *Salmonella* em 25 g de carne, permitindo a comercialização destes moluscos após depuração e/ou tratamento térmico até que alcance os padrões da categoria A e, classe C, com valores < 60.000 NMP de coliformes a 45°C em 100 g e ausência de *Salmonella* em 25 g de carne, exigindo que os moluscos sejam transferidos de ambiente, submetidos a um período de purificação intensiva (depuração) e/ou a tratamento térmico, podendo ainda não alcançar os padrões estabelecidos para consumo (A e B).

A classificação das ostras de acordo com esse programa é apresentada na Tabela 3. Observa-se que 75% das ostras foram enquadradas nas classes B e C, e por isso necessitariam de tratamento térmico e/ou depuração antes de encaminhadas para o consumo. Apenas 25% das ostras poderiam ser consumidas na forma *in natura*. Este fato é preocupante visto que esses organismos são muito apreciados na forma *in natura*, principalmente na região nordeste, além de ser oferecidas aos turistas que visitam a região.

Tabela 3 – Qualidade microbiológica das ostras no município de Taperoá, de acordo com The European Union Shellfish Quality Assurance Programme (EUSQAP).

Categorias	Ostras	
	NMP CT/ 100g ⁻¹	<i>Salmonella</i> sp.
A (<300)	3 (25%)	2 (16,7%)
B (< 6.000)	4 (33,4%)	Ausência
C (<60.000)	5 (41,6%)	1 (8,3%)
Imprópria (>60.000)	0	3 (25%)
Total	12 (100%)	12 (100%)

A elevada carga microbiana nas ostras demonstra, mais uma vez que a área onde esses indivíduos estão sendo cultivados não é própria para este fim, por sofrer com o deságüe constante de esgotos domésticos. Resultados semelhantes foram relatados por Santos (2003) ao analisar moluscos bivalves cultivados em área contaminadas e Sanchez *et al.* (1991) que, estudando ostras coletadas no litoral do estado de São Paulo, observaram níveis de CT variando de 7,0 a $3,0 \times 10^5$.

Vetuta *et al.* (2010) relataram, valores de CT em ostras *C. rhizophorae* variando de < 3,0 a 7,4/100 g enquanto Christo e Absher (2003) analisaram amostras de ostras (*C. rhizophorae*) no estuário do rio Cocó (CE) encontraram valores de CT de <1,8 a 920 NMP/g, níveis aceitáveis para a proteção da saúde da população e para o emprego de boas práticas na produção de alimentos. Estes resultados demonstram valores bem abaixo dos encontrados no presente estudo.

Quando verificado se houve significado estatístico entre a quantificação de coliformes termotolerantes nas amostras de água e ostras, verificou-se não haver

correlação ao nível de 5% (GL = 11 ($t = 0,7350$)). A quantificação de coliformes de origem fecal em moluscos bivalves apresenta uma maior representatividade do que a análise da água do cultivo, servindo para a elaboração de normativas para estas áreas (MACHADO *et al.*, 2001). Este fato ocorre, porque esses animais são filtradores e bioacumuladores de micro-organismos e sua microbiota está diretamente relacionada ao ambiente do qual eles se originam (VIEIRA *et al.*, 2008).

Apesar do elevado número de CT nas amostras de ostras, *Escherichia coli* (testemunha segura de contaminação fecal) só foi isolada em 13 amostras (62%). Resultados semelhantes foram relatados por Fontes *et al.* (2007) ao analisar *E. coli* em pescado cru.

A presença de *Salmonella* sp. tanto nas amostras de água como nas amostras de ostras é apresentada nas Figuras 15 e 16.

A presença de *Salmonella* neste estudo foi isolada em 03 (25%) das 12 amostras de ostras analisadas. Nunes (2007) também relatou a presença de *Salmonella* em 04 (19%) de 21 amostras de moluscos bivalves analisados, corroborando com o presente trabalho.



Fig. 15 – Percentual de cepas de *Salmonella* sp. presente nas amostras nas amostras de água no estuário do Rio Graciosa, durante o período de dezembro de 2010 a novembro de 2011.

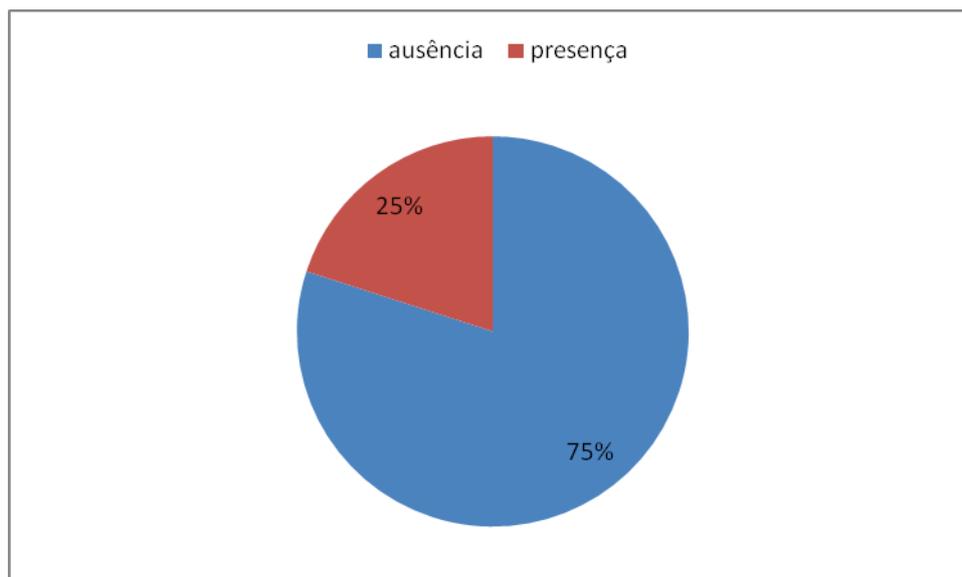


Fig. 16 – Percentual de cepas de *Salmonella* sp. presentes nas amostras de ostra de cultivo, no estuário do Rio Graciosa, durante o período de dezembro de 2010 a novembro de 2011.

Galvão (2004) estudando a água de cultivo em Ubatuba-SP não detectaram a presença de *Salmonella*, diferentemente do presente trabalho. A presença de *Salmonella* no ambiente aquático requer atenção devido ao risco de transmissão e disseminação da salmonelose (SANCHEZ, 1988 apud NUNES, 2007). Para Huss, Reilly e Embarek (2000), a presença de *Salmonella* em águas poluídas está associada à falta de saneamento.

A presença de *Salmonella* nas amostras de ostras é preocupante visto que segundo a RDC N° 12 (BRASIL, 2001), não pode haver a presença dessa bactéria em 25 g do alimento. Rodrigues (1998) também relataram *Salmonella* em ostras obtidas nas regiões de Ubatuba, SP.

A prevalência de *Salmonella* na água e em frutos do mar é influenciada por fatores críticos, como as chuvas, as águas pluviais (AMAGLIANI, BRANDI e SCHIAVANO, 2011) e a redução da luz solar (SETTI *et al.*, 2009). Para Winfield e Groisman (2003) a *Salmonella* uma vez que atinge o solo e ambientes aquáticos, pode sobreviver durante longos períodos garantindo assim a sua passagem para novos hospedeiros.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram o grande problema da poluição ambiental em cidades litorâneas que não apresentam sistema de saneamento básico eficiente. Este fato além de comprometer a qualidade microbiológica da água, compromete também a inocuidade do pescado, principalmente quando se trata do cultivo de moluscos bivalves.

Assim, faz-se necessário o monitoramento contínuo nas áreas de cultivo, bem como a aplicação de tratamentos secundários nesses indivíduos a fim de garantir a inocuidade desse alimento.

7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RDC No 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rdc.htm>>.

AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; SCHIAVANO, G.F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. **Food Research International**. v. 45, p. 780-788. 2011.

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

BARNABÉ, G. **Bases biológicas y ecológicas de la Acuicultura**. Ed. Acribia, Zaragoza. p. 519, 1996.

BARROSO, G. F.; POERSCH, L. H. da S.; CAVALLI, R. O.; GALVEZ, A. O. Sistemas de cultivos aquícolas costeiros no Brasil: recursos, tecnologias e aspectos ambientais e sócio-econômicos. **Museu Nacional**, Ed. Instituto do Milênio, Rio de Janeiro, 2006.

BAUDART, J.; LEMARCHAND, K.; BRISADOIS, A.; LEBARON, P. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 4, p. 1544-1552, 2000.

BEAN, N. H.; GOULDING, J. S.; DANIELS, M. T.; ANGELO, F. J. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States 1988-1992. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 1265-1286, 1997.

BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.M.; SANTO, M.L.P.E. Processamento e Industrialização de Moluscos. In: FORCELINI et al. B. Inst. Pesca, São Paulo, 35(2): 275 - 283, 2009. SEMINÁRIO E WORKSHOP TECNOLOGIAS PARA APROVEITAMENTO INTEGRAL DO PESCADO. **Anais...** Campinas: ITAL. p.38-84, 2000.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. John G. Holt (org), 9th edition, p. 787, 1994.

BRANDINI, F.; SILVA, A. S.; PROENÇA, L. A. O. Oceanografia e Maricultura. In: VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq/MCT, p. 107-141, 2000.

BRASIL, 2001. Ministério da Saúde, Portaria n. 1469, de 29 de dezembro de 2001. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Distrito Federal: janeiro de 2001.

BRASIL, 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n° 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a qualidade dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>>

CARMO, G M I; OLIVEIRA, A A; DIMECH, C P; SANTOS, D A; ALMEIDA, M G; BERTO, L H; ALVES, R M S; CARMO, E H. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA): Vigilância epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 - 2004. Boletim Eletrônico Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), São Paulo, (disponível Internet): <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf>

CECCARELLI, P. S. Aqüicultura integrada: possíveis problemas de saúde devido ao uso de excretas na aqüicultura. **Revista Panorama da aqüicultura**. v. 11, n. 63, p. 38-40, jan./fev. 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases. 2009. **Salmonellosis**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/salmonellosis_gi.html>. Acesso em: 22 jan. 2012.

CERUTTI, R.L. **Contribuição ao conhecimento da poluição doméstica na Baía Norte, área da Grande Florianópolis, SC**. 1996. 129f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Filosofia e Ciências Humanas. p. 129, 1996.

CETESB. Amplia rigor para analisar praias. <http://www1.folha.uol.com.br> (31 dez. 2003).

CHALER, R.; CANTON, L.; VAQUERO, M.; GRIMALT, J.O. Identification and quantification of n-octyl esters of alkanolic and hexanedioic acids and phthalates as urban wastewater markers in biota and sediments from estuarine areas. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, p. 203–210, 2004.

CHRISTO, S. W.; ABSHER, T. M. Período reprodutivo de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Ostreidae) na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. In: XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia, **Livro de Resumos**. Rio de Janeiro : Gráfica da UERJ, v. único. 2003.

CORRÊA, A. A. **Estudo sobre a dinâmica de depuração de ostras de cultivo (*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**. Florianópolis. 2006. 113p. Dissertação (Mestrado em biotecnologia)- Universidade Federal de Santa Catarina.

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

EUROPEAN COMMUNITIES. Council Directive of 15 of July 1991 laying down the health conditions for the production and placing on the market of live bivalve mollusks (91/492/EEC). **Off. J. Eur. Communities**, v. L268, p. 1-14, 1991.

FARIAS, M.F.; ROCHA-BARREIRA, C.A.; CARVALHO, F.C.T.; SILVA, C.M.; REIS, E.M.F.; COSTA, R.A.; VIEIRA, R.H.S.F. Condições microbiológicas de *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) (Mollusca: Bivalvia: Solecurtidae) e da água no estuário do Rio Ceará, em Fortaleza – CE. **Boletim Estatístico da Pesca**, São Paulo. v. 36, n. 2, p. 135 – 142, 2010.

FARIAS, H. **Qualidade higiênico-sanitária na cadeia produtiva de ostras, *Crassostrea* sp., cultivadas na baía de Guaratuba, PR, Brasil**. 2008. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná.

FELDHUSEN, F. Review: The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1651-1660, 2000.

FONTES, M.C.; ESTEVES, A.; CALDEIRA, F.; SARAIVA, C.; VIEIRA-PINTO, M.; MARTINS, C. Estado de frescor e qualidade higiênica do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.59, n.5, p. 1308-1315, 2007.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAFT, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu. p. 182, 2006.

FREITAS, M. B.; BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.17, n.3, p.651-660, 2001.

GALVÃO, J.A. **Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP**. 2004. 128p. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

GATTI JUNIOR, P. **Qualidade Higiênica e Sanitária de Tilápias Provenientes de Cultivo, Comercializadas no Varejo**. 2011. 58p. Dissertação (mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp. São Paulo – Jaboticabal.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; OLIVEIRA, C. A. S. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, n. 53, p. 30-37, 1998.

GILLESPIE, I.A.; ADAK, G.K.; O'BRIEN, S.J.; BRETT, M.M.; BNOLTO, F.J. General outbreaks of infectious intestinal disease associated with fish and shellfish, England and Wales, 1992–1999. **Commun. Dis. Public Health**. v. 4, n. 2, p. 117–123. 2001.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*, (ninth ed.) Paris: WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, **Institut Pasteur**, 2007.

HERNÁNDEZ, O.D.; TROCCOLI, L.G; MILLIÁN, Y.J.Q. Crecimiento, engorde y sobrevivencia de la ostra de mangle *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1928 em la Islã de Cubagua, Venezuela. **Caribbean Journal of Science**, v. 34, n. 3-4, p.243-249, 1998.

HUSS, H. H. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. Roma: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. p. 176, 1997. (Documento Técnico sobre as Pescas, n. 334).

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

JOSÉ, V. F. Bivalves e a segurança do consumidor. In: JACOBI, Pedro Roberto (editor). **Ciência ambiental: os desafios da interdisciplinaridade**. São Paulo: Annablume, v. 1, p. 39-60, 1999.

KAKU, M.; PERESI, J.T.M.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; BATISTA, A.B.; CASTANHEIRA, I.A.Z.; GARCIA, G.M.P.; IRINO, K.; GELLI, D.S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Saúde Pública**. v. 29, p. 127-131, 1995.

KRAMER, M.H.; HERWALDT, B.L.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; JURANEK, D.D. Surveillance for waterborne-disease outbreak, United States, 1993-1994. **Jornal of the American Water Works Association**. v.88, p. 66-80, 1996.

LEE, J.R.; YOUNGER, A.D. Determination of the relationship between faecal indicator concentration and the presence of human pathogenic micro-organisms in shellfish. In. Molluscan Shellfish Safety (Villalba, A. Reguera, B., Lopez-Romalde, J. L.; Beiras, R. eds) p. 247-252. Xunta de Galicia and Intergovernmental **Oceanographic Commission** of UNESCO, Santiago de Compostela, 2003.

LEE, C.Y.; PANICKER G.; BEJ, A.K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLinkTM NH microwell plate sandwich hybridization. **Journal of Microbiological Methods**. v.53, p.199-209, 2003.

LI, X.; BOUDJELLAB, N.; ZHAO, X. Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 167-177, 2000.

LIEBANA, E. Molecular tools for epidemiological investigation of *S. enterica* subspecies *enterica* infections. **Research in Veterinary Science**, v. 72, p. 169-172, 2002.

LIRA, A. A.; BARROS, G.C.; LIMA, M.C.G.; MOTA, R.A. Aspectos sanitários do ambiente aquático onde são capturados moluscos bivalves para consumo no Grande Recife, PE. **Revista Higiene Alimentar**, v.11, n.77, p.53-57, 2000.

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

MACHADO, I. C.; GARCIA, T. R.; KOGA, S. M.; WOIECHOWSKY, E. Obtenção de parâmetros para a depuração da ostra de mangue *Crassostrea brasiliana* em Cananéia-SP. In: Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, n. 12, 2002, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2002.

MAHON, C.R.; MANUSELIS JUNIOR, G. Enterobacteriaceae. In: **Textbook of Diagnostic Microbiology**. Philadelphia: W.B Saunders Company. p. 447-487. Cap. 16, 1995.

MARINO, A., LOMBARDO, L., FIORENTINO, C. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-o1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 281-286, 2005.

MELANCON, M. J. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JÚNIOR, G. A.; CAIRNS JÚNIOR, J. (Eds). **Handbook of ecotoxicology**. c. 11, p. 220-240. New York: Lewis Publishers, p. 755, 1995.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasil. 2007. 101p. Disponível em <http://www.sepaq.pa.gov.br/files/u1/anuario_da_pesca_completo.pdf>

NATIONAL SHELLFISH SANITATION PROGRAM – NSSP. **Guide for the Control of Molluscan Shellfish**. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/> > 2003.

NGOWRATTHANAPANTHIKOO, C. **Depuration of some economic bivalves in Thailand**. Bangkok: Kasetsart University. 1996.

NIKAIDO, M.; OLIVEIRA, A. S.; TREVILATO, T. M. B.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Análise da qualidade da água do córrego Monte Alegre e afluentes, Ribeirão Preto, SP: enfoque para coliformes fecais e metais pesados. **O mundo da Saúde**. v.28, n.4, p.414-420, 2004.

NUNES, L.S. **Salmonella spp. Isoladas de água e moluscos bivalves de Região Portuárias Brasileiras – Suscetibilidade Antimicrobiana e Caracterização Molecular dos Sorogrupos (A – D1, B E C2 – C3)**. 2007. 101p. São Paulo. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo.

PARASHAR, U.D.; HUMMELMAN, E.G.; BRESEE, J.S.; MILLER, M.A.; LASS, R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 5, p. 565-72, 2003.

PELCZAR, M.J. Jr.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia, conceitos e aplicações**: Microbiologia das águas naturais, potáveis e dos esgotos. São Paulo: Makron. Cap.29, p.337-369, 1996.

PEREIRA, M.A.; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R.V. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**. v.37, p.159-163. 2006.

PEREIRA, C.S. **A Cultura de Mexilhões na Baía de Guanabara e suas Implicações para a Saúde Pública** – Contexto Político-Social e Microbiológico. Rio de Janeiro: ENSP - Curso de Doutorado em Saúde Pública - Escola Nacional de Saúde Pública- ENSP – Fiocruz, 2003.

PEREIRA, C.S.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. 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**. v. 40, n. 3, p.300-303, 2007.

POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; TEIXEIRA, A.L. **Introdução à biologia das ostras**. Florianópolis. p. 18, 2006.

PITT, R. E. Effects of urban runoff on aquatic biota. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JÚNIOR, G. A.; CAIRNS JÚNIOR, J. (Eds). **Handbook of ecotoxicology**. cap. 28, p. 609-630. Lewis Publishers, 1995.

POMMEPUY, M.; BUTIN, M.; DERRIEN, A.; GOURMELON, M.; COLWELL, R. R.; CORMIER, M. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n.12, p.4621-4626, 1996.

RIBEIRO, E. N. **Avaliação de indicadores microbianos de balneabilidade em ambientes costeiros de Vitória/ES**. 2002. 122p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

RICHARDS, G.P. Microbial Purification of Shellfish: a review of depurations and relaying. **Journal of Food Protection**, v. 51, p.218-251, 1988.

RIGOTTO, C. **Proposta da Utilização de Adenovírus como Indicadores de Contaminação Viral Humana em Ostras de Cultivo**. 2003. 117p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. 2 ed., Editora FURG, Rio Grande. 1994.

RODGERS, C. J. **The NSW Shellfish Quality Assurance Program: an operational review**. Sydney: Safe Food Production NSW. p. 146, 2001.

RODRIGUES, P.F. **Caracterização sanitária de áreas de criação de moluscos bivalvos do litoral Norte do Estado de São Paulo**. São Paulo, 1998. 66p. Dissertação (Mestrando) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo.

RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S.; REIS, E.M.F. **Manual de Procedimentos para Diagnóstico Laboratorial de *Salmonella***. p.50, 2006.

RODRICK, G.E., SCHNEIDER, K. R., Molluscan Shellfish Depuration. In: VILLABOA, A., REGUERA, B., ROMALDE, J., REIS, R. (ed). Proceedings of the 4. International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Santiago de Compostela, Spain, 2002, June 4-8, Consellería de Pesca y Asuntos Marítimos de Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2003.

SANCHEZ, P.S.; STOPPE, N.C.; ZANOLI, M.I.; MARTINEZ, S.C.G.L.; OSTINI, S.; SEGAMARCHI, A.L.; ALMEIDA, G.L. **Caracterização da qualidade microbiológica de águas marinhas e moluscos bivalves do litoral norte do estado de São Paulo**. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Goiânia. p.430-445, 1991.

SANTOS, C.A.M.L. **Doenças transmitidas por pescado no Brasil**. IN: 37º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, RJ, 26-30 de julho de 2010.

SANTOS, P. R. N. M. **Variação espaço-temporal do bacterioplâncton e espacial do bacteriobentos da Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil**. 2003. 87p. Dissertação (mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias.

SCHNURSTEIN, A. e BRAUNBECK, T. Tail moment versus tail length. Application of an *in vitro* version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v. 49, p. 187–196, 2001.

SETTI, I., RODRIGUEZ-CASTRO, A., PATA, M. P., CADARSO-SUAREZ, C., YACOUBI, B., BENSMAEL, L. Characteristics and dynamics of *Salmonella* contamination along the coast of Agadir, Morocco. **Applied and Environmental Microbiology**, 75, p. 7700–7709, 2009.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Rio de Janeiro: Varela, p. 624, 2010.

SINCERO, T.C.M. **Aplicação de técnicas moleculares no monitoramento do vírus da Hepatite A em tecido digestivo dissecado de ostras de cultivo**. 2005. 104p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

TINDALL, B.J.; GRIMONT, P.A.D.; GARRITY, G.M.; EUZEBY, J.P. **Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella**. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 55, p. 521-522, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed. p. 893, 2005.

TSUTIYA, M. T. **Abastecimento de água**. 3.ed. São Paulo: USP. Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica. p. 643, 2006.

VALENTIM, F. T. **Avaliação do crescimento da ostra *crassostrea gigas* em dois tipos de berçários, na praia da cerca**. 2005. 44p Monografia (Graduação em Oceanografia)- Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória.

VETUTA, R.F.; INTERAMINENSE, J.R.A.; BATISTA, J.E.C.; VAZ, R.V.; RALPH, M.T.; SILVA, A.F.B.; LIMA FILHO, J.V.M. **Análise higiênico-sanitária da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) do estuário do Rio Itapessoca (Barra de Catuama – Litoral Norte de Pernambuco)**. In: X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010 – UFRPE: Recife.

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

VIEIRA, R. H. S. F.; ATAYDE, M. A.; CARVALHO, E.M.R.; CARVALHO, F.C.T.; FONTELES FILHO, A.A. Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 45, n. 3, p. 180-189, 2008.

WARD, J. E.; Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing and fate. **Invertebrate Biology**, v.115, n.3, p. 218-231, 1996.

WHEATON, F. Review of the properties of Eastern oysters, *Crassostrea virginica*: Part I- Physical properties. **Aquacultural Engineering** , v. 37, p. 3–13, 2007.

WINFIELD, M.D.; GROISMAN, E.A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, 69, p. 3687–3694, 2003.

WOOD, P.C. **Manual de higiene de los mariscos**. Ed. Acribia. p. 83, 1996.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety issue associated with products from aquaculture**. Roma: FAO, 1999. (Report of a Joint FAO/NACA/FAO Study Group. WHO Technical Report Series, 883).