

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós Graduação em Ciência Animal

André Almeida Fernandes

**ESTUDO BACTERIOLÓGICO DA ÁGUA E DE PEIXES DA
LAGOA DA PAMPULHA**

Belo Horizonte
2011

André Almeida Fernandes

**ESTUDO BACTERIOLÓGICO DA ÁGUA E DE PEIXES DA
LAGOA DA PAMPULHA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte
2011

F363e Fernandes, André Almeida, 1968-
Estudo Bacteriológico da água e de peixes da Lagoa da Pampulha/ André Almeida Fernandes. – 2011.
49f: il.

Orientador: Romulo Cerqueira Leite
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Bibliografia: f. 41 - 49

1. Peixe - Teses - 2. Ciência Animal - Teses -3. Veterinária - Teses - 1. Leite, Romulo Cerqueira - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título

CDD – 639.3

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
COLEGIADO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 31270-901 - Belo Horizonte- MG
FONES (31)-3409 2056 - 3409 2057 FAX (31) 3409 2059

www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao
E-mail cap@vet.ufmg.br

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **ANDRÉ ALMEIDA FERNANDES**

Às ____ horas do dia 29 de abril de 2011, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, indicado pelo Colegiado dos Cursos em 31/03/2011 para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada.

ESTUDO BACTERIOLÓGICO DA ÁGUA E DE PEIXES DA LAGOA DA PAMPULHA, como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestrado em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina Veterinária Preventiva**.

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Rômulo Cerqueira Leite, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Dr. <u>LUIZ SIMÃO DO CARMO</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. <u>FRANCISCO CARLOS FARIA LOBATO</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. <u>LILIAN VIANA TEIXEIRA</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. <u>ROMULO CERQUEIRA LEITE</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado

Reprovado

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 08 volumes encadernados da versão final da dissertação, acatando, se houver as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 29 de ABRIL de 2011.

Assinatura dos membros da banca:

[Assinatura] _____ [Assinatura] _____
[Assinatura] _____
[Assinatura] _____

(Normas Regulamentares da defesa de dissertação no verso)

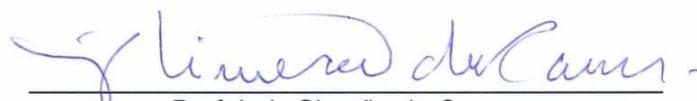
(Este documento não deverá conter rasuras)

(Este documento não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador)

Dissertação defendida e aprovada 29 de abril de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Rômulo Cerqueira Leite
Presidente



Prof. Luiz Simeão do Carmo



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato



Profª. Lilian Viana Teixeira

AGRADECIMENTOS

“Plunt, plact zoom não vá a lugar nenhum, tem que ser selado, registrado, carimbado, avaliado, rotulado se quiser voar... a taxa é alta...”
Raulzito and The Panters.

O Peixe Sabe tudo... e nada, tb.

“Bactérias em um meio é cultura”. Arnaldo Antunes

A minha Mãe Prof D. Alaé pelo exemplo de dedicação e entusiasmo a vida profissional, sem medir esforço nos desafios diários, As minhas grandes amigas e Filhas Queridas Jú & Fé² (Joana Luiza Cambraia Fernandes e Maria Fernanda Cambraia Fernandes... “Pai o q é tese, e já está acabando”), as quais participaram imensamente neste projeto científico Pampulha Lake de cunho técnico e social em benefício a fauna, flora e meio ambiente.

A todos meus irmãos que sempre me deram muito apoio em todas essas trajetórias da minha vida aos estudos e a formação científica, ao Lucão, Nem Auxiliadora, Socam M^a do Socorro, em especial a Imaculada Kulla (tá estudando?), M^a José Zeca e ao Jésus em me inscrever e motivar no concurso para o Centro Pedagógico, onde tudo começou no 1º Grau, no ano internacional da criança. Por todos os motivos da existência dessa Pesquisa, os quais me incentivaram constantemente, apesar de várias vezes “chatas”, mas com melhores intenções, até mesmo pra concretização deste projeto em minha vida, os quais dedicam há muitos anos, e gosto muito. Meu Pai Zué, que acreditou nos meus estudos. Meus cunhados Valdemar, e a Cristina *in memorian*, pela contribuição na minha formação.

Aos Profs da banca examinadora Luiz Simeão do Carmo, Francisco Lobato e Lilian Viana Teixeira, pela valiosa contribuição com esta dissertação.

A Bióloga Srt^a Lângia Colli Montresor, um super AGRADECIMENTO ESPECIAL pelo constante apoio em todas as etapas da realização desta pesquisa, com grande disposição e compromisso, e a sabedoria nos obstáculos científicos que juntos enfrentamos muitos deles, e tirando o proveito ao Máximo

pelos prazeres das pesquisas científicas e todas as interações que juntos tivemos, e confrontos, desde secretaria bilíngüe, perdigotos de coliformes e muita amizade.

Ao Sr Aldo e Halésia pelos bons conselhos, acolhedores e gde ajuda, meu agradecimento e reconhecimento pela força dada.

Tio Valtinho que me mostrou parte da fauna e flora com muito amor a natureza na minha infância, ensinou o respeito e harmonia com as pessoas. Meus primos Marcelinho e Jessé.

A nata do Centro Pedagógico, melhor colégio do mundo, Ao (abd)² = (Alejado, Bernardes, Dé e David) gdes amigos verdadeiros irmãos, Frankinho CP, e aos melhores professores do mundo Malú M^a Lúcia, Olga, João Bosco, Clara, Dulce, ao Jaburú e a Cecília *in memorian*. Ao Pico, alguns amigos são mais que irmão etc e tal, mas esse cara amigo de infância no CP e Coltec é demais, valeu muito por tudo, e outras cositas mas; HER (Henrique Estrada Rodrigues, "... a cabeça é o Universo", num é?; Dr^o Merrinha tamanha educação e polidez, pessoa rara e MT fina, gde amigo, adora escutar meu TGL bacteriológico noite adentro, Otávio nosso atleta de plantão sempre me incentivando, GilTil, cabeça quântica, polemico em todos assuntos para todas discussões científicas e intelectuais. Amigo Frank, por tanta reflexões e sempre me alertando que "No terreno da observação a sorte somente favorece as mentes preparadas" (Louis Pasteur). Aos Professores do Coltec que foram muito influentes na minha opção e escolha profissional a pesquisa, constantes curiosidades e reflexões, tentando explicar o PQ de quase tudo, Gui Mazoni, Terezinha TGL, Ricardo, Ataide, João Cupim, Ubaldo, Lúcia Pimentel, Carlos Edilson Sampaio Ca², Nério, Nanci, M^a Luiza.

Aos meus grandes amigos das Ciências Biopunkquantica Super Biologistas, Bicho - Pau Insecta: Ortoptera Fred, maior incentivador por tudo, muito obrigado mesmo. Metal Ronaldo grande incentivador aos conhecimentos, questionamentos, e sempre me empurrando pra frente, Domingos Tio Gordão, pessoa sabia e grande amigo conselheiro de pé sempre chão da realidade, dos sistemas vigentes errôneos. *Geraaaaldo Megacephala calouro* chefe dos trabalhos em grupo *biologicus*, Cadú organizador dando pancada (porrada) em

tudo pela ciências, esse cara, me ensinou o que é a modéstia do saber, Na² Henrique Belfor *Nassua nassua* exemplo na educação, paciência, fineza e sabedoria, Guzé¹³ quero bife, sempre muitoprestativo e grande incentivador das minhas idéias, Liderhips Flavinho calouro chefe executivo das grandes expedições biológicas acadêmicas Barnes & Poughs²..., Zaaaca Orion as reflexões ao Ambiente Inteiro e amor a natureza, Pelera Valeska, grande amiga afetuosa parceira de trabalhos com muitas discussões exaltantes e salutares. Lú Aramuni, sempre MT solícita e com bom humor num espírito positivo. Meu amigo Biólogo Quântico *Naturalista Viajante* Augusto Invertebration, Gde Prof^o Alexandre Sea Spider and IaraCia ,

Aos Prof Enemir Santos, Elizia, Maria Inês Nahas, Eugênio Batista Leite, Simone Leite, Técnicos Edson, Zé Luiz Paquito, Joãozinho do Ranário e Jadir, sempre me incentivaram.

Aos meus queridos estagiários que juntos sempre aprendemos, Dr^a Lidia, Renata H₂O Godinho, Mariana, Márcio Vetpuc Molusco, Suellen, AnGelo, Fred capim, Guilherme *doidera cabrito* gde polidez e paciência me ajudou muito na elaboração dos gráficos dos dados, com ótimas sugestões e paciência. Tico² Ratinho Hendrix Igor constantemente perguntando, já acabou???

Ao Dr Jon² Fabiano Comim, Farmacêutico Imunologista de plantão do Cafofo Black Gold, com todas as janelas Imunológicas há descobriremos as discussões amorosas das Mulheres Malditas que nos infernizaram intelectualmente, mas as amamos muitos e pra sempre.

Ao representante do Cafofo no RJ Tiago, amigo acolhedor de sempre, e mts conversas boas...

Amiga Fá² Rafaela Domingos e Lelé parceiras de muitos diálogos noturnos, e muitas gargalhadas.

Prof Teofânia do Lab. Malacologia do ICB, na logística do experimento.

Aos colegas do IG Cebo durante os movimentos de placas tectônicas do Geoteco, qto as sugestões do mapa da lagoa, Renato e Vivi, muito obrigado.

Attílio Lamendola, amigo e fotografo que sempre me apoiou e deu muita força a formação profissional.

A todos meus colegas do Serviço do DMVP desta Escola, Toninho,

Eduardo, Nádia, Ricardo, Doraci, Creuza, Renata, Gustavo, Natália, em especial ao Joãozinho, Cláudio Baiano, Graziella, D. Mirli, Nelson Éder, Júnia e o Alexis aos constantes incentivos, apoio e ajudas durante aos experimentos, sem medirem esforços.

A todos funcionários da biblioteca, em especial a Rosilene Almeida pela disposição e ajuda bibliográfica, e a Chefe Ana Lúcia.

Aos meus Professores da PG: Élvio, Nivaldo, José Osvaldo, Múcio, Pedro Light, Claret, em especial ao Francisco Lobato com intensa participação na etapa final, Ivan Sampaio nos competentes esclarecimentos bioestatísticos em me explicar qto a casuística de um experimento científico, e ótimo exemplo pedagógico, ao José Sérgio, pessoa conselheira, com postura e visão técnica científica em função do saber técnico correto, ao Pesquisador Max Augusto Jorge.

Ao pessoal do serviço de limpeza do DMVP, em especial as Sr^a Lúcia e Sr^a Luci, pela educação, boa vontade e paciência comigo.

Ao Colegiado de Pós Graduação nas pessoas do Prof Romário, e Secretárias Nilda, Débora e Luzete.

Prof Ângela Quintão e Luciene C. Lima na ajuda durante a elaboração deste projeto.

A Prof Cris Muratori, que desde graduação me falava da relevância da bacteriologia nos Peixes.

Profs Cláudio Donnici e José Bento do Dep. Química.

Ao meu primeiro orientador, no estagio curricular do Coltec, Prof José Divino Lima, *in memorian*, grande inteligência para o raciocínio científico, muito me ensinou.

Ao Prof Ferreirinha, *in memorian*, que me explicou a gde e longa escada na vida profissional. Prof David Pereira Neves, que desde aluno do Coltec me dizia que dedicando eu iria longe.

Ao Prof Antonio Marques, amigo que desde minha adolescência me ensinou ao entendimento e raciocínio do mundo científico com amor e respeito a natureza, nas tentativas da erradicação dos *idiotas da objetividade*.

Aos meus colegas da Pós Graduação, o Amigo Dunezeu, pessoa fina e conselheira, boas sugestões pra um amigo, Bruno Preto Pagode TPColtec, Sueli, Luis Marcelo Pinheiro, na ajudado Projeto Piloto, Gabriel Bacha, Fernanda, Ari, Ana, Luiza, Patrícia Leite, Daniel Ceará, Telma, Marcus Magrinho, Sandra, em especial a Daniela Dandari, Chiquinho Tico²aves, Anibol Bulbo, gde ajuda e muito obrigado ao Felipe Masiero, no acabamento, formatação e correção final da dissertação.

As meninas da Graduação Luiza Leite, Talita e a Camila.

Gde amigo, padrinho e motivador científico Drº Zenon *Dermatobia* Rodrigues.

A Residente do Hospital Veterinário Jackeline V. Rezende que surgiu nos final de toda a realização desta, mas me deu muitos incentivos em concluir tudo isso e passar pra outras... Valeu muito, obrigado, e carinho.

A Bióloga Nancy Biosan, pela atenção e privilégio em me apresentar Dr Geraldo Leucádio, e o maior presente que ganhei as 10 mil placas de Petri para nosso projeto.

Aos Técnicos e amigos da ICB-GIDE-UFMG Dr^a Wanderlaine, Sr Alberto e Sr Airton no incentivo a minha qualificação técnica, dentro da instituição em que trabalhamos.

Agradecimentos: CNPq, CAPES, FAPEMIG, INCT/IGSPB Informação Genética Sanitária da Pecuária Brasileira, FEP/MVZ Coord. Preventiva, FUNED, FIOCRUZ, ICB, Dep. QUÍMICA.

À FUNED e toda equipe, Srº Drº Geraldo Leucádio Filho, meu maior e melhor Professor de bancada em Laboratório de Bacteriologia, com a grande competência técnica e maior intenção em me ensinar a esse laborioso assunto de Cultura, Isolamento e IDENTIFICAÇÃO de Enterobacteriaceae, GNNF... Meu melhor Professor. A Cris M^a Crisolita, minha Mãe científica, acolhedora, grande incentivadora, muitos anos de Cultura Bacteriológica, me encantou por essa Ciência ao Reino: Monera, me disponibilizando sempre seu laboratório, ao Prof Dr Luiz Simeão do Carmo, grande cientista que com muita sabedoria sempre me ensinou demonstrando sempre o caminho da modéstia, é que se vai longe.

À FIOCRUZ, ao Prof Dr Ernesto Hofer, meu colaborador e orientador na metodologia nas culturas bacteriológicas, que me deu a luz pra guiar essa

pesquisa, com tamanho conhecimento Bacteriológico, e a oportunidade de ser seu aluno em me passar muito conhecimento em Bacteriologia, minha profunda admiração e respeito.

A Imunodiagnóstica aos Sr Gonçalves, Carlos e a Srt^a Cinara, que sempre me atenderam em favor da realização durante a execução de toda a pesquisa. Quanto à logística nos reagentes e infinitos meios de cultura sempre com muita correria... Muito obrigado pela atenção e agilidade.

Em **especial** aos Profs **Romário Cerqueira Leite**, que desde meu primeiro estágio pós Coltec, desde pesar ovos, e manter ciclo de carrapatos, muito me ensinou, elogiou, acreditou na minha capacidade em uma formação sempre melhor, e ao **Nelson Rodrigo Martins** com toda a sabedoria e rei da pedagogia aos ensinamentos e reflexões técnica científicas de Cianófitas, Vertebrata, até ao buraco negro do universo, peptídeos espaciais, colicinas bacterianas, GNNF, energia oriundas de prótons de flagelos, muitas necropsias, Trichuridae ou *Capillaria* spp., Astroviridae, horas de observações e diálogos em microscópios noite adentro, amor a natureza, a vida e muito mais, meus agradecimentos a esses professores e amigos do serviço público.

Ao Professor **Rômulo Cerqueira Leite**, pela orientação, ensinamentos, paciência, pela imensa contribuição em minha formação acadêmica e profissional, principalmente, pela confiança em mim depositada, durante muitos anos.

RESUMO

Essa pesquisa objetivou estudar a Lagoa da Pampulha (Belo Horizonte) em 2008 e 2009, abrangendo dois aspectos importantes a qualidade bacteriológica da água nas estações seca e chuvosa e a bacteriologia de diversos tecidos (pele, brânquia, SNC, rim, fígado, fezes e filé) dos pescados ciclídeos (Cichlidae), em quatro pontos de maior atividade de pescadores. Em cada ponto foram coletadas, uma amostra de água e três exemplares de peixes, totalizando vinte e quatro peixes examinados. Tendo em vista a utilização destes como alimento para as populações ribeirinhas, uma estratégia popular de tratamento da carne do peixe, a adição de sumo de limão, foi avaliada quanto à eficiência antibacteriana. Na água, as contagens de coliformes fecais totais, coliformes fecais termotolerantes (45°C) e *Enterococcus* spp. somaram, respectivamente, 18.112, 3.700 e 1.068 NMP/100 mL, valores três, sete e quatro vezes maiores que os recomendados pelas portarias Nº 518/2004 do Ministério da Saúde, APHA 2005, COPAM Nº 010/1986 e CONAMA 2001 Nº 020. Nos peixes foi encontrada contaminação por diversas espécies de bactérias da família Enterobacteriaceae, GNNF, e gêneros *Aeromonas* spp. e *Flavobacterium* spp., em todos órgãos dos peixes estudados, inclusive nos filés, mostrando um alto risco sanitário para os consumidores. Já o sumo de limão não apresentou resultado satisfatório na redução da contaminação bacteriana dos filés, possivelmente devido à alta contagem pré-existente. Os indicadores bacteriológicos são resultado da urbanização no entorno da Lagoa e demonstram o risco à saúde humana com o consumo de seus peixes e a necessidade do tratamento dos efluentes domésticos e industriais lançados incorretamente.

Palavras-chave: coliformes fecais; coliformes totais; coliformes fecais termotolerantes; enterobacteriaceae; gnnf; enterococcus spp.; aeromonas spp.; flavobacterium spp.; indicadores de qualidade de água; saúde pública; contaminação bacteriana; cichlidae; efeito antrópico; efluentes doméstico; Lagoa da Pampulha; Belo Horizonte.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the Pampulha Lagoon (Belo Horizonte, MG) in 2008 and 2009, covering two important aspects, the bacteriological quality of water in the dry and rainy seasons and bacteriology of several tissues (skin, gill, liver, kidney, central nervous system and muscle) of cichlid (Cichlidae), fish on four sites regularly chosen for fishing. Considering the use of such fish as food for coastal communities, a popular strategy for treatment of the fish, addition of lemon juice, was evaluated for antibacterial efficiency. In water, the counts of total coliforms, fecal thermotolerant coliforms (45°C) and *Enterococcus* spp. totaled, respectively, 18,112, 3,700 and 1,068 MPN/100ml, values, representing three, seven and four times higher than counts recommended by ordinances No. 518/2004 of the Ministry of Health, APHA 2005, No. 010/1986 and COPAM CONAMA 2001 No. 020. In fish, contamination with different species of bacteria of the Enterobacteriaceae, GNNF, and genera *Aeromonas* spp. and *Flavobacterium* spp. was found in all organs, including the fillet, showing a potential high health risk to consumers. Lemon juice did not show a satisfactory result in reducing bacterial counts in fillets, possibly due to high pre-existing numbers. The bacteriological indicators are the result of urbanization around the lake and show the potential risk to human health with the consumption of fish and reinforce the need for treatment of domestic and industrial effluents.

Keywords: fecal coliforms; total coliforms; thermotolerant fecal coliforms; enterobacteriaceae; gnnf; enterococcus spp.; aeromonas spp.; flavobacterium spp.; indicators of water quality; cichlidae; anthropic effect; domestic effluents; Lagoa da Pampulha; Belo Horizonte.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: amostras bacterianas de referência do ATCC utilizadas.	23
Tabela 2: resultados do exame bacteriológico da água da Lagoa da Pampulha coletados em quatro pontos, no período de seca e chuva, em 2008 e 2009.	26

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: vista aérea superior do local estudado e dos pontos de coletas mostrados em alfinete amarelo.	22
Figura 2: Distribuição de três famílias de bactérias em órgãos e fezes de peixes da Lagoa da Pampulha nos períodos de seca e chuva nos anos de 2008/2009.	29
Figura 3: Distribuição de bactérias isoladas nas fezes de peixes da Lagoa da Pampulha, no período de seca e chuva nos anos de 2008 e 2009.	30
Figura 4: Distribuição de bactérias isoladas nas brânquias de peixes da Lagoa da Pampulha, no período de seca e chuva nos anos de 2008 e 2009.	31
Figura 5: Distribuição de bactérias isoladas no rim de peixes da Lagoa da Pampulha, no período de seca e chuva nos anos de 2008 e 2009.	33
Figura 6: Distribuição de isolados nos filés dos peixes da Lagoa da Pampulha nos períodos seca e chuvoso nos anos de 2008/2009.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE: Ágar Ampicilina Dextrina
EtanolASA: Ágar Sangue
ASA: Ágar Sangue Azida
SódicaASF: Ágar Simples
Fosfatase
ATCC: American Type Culture
CollectionB-E: Ágar Bile-Esculina
BHI: Caldo Brain Heart Infusion (ou 3C)
CCIB: Crescimento Contínuo no Indulto
BacterianoCDA: Caldo Dextrose Azida
CDC: Center Disease of Control - Atlanta
USACL: Caldo Lactosado
DBO: Demanda Bioquímica de
OxigênioD-Gli: Dextrógera
Glicose
DMVP: Departamento de Medicina Veterinária
PreventivaEEC: *Escherichia coli*
enterotoxigênica
EC: Caldo *Escherichia coli*
IAL: Meio do Instituto Adolfo Lutz
EMB: Ágar Eosine Metile Blue (Levine &
Teague)EH: Ágar Entérico Hektoen
GNNF: Gram Negativa Não Fermentadora
ICZN: (International Code Zoological
Nomenclature)Lac (+): Colônia Lactose
Positiva
LIA: Lisina Iron
AgarLig: Meio

Lignières

L-Lys: aminoácido Levôgero Lisina

L-Try: aminoácido Levôgero

TryptofanoMC: Ágar Mac Conkey

MMM: Meio Mínimo de

ManutençãoNMP: Número

Mais Provável

N₂PK: Nitrogênio, Fósforo e

PotássioOD: Oxigênio

Dissolvido

SS: Ágar *Salmonella/Shigella*

SIM: Enxofre (H₂S), Indol e Motilidade

TSI:Triple Sugar (Glicose, Lactose e

Sacarose) IronXLD: Ágar Xilose Lactose

Desoxicolato de Sódio VB: Caldo Verde

Brilhante

VRE: Vancomycin Resistent *Enterococcus*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1. LITERATURA CONSULTADA.....	14
1.1 Lagoa da Pampulha.....	14
1.2 Qualidade bacteriológica da água	15
1.3 Bacterioses em peixes.....	16
1.3.1 <i>Aeromonas</i> spp	17
1.3.2 <i>Flavobacterium</i> spp.....	18
1.3.3 <i>Streptococcus</i> spp.....	18
1.3.4 <i>Pseudomonas</i> spp.	19
1.3.5 Enterobacteriaceae	19
1.3.6 <i>Plesiomonas shigelloides</i>	20
1.4 Avaliações dos filés de peixes.....	20
1.4.1 Avaliações dos filés de peixes submetidos ao extrato suco de limão	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 Áreas de estudo.....	21
2.2 Locais de realização das análises bacteriológicas	22
2.3 Coletas das amostras de água e peixes.....	22
2.4 Amostras de referência.....	22
2.5 Meios de cultura para análises bacteriológicas das águas.....	23
2.6 Análises bacteriológicas das águas (teste quali-quantitativo).....	23
2.6.1 Isolamento de coliformes	23
2.6.2 Isolamento de <i>Enterococcus</i> spp.	23
2.6.3 Padrões microbiológicos de referência de água	24
2.7 Análises bacteriológicas dos peixes	24
2.7.1 Pesquisa de Enterobacteriaceae, <i>Salmonella</i> e GNNF.....	24
2.7.2 Pesquisa de <i>Aeromonas</i> spp	24
2.7.3 Pesquisa de <i>Flavobacterium</i> spp.	24
2.7.4 Pesquisa de <i>Streptococcus</i> spp	25

2.8 Análises bacteriológicas dos filés dos peixes	25
2.8.1 Preparação dos filés dos peixes	25
2.8.2 Extrato de limão	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4. CONCLUSÕES	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

A Lagoa da Pampulha é um lago artificial localizado na cidade de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais. Foi construída em 1938 como um reservatório para o abastecimento de água, e ao longo dos anos se transformou em uma das atrações turísticas do município. Embora Belo Horizonte tenha sido planejada para dentro do perímetro urbano da Avenida do Contorno, ocorreu um crescimento desordenado no sentido da periferia e entorno da Lagoa, com ocupação de suas margens e não preservação de seus mananciais.

A Lagoa da Pampulha deságua no ribeirão Pampulha, integrante da bacia do ribeirão Onça, um afluente do rio das Velhas. São tributários diretos da Lagoa da Pampulha os córregos Olhos d'Água, Braúna, Água Funda, Tijuco, Mergulhão, Sarandi (Betim) e Ressaca (Contagem), sendo que esses dois últimos são os principais, contribuindo com 70,00% do volume de água.

Os despejos de esgotos doméstico, industrial e hospitalar estão entre as agressões mais frequentes contra a Lagoa da Pampulha, gerando um excesso de matéria orgânica. Conseqüentemente foi estabelecido um processo de eutrofização, levando a uma redução do oxigênio dissolvido (OD) da água, proporcionando um ambiente hostil para fauna e flora, além do crescimento exacerbado de microrganismos patogênicos e acúmulo de metais pesados.

A qualidade microbiológica da água tem relação direta sobre a saúde dos organismos aquáticos. As altas contagens de bactérias com potencial patogênico podem significar riscos aos consumidores da carne dos peixes. Os pescados oriundos da Lagoa da Pampulha são utilizados como alimento para uma significativa faixa da população de baixa renda, apesar da proibição da pesca no local. Na preparação destes pescados, há uma prática muito

comum na utilização do caldo de limão como uma forma de tempero dos filés, etambém como sanitizante na higienizaçãodos mesmos.

A ocupação desordenada e o crescimento acentuado da população de baixa renda na periferia da região da Pampulha fizeram com que a pesca viesse a ser além de uma atividade de subsistência, uma fonte de alimento. Porém o consumo de peixes criados em um ambiente desfavorável, expõe a riscos os consumidores e aqueles que entram em contato direto com a água. Diante dessa situação esse trabalho objetivou estudar e analisar a qualidade bacteriológica da água, dos peixes e filés *in natura* e tratados com caldo de limão, obtidos na Lagoa da Pampulha nos anos de 2008 e 2009.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Lagoa da Pampulha

A lagoa da Pampulha foi criada em 1938 com o objetivo inicial de reservatório de água, para tentar minimizar os efeitos das chuvas e também como lazer. A bacia hidrográfica da lagoa tem área de 97,91 Km², delimitada pelas coordenadas UTM's N78079/77940 e E 5950/6087, situada na região metropolitana de Belo Horizonte, MG. Parte se encontra em Belo Horizonte (43,97 Km²) e parte no município de Contagem (53,94 Km²). A capacidade original de armazenamento, a partir da sua reconstrução em 1954 era de 18,0 x 10⁶ m³, atualmente esta reduzida a 8,5 x 10⁶ (CDTN, 2000), ocupando uma superfície de 2,08 Km². A lâmina d'água é rasa devido ao assoreamento, atingindo 14,0 m nas proximidades do vertedouro.

A ocupação urbana desordenada, o desmatamento das margens e cabeceiras dos córregos, o decapeamento do solo, a deposição inadequada de resíduos sólidos, redes de esgoto clandestinas com lançamento nos cursos d'água, entre outros, contribuíram para a degradação gradativa da Lagoa da Pampulha. O excesso de

nutrientes N₂, P e K (nitrogênio, fósforo e potássio) redundam em eutrofização refletindo na sua população de organismos, inclusive peixes, no crescimento súbito e exacerbado de algas, relativamente comum, trazendo mal odor e mortandade de peixes. Igualmente preocupante é a presença de microrganismos patogênicos nas águas e peixes, em função da alta carga de matéria orgânica acumulada na Lagoa. Ambientes saturados de matéria orgânica (N₂, P e K) são altamente propícios para o desenvolvimento de bactérias na água. Adicionalmente tem-se demonstrado que a microbiota normal bacteriana do peixe é um reflexo direto da flora da água em que ele se encontra.

Na Lagoa da Pampulha a pesca é geralmente praticada por pescadores de nível sócio-econômico e cultural baixos, sem que as mínimas condições de higiene sejam observadas durante a captura, manuseio, armazenamento e consumo do pescado, resultando na obtenção de produto de baixa qualidade sanitária e, portanto colocando em risco a saúde de quem o consome. Muito embora sejam consumidos após cocção, há vários registros epidemiológicos apontando os peixes como responsáveis por grande número de intoxicações alimentares causadas por toxinas termoresistentes (Oliveira e Viegas, 2004).

A ictiofauna da Lagoa da Pampulha é constituída essencialmente por espécies de tilápias, as quais foram introduzidas com o propósito inicial de controle populacional dos aguapés. Sabe-se que esta espécie tolera qualidade de água adversa e outros estressores, muito melhor que outras espécies de peixes, pelo que recebe o rótulo de “resistente a doenças”. Mas mesmo estes rústicos espécimes freqüentemente sucumbem à intensa poluição da Lagoa da Pampulha.

2.2 Qualidades bacteriológicas da água

Desde os primórdios da microbiologia sanitária, a mensuração da contaminação

de águas foi determinada por meio de indicadores microbiológicos da presença de material fecal. Há décadas, os organismos que melhor tem cumprido este papel, são as bactérias do grupo coliforme, um eficiente bioindicador. Há relação da presença destes microrganismos na água e riscos potenciais à saúde, pois podem estar associados à presença de enterobactérias patogênicas. (Murray et al., 2007).

O grupo coliforme pertence à família *Enterobacteriaceae*, que é constituída por vários gêneros: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Yersinia*, com 30 gêneros e 210 espécies descritas (Holt et al., 1994). Estas bactérias são Gram negativas com morfologia variando de coco-bacilos a bastonetes curtos, e não possuem capacidade de esporular. Todas as enterobactérias são capazes de crescer na presença de sais biliares e de fermentar a glicose com produção de ácidos. Alguns gêneros fermentam a lactose com liberação de gases como o dióxido de carbono (CO₂), hidrogênio (H₂) e algumas produzem ácido sulfídrico (H₂S), como é o caso de algumas espécies dos gêneros *Edwardsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. e *Salmonella* spp.. São anaeróbios facultativos e quimiorganotróficos, e têm o metabolismo tipo fermentativo e crescimento ótimo à 37°C. As enterobactérias estão normalmente presentes em locais com grande acúmulo de matéria orgânica e minerais, como o nitrogênio, fósforo e potássio (Murray et al., 2007).

O antagonismo entre patógenos entéricos pode ocorrer entre alguns membros do grupo coliformes, como, por exemplo, *Escherichia coli* e *Proteus* spp., que produzem colicinas, substâncias inibidoras do crescimento das *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (Frederic e Levine, 1947; Cook et al., 1953; Levine e Tanimoto, 1954).

Desde o século XIX tem-se desenvolvido métodos de avaliação da qualidade de água, por meio da quantificação dos coliformes, sendo *Escherichia coli* o mais eficiente indicador, pois constitui 95% do

grupo coliforme em fezes humanas e animal (Dufour, 1977; Rice et al., 1990; APHA, 2005). São vários os testes utilizados para detecção de coliformes e com destaque na *Escherichia coli*, como, por exemplo, número mais provável (NMP) obtido através da detecção da produção de ácidos e gases oriundos da fermentação da lactose em tubos múltiplos; método de membranas filtrantes; contagem de unidades formadoras de colônias (UFC); e também o teste enzimático Colilert, que detecta a presença da metil umbiliferil beta galactosidase, presente na *Escherichia coli* e em outros gêneros, como *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (Trepeta e Edberg, 1984; Eckner, 1998).

À utilização das águas para recreação de contato primário, como balneário, há na legislação em vigor, a regulamentação para avaliação da qualidade sanitária das águas pela medição das concentrações de um ou mais organismos indicadores presentes nos dejetos humanos ou de animais. Estes números são empregados na classificação do meio como próprio ou impróprio para balneabilidade (Conama, 2001). Desta forma estas águas necessitam ser monitoradas por análises microbiológicas para avaliar sua qualidade, proteger a saúde e assegurar o bem estar humano. *Pseudomonas* spp. é um patógeno humano e resistente à cloração, que pode ser considerado como indicador padrão de balneabilidade, e útil como parâmetro da Vigilância Sanitária (APHA, 2000; Guidelines for... 2002).

Os *Enterococcus* estão inclusos na seção XXII Lactobacilli, Ordem II Lactobacillales, Família IV Enterococcaceae. O gênero *Enterococcus* inclui vinte espécies, são cocos Gram Positivo Aeróbios ou Anaeróbio Facultativo, foi proposto por Schleifer e Kilpper-Balz (1984) e por Collins et al. (1984) os quais transferiram algumas espécies de *Streptococcus* para o gênero *Enterococcus*. Coliformes e enterococos fecais são amplamente utilizados como indicadores de contaminação de água, sendo importantes no controle sanitário (Bordalo, 1993; Colwell, 1993; APHA, 2000). Sabe-se que esses agentes, os enterococos

fecais, podem sobreviver por mais tempo em condições adversas devido à natureza de sua membrana de ácido teicoico (Evison, 1989; Okpookwasili e Akujobi, 1996; APHA, 2000; Bordalo, 2002). A grande preocupação do ponto de vista da saúde pública, com os altos índices de *Enterococcus* spp. na água, justificam os sintomas apresentados por banhistas após o contato com esse tipo de água, como febre, erupção cutânea, náusea, diarreia, dor de estômago e tosse (Pruss, 1998). Não obstante essas bactérias apresentam grande capacidade de adquirir resistência aos fármacos, como, por exemplo, a vancomicina o que amplia mais ainda os problemas existentes (Weber e Rutala, 1997; Murray, 1998; McEwen e Fedorka-Cray, 2002).

A avaliação da qualidade da água por meio da identificação desses enteropatógenos constitui importante indicador epidemiológico (Serra et al., 2003), além de possibilitar inferência de modo indireto da ocorrência de doença de veiculação hídrica na população (Braz et al., 1999). Do ponto de vista de saúde pública, é importante considerar não apenas a possibilidade de transmissão de doenças de veiculação hídrica por contato direto ou indireto com a água contaminada, mas também, a contaminação dos alimentos obtidos destas águas (Azevedo, 2001).

2.3 Bacterioses em peixes

Há uma vasta gama de bactérias que está naturalmente presentes na pele dos peixes, o que reflete a composição da microbiota da água de um lago. Vários autores têm demonstrado uma correlação entre a biomassa de peixes com a concentração de coliformes fecais na água (Markosova e Jezek, 1994; Davis et al., 1995), Pseudomonadales (Nayak; 2010) e Aeromonadaceae (Janda e Abbott, 2010). Peixes que vivem em meio ambiente natural geralmente abrigam Enterobacteriaceae apenas no trato digestório (Polprasert et al., 1984; Nayak, 2010). Entretanto essas bactérias, quando em elevada concentração na água, também são encontradas na pele e tecidos dos animais aquáticos, e podem

causar doenças em humanos e outros animais de sangue quente (Pillay, 1992).

As bactérias responsáveis por doenças em peixes ocorrem naturalmente no ambiente aquático e estão amplamente distribuídas como saprófitas, utilizando o material orgânico e mineral do ambiente para do seu crescimento e multiplicação. Esses microrganismos fazem parte da microbiota bacteriana normal dos peixes, tornando-se patógenos oportunistas no momento em que o animal sofre algum tipo de estresse ou outros processos de doenças (Frerichs e Millar, 1993). A má qualidade da água caracterizada pela redução dos níveis de O.D. (oxigênio dissolvido), induz estresse no animal, manifestado por elevados níveis de cortisona, um hormônio considerado potente imunossupressor que tem induzido baixa imunidade em peixes, resultando em uma maior susceptibilidade à infecções bacterianas (Pickering e Pottinger, 1989).

A contaminação orgânica no meio ambiente, segundo Ranzani-Paiva et al., (2004) faz com que ocorra um aumento da densidade de patógenos oportunistas, o que associado com a diminuição das defesas imunológicas dos peixes, faz com que conseqüente aumento no número de enfermidades apresentadas por esses animais.

Poucas são as espécies bacterianas consideradas patógenos obrigatórios de peixes. Dentre estes patógenos, podemos destacar as bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Streptococcus*, ordem Pseudomonadales e família Enterobacteriaceae. Estas podem permanecer por longos períodos no ambiente aquático, porém não são capazes de se multiplicar sem a presença de um hospedeiro e/ou nutrientes presentes na água (Frerichs e Millar, 1993; Inglis et al., 1993; Austin e Austin, 2007).

2.3.1 *Aeromonas* spp.

Aeromonas spp. são bactérias da família Aeromonadaceae, Gram negativas, fermentadoras e com morfologia variando

de cocoides a bastonetes curvos. Existem 21 espécies diferentes (Janda e Abbott, 2010), que fazem parte da microbiota da pele e do intestino de peixes saudáveis. Podem causar infecções nas brânquias e na pele, principalmente quando há excesso de matéria orgânica na água (Diggle et al., 2002). O Código OIE indica claramente que peixes eviscerados com presença de *Aeromonas*, apresentam riscos negligenciáveis no que diz respeito à transmissão deste microrganismo (OIE, 2006a). A grande quantidade de isolamentos de *Aeromonas* spp. em águas de lagoas altamente poluídas e expostas à degradação ambiental de origem antrópica, podem estar relacionada com poluentes químicos orgânicos e inorgânicos, veiculados pelos esgotos (Vieira et al., 2004; Janda e Abbott, 2010).

As movimentações de peixes vivos é o principal meio de propagação na translocação de *Aeromonas*, entre os criatórios de produção de peixes (Hiney e Olivier, 1999). *Aeromonas hydrophila* é a espécie mais freqüente sendo capaz de produzir lesões de pele, no fígado e rins, hemorragias, exoftalmia, ascite, brânquias pálidas (Camus et al., 1998; Diggle et al., 2002; Janda e Abbott, 2010). Segundo Evelyn (2001) as vísceras dos animais clinicamente infectados contêm acima de 10.000 coliformes quando comparado com o tecido muscular.

A septicemia hemorrágica bacteriana, também denominada de peste vermelha, é a principal patologia determinada por *Aeromonas* spp. em peixes. É caracterizada pela ruptura de pequenos vasos sanguíneos, por lesões ulcerativas e hemorrágicas na pele, que se estendem por todo o corpo do animal, além hemorragia nos órgãos internos. Pode também ser observada a presença de alargamento da cavidade celomática, necrose de nadadeira cauda, e perda de escamas. Em casos de septicemia generalizada, ocorre hipertrofia de baço, rim, hemorragia abundante, necrose em vários órgãos principalmente no baço e rim (Diggle et al., 2002).

Existe uma preocupação com os potenciais riscos de infecções por *Aeromonas* spp. ao se manipular e processar peixados, pois há possibilidades de se veicular este agente por alimentos ao ser humano, levando ao aparecimento de variadas doenças, como, por exemplo, desordens gastroentéricas, infecções de pele e tecidos moles (Hejkal et al., 1983; Fatal et al., 1993). A presença de *Aeromonas* spp. em pescados, representa um risco à saúde, se consumidos crus ou por infecção cruzada por manipulação, pois essa bactéria está envolvida na doença diarréica dos viajantes. Em um surto desta patologia analisado por Hofer et al. (2006) no estado de Pernambuco nos anos de 2003 e 2004, a participação de *Aeromonas* spp. foi de 19,50%, sendo que também foram isoladas nesse mesmo surto bactérias da família das Enterobacteriaceae, Vibrionaceae e Aeromonadaceae.

2.3.2 *Flavobacterium*

Flavobacterium spp. são bactérias Gram-negativas, móveis, de morfologia filamentosa e pertencente à família Flavobacteriaceae (Holt et al., 1994). A principal espécie é *F. columnare*, que podem causar necrose de nadadeira e úlceras de pele tanto em alevinos quanto nos peixes adultos, com uma significativa taxa de mortalidade diária (Figueiredo et al., 2005). Outra patologia causada por bactérias do gênero *Flavobacterium* é a “síndrome da boca erosionada, necrose da mancha negra ou columnarose”, que está amplamente distribuída em peixes de cultivo e selvagens, de qualquer idade. Epidemiologicamente é estimado que todas as espécies de peixes são sensíveis à infecção por alguma espécie da família Flavobacteriaceae (Shotts e Starliper, 1999).

Fatores estressantes para os peixes como temperatura elevada da água, comprometimento nutricional e presença de grande concentração de matéria orgânica, podem tornar o animais vulneráveis a infecções por *F. columnare*, acometendo principalmente brânquias, superfície da pele e nadadeiras, mesmo a superfície do animal sendo protegida pelo muco

(Decostere et al., 1998 e 1999). Observações microscópicas de bactérias filamentosas em brânquias e lesões externas sugerem ser esta a porta de entrada para patógenos secundários (Ranzani-Paiva et al., 2004).

2.3.3 *Streptococcus* spp.

A primeira notificação de doença em peixe causada por *Streptococcus* spp. foi relatada em tilápias no ano de 1970, sendo o isolamento e a identificação de *Streptococcus iniae* realizado em 1972, em uma lesão subcutânea de um golfinho (*Inia geoffrensis*) criado em cativeiro na Califórnia, EUA (Pier e Madin, 1976). *S. iniae* causa meningoencefalite e morte em espécies cultivadas e pode também ser um patógeno emergente para humanos, associada com lesão ocupacional de trabalhadores na aquicultura (Bercovier et al., 1997; Weinstein et al., 1997; Novotny et al., 2004).

Foi observada em 1986, uma infecção estreptocócica, caracterizada por quadros de meningoencefalite e mortalidade de 30- 50%, estava propagando em diferentes populações de peixes de vários criatórios, especialmente tilápias, truta arco-íris e *Oncorhynchus mykiss* (Eldar et al., 1994; Weinstein et al., 1997).

Figueiredo et al. (2006) isolaram *Streptococcus agalactiae* de rim, baço e cérebro de Tilápias adultas do Nilo, oriundas de pisciculturas dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Os principais sinais clínicos observados foram escurecimento dos peixes, exoftalmia uni ou bilateral, pequenas lesões de pele com perda de escamas, áreas de petéquias na base das nadadeiras ventrais, natação errática e em movimentos circulares. A doença apresentou evolução rápida, com a morte ocorrendo entre dois a três dias após o início dos sintomas.

Nos últimos anos, tem-se observado uma maior ocorrência de casos clínicos em peixes associados a *S. iniae*, *S. agalactiae* e *Acinetobacter calcoaceticus* em diferentes

regiões do mundo, o que levou o mesmo a ser considerado patógeno emergente para peixes em ambientes de água doce ou marinho (Evans et al., 2002). O risco de surtos ocorre quando os peixes são submetidos a situações estressantes, como em condições de baixa concentração de OD, altos níveis de nitrito, nitrato e elevadas densidades nos criatórios Bunch e Bejerano (1997).

2.3.4 *Pseudomonas*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram negativa, mas de família não pertencente ao grupo dos coliformes fecais, e sim à ordem VIII: Pseudomonadales, e da família I: Pseudomonadaceae (Holt et al., 1994).

A síndrome da septicemia hemorrágica bacteriana pode estar associada a vários agentes como a *Aeromonas* spp., *Edwardsiella tarda*, *Proteus* spp. e *Pseudomonas* spp., que são consideradas como patógenos oportunistas. Sua multiplicação ocorre principalmente quando os peixes são submetidos a manejos indevidos, traumas, deficiência nutricional, baixa qualidade de água (Plumb, 1999; Ranzani-Paiva et al., 2004).

As principais espécies do gênero *Pseudomonas* spp. que causam infecções oportunistas em peixes podem causar doenças em humanos (Buller, 2004). O isolamento de *P. aeruginosa* a partir de peixes é comum em quadros de septicemias.

2.3.5 Enterobacteriaceae

O gênero *Edwardsiella* pertence à família Enterobacteriaceae, sobrevive em ambiente aeróbico e anaeróbico, fermenta glicose, é Gram negativo, com morfologia de bacilo curto, móvel, oxidase negativa e catalase positiva. As duas principais espécies são *E. tarda*, que é indol positivo e H₂S positivo, e *E. ictaluri*, que é indol negativo e H₂S negativo (Holt et al., 1994). Tem distribuição mundial e uma ampla gama de hospedeiros, peixes marinhos e de água doce, répteis,

aves, bovinos, suínos e mamíferos marinhos (Plumb, 1999; Panangala et al., 2006).

E. tarda é um agente patológico, responsável por causar septicemia generalizada, caracterizada por hemorragias na pele e boca, ulceração cutânea, hiperemia, exoftalmia e prolapso anal (Plumb, 1999). Lesões cutâneas podem evoluir para profundas necroses musculares, internamente no rim e o fígado aparece hemorrágico, desenvolvendo abscessos em órgãos internos. Embora considerada como oportunista, é uma bactéria importante do ponto de vista de risco patológico para os peixes, além de ter potencial zoonótico (Inglis et al., 1993; Muratori et al., 2001).

E. tarda tem sido relatada em tilápias (*Oreochromis niloticus*) no Brasil com índices de mortalidade bastante significativa (Muratori et al., 2000). Em um estudo realizado por Saleh (2005) com infecções naturais em *Oreochromis*, 25% da população estudada apresentou sinais clínicos característicos da infecção por *E. tarda*, sendo que seu isolamento ocorreu em 29% das amostras de fígado, rins e baço. A transmissão é direta e horizontal com a entrada do patógeno através de lesões da pele ou por ingestão oral (Plumb, 1999; Wiedenamyer et al., 2006).

Providencia rettgeri é uma enterobactéria importante na determinação da contaminação do pescado. Foi relatado seu isolamento de rim de tilápia no Egito (Faisal et al., 1989; Import... 2008). *P. rettgeri* foi isolada de peixes doentes, que apresentavam órgãos internos lesionados, septicemia, degeneração muscular e lesões ulcerativas profundas na superfície externa (Inglis et al., 1993). Patógenos entéricos oportunistas como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia* spp., tem sido relatado como agentes oportunistas para peixes e répteis. Insetos, aves e plantas servem como reservatório desses microrganismos, devido aos efeitos antrópicos que proporcionam à presença desses agentes no ambiente (Inglis et al., 1993; Bejerano et al., 1979).

2.3.6. *Plesiomonas shigelloides*

Plesiomonas shigelloides é uma bactéria anaeróbica facultativa e pertence à família Vibrionaceae. Normalmente pode ser encontrada na água, em esgotos, no trato gastrointestinal de peixes e aves, sendo causa de intoxicações alimentares em humanos (Carter e Chengappa, 1991). Ocorre principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical (Hernandes e Garcia, 1997). *P. shigelloides* provoca surtos de septicemia em peixes quando estes estão sob condições de estresse (Graevenitz, 1980). Essa bactéria foi relatada na Nova Zelândia por Buller, (2004); e em alevinos de tilápias em Taiwan, determinando elevada taxa de mortalidade (Faisal et al., 1989).

Canabarro, (1991) trabalhando com amostras de peixes de varias espécies encontrou 12,93% de animais infectados com bactérias dessa espécie, no estado do Rio Grande do Sul, o que é um microrganismo normalmente encontrado na água, no organismo de peixes e aves, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, sendo causa também de intoxicações alimentares em humanos (Carter e Chengappa, 1991).

2.4 Avaliações dos filés de peixe

A contaminação das águas das bacias pesqueiras pelas descargas de efluentes de esgotos representa a mais importante via de transmissão de bactérias para os peixes, moluscos, crustáceos, rãs e cefalópodes, podendo comprometer direta ou indiretamente a qualidade do pescado que serve de alimento para homens e animais (Germano et al., 1993). Muratori (2000) verificou que a transmissão de enfermidades entéricas está relacionada com o consumo de alimentos à base de pescado contaminado por manipulação inadequada, ou por sua origem de peixes contaminados no ambiente hídrico. São vários os registros epidemiológicos que apontam o consumo de alimentos à base de peixes como responsáveis por intoxicações alimentares causadas por toxinas

termoresistentes (ANVISA, 2001; Oliveira e Viegas, 2004; Vieira et al., 2004).

Peixes contaminados por coliformes fecais ou por *Escherichia coli* não apresentam qualquer sinal sensorial que possa servir de alerta ao consumidor, sendo a identificação destes microrganismos realizada por meio de técnicas microbiológicas (Muratori, 2000). Outras bactérias potencialmente patogênicas como a *Shigella*, *Aeromonas* e *Plesiomonas* podem também desempenhar papel importante nas contaminações de peixes. *Aeromonas hydrophila* é a espécie mais frequentemente associada a doenças veiculadas por alimentos e *P. shigelloides* está relacionada à gastroenterites constatadas após o consumo de peixes. Foi observada enterite hemorrágica no interior do tubo digestivo de Tilápias causada por *E. tarda*, o que sugere que possa haver migração desse agente do intestino para a carne (Muratori et al., 2001).

Ogbondeminu e Okoye (1992) afirmam que a qualidade microbiana de carpas estocadas em tanques supridos e com água residual não tratada, podem apresentar contaminação no músculo por coliformes fecais e *Enterococcus* spp. mesmo quando a contagem desses agentes na água for inferior a 10^4 UFC/100 mL. *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. e *Flavobacterium* em águas temperadas são bactérias que participam mais ativamente do processo de deterioração, levando a putrefação e comprometendo a qualidade do pescado. Além disso, *Proteus* spp., *Morganella morganii* e *Proteus vulgaris* são produtoras de histidina descarboxilase, que transforma a histidina em histamina, responsáveis por provocar intoxicações de natureza alérgica nos indivíduos que consomem pescados contaminados com estas bactérias (Barros, 2003).

São dois os processos que contribuem para a putrefação precoce do pescado, um de natureza bioquímica, como a autólise ou autodigestão ocasionada por ação das enzimas do próprio músculo, e o outro são as bactérias que se encontram nas brânquias, na superfície exterior e no intestino (Sales et al., 1988). A

contaminação através dos orifícios e cavidades dos peixes e moluscos por bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* (grupo CDC 1b), *Serratia*, *Proteus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, entre outros gêneros também podem desencadear o processo de deterioração e putrefação do pescado (Elliott 1948; Lahiry et al., 1963; Shewan, 1970; Schreckenberger e Graevenitz, 1999; Vieira et al., 2004). Outros agentes bacterianos como *Proteus morgani*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, além de *Enterococcus* e coliformes fecais são relatados com frequência como contaminantes de pescado fresco, sempre correlacionado com a qualidade da água de origem do pescado ou decorrentes da contaminação pós-captura, acelerando assim o processo de deterioração (Shewan 1971; Liston 1980; Leitão 1984; Germano et al., 1993; Vieira et al., 2004).

2.4.1 Avaliações dos filés de peixe submetidos ao extrato suco de limão

O extrato de *Citrus aurantifolia* (lima) tem sido amplamente utilizado em vários domicílios como antimicrobiano para algumas bactérias Gram negativas e positivas (Oboh et al., 1995; Adedeji et al., 2007). Hayes e Markovic (2002) observaram ação antimicrobiana do *Citrus lemon* (limão) frente *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* e *Candida albicans*. Foi relatado o uso de diferentes óleos essenciais de plantas e frutos, como o

limão, lima, *Olea europaea* (oliva), cânfora, *Eucalyptus* spp., *Geranium*, por povos de diferentes partes do mundo, com o objetivo de controlar a contaminação bacteriana no filé de peixe (Upadhyay et al., 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo

A área de estudo escolhida foi a Lagoa da Pampulha em Belo Horizonte, no Estado de Minas Gerais. Foram selecionados quatro pontos de coletas de amostragem dos peixes em função do maior movimento e atividade de indivíduos (pescadores) nestes locais.

A figura abaixo exibe a vista aérea do local estudado a partir da imagem acessada do Google Maps em 15 de junho de 2009, na qual são apresentados os pontos de coletas em amarelo, cujas coordenadas foram obtidas por meio de aparelho GPS (Geographic Position System) da marca Garmin modelo Etrex. A saber: Ponto 1: coordenada 19°51'29" S, 43°58'46" W, corresponde à Igreja de São Francisco. O ponto 2 localiza-se na latitude 19°51'17" S e longitude 43°58'27" W, corresponde ao Iate Tênis Clube. O ponto 3 localiza-se na latitude 19°50'46" S e longitude 43°59'55" W, corresponde à Associação Atlética do Banco do Brasil (AABB)/Braúnas, e o ponto quatro localiza-se na latitude 19°51'40" S e longitude 43°58'30" W, corresponde ao Mineirinho. Os pontos de coleta são apresentados na figura 1.

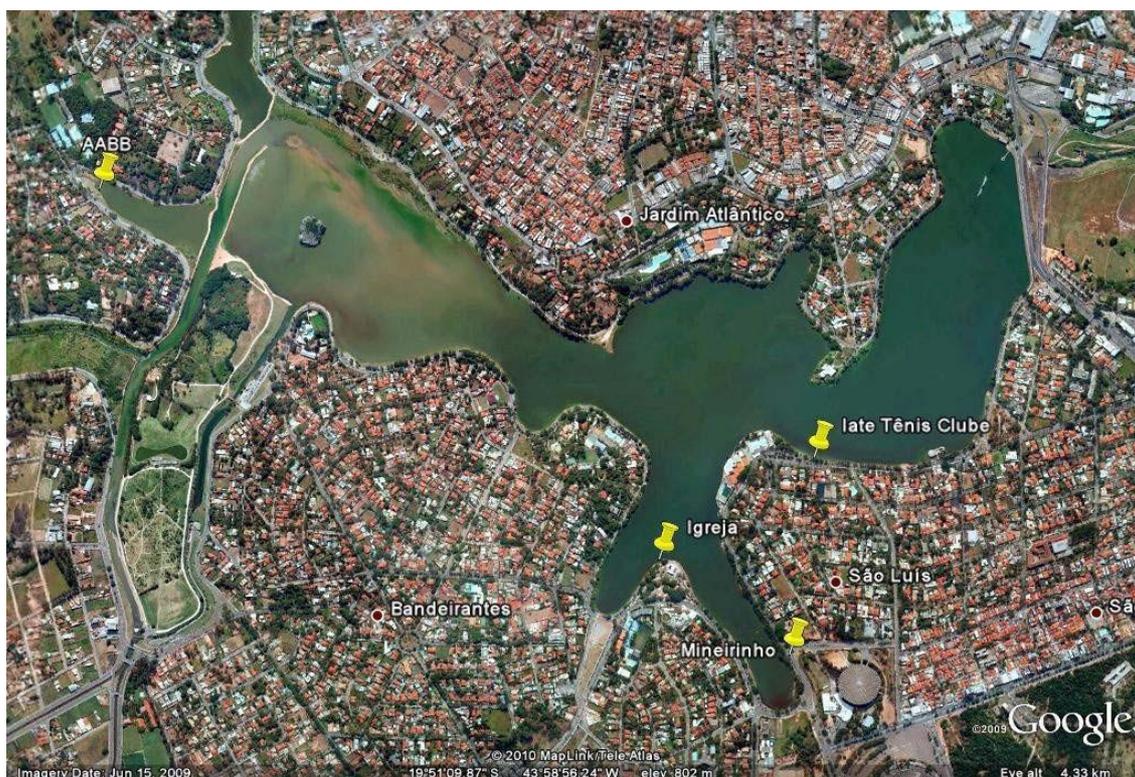


Figura 1: vista aérea superior do local estudado e dos pontos de coletas mostrados em alfinete amarelo.

3.2 Locais de realização das análises bacteriológicas

As análises bacteriológicas foram realizadas no laboratório de Ictiosanidade do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais (DMVP/EV/UFMG).

3.3 Coletas das amostras de água e peixes

A pesquisa foi realizada durante um ciclo hidrológico, ou seja, foram feitas duas coletas de água e peixes na estação seca nos meses de agosto e setembro de 2008, e na estação chuvosa nos meses de fevereiro

e março de 2009. Em cada ponto foram coletados uma amostra de água e três exemplares de peixes. As amostras de água foram coletadas em frascos de vidro estéril e transportadas em caixas isotérmicas com gelo até o laboratório para seu processamento (APHA 2005).

3.4 Amostras de referência

Para realização do experimento foram utilizadas amostras bacterianas de referência (Tab.1) oriundas do *American Type Culture Collection* (ATCC: CDC Atlanta USA), gentilmente cedidas pela Fundação Ezequiel Dias (Funed/MG), pelo Laboratório Central de Referência do Estado de Minas Gerais (LACEN-MG) e pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ).

Tabela 1: amostras bacterianas de referência do ATCC utilizadas.

Espécie bacteriana	Codificação
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25.922
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13.047
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19.433
<i>Salmonella thyphumurium</i>	ATCC 14.028
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 10.666
<i>Edwardsiella tarda</i>	INCQS: 00097 Lote: 0701097 MinistérioSaúde Fiocruz/RJ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13.883
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13.315
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27.853

3.5 Meios de cultura para Análises bacteriológicas da água

Para análise bacteriológica da água foram utilizados os seguintes meios de cultura: caldo lactosado (CL) para o teste presuntivo de coliformes; caldo verde brilhante bile 2% (VB) para o teste confirmatório de coliformes totais; caldo *Escherichia coli* (EC) para o teste confirmatório de coliformes fecais termotolerantes a 45° C; meio Colilert para teste enzimático de coliformes totais e fecais; caldo dextrose azida (CDA) para o teste presuntivo de *Enterococcus* spp.; agar bile-esculina (B-E) para o teste confirmatório de *Enterococcus* spp.; caldo *brain heart infusion* (BHI) com 6,5% cloreto de sódio(NaCl) para o teste confirmatório de *Enterococcus* spp. termotolerantes a 45°C.

3.6 Análises bacteriológicas da água (teste quali-quantitativo)

As amostras foram submetidas à análise bacteriológica quali-quantitativa para avaliação da presença de coliformes totais, coliformes fecais termotolerantes a 45°C e *Enterococcus* spp. segundo o *American Public Health Association* (APHA 2005), por meio da técnica de múltiplos tubos e pelo método qualitativo enzimático de Colilert. Os resultados dos valores de número mais provável (NMP) de bactérias por 100 mL de água analisada foram obtidos por meio da interpretação e cálculo na tabela de Hoskins (com limite de confiança de 95%) segundo APHA (2005), e também por meio da metodologia descrita no *Standard Methods for Water and Wastewater*, com as

seguintes modificações: as amostras de água foram diluídas 1: 100 e 1: 5 em solução salina 0,85% (NaCl) estéril tamponada (V/V), para a pesquisa coliformes totais/fecais e *Enterococcus* respectivamente. Essas diluições foram realizadas em razão da elevada concentração bacteriana presente na água desta lagoa, reveladas pelas análises nos testes pilotos.

3.6.1 Isolamento de coliformes

As amostras de água positivas para presença de coliformes fecais foram semeadas, pela técnica de esgotamento, em Ágar Mac Conkey (MC) ou Ágar Eosine Metile Blue (EMB) e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 18 a 24 horas. Após a incubação, as colônias sugestivas de Enterobacteriaceae, Pseudomonadales e Gram negativas não fermentadoras (GNNF) foram submetidas às provas bioquímicas utilizando o meio preconizado pelo Instituto Adolf Lutz (IAL), segundo (Rugai e Araújo, 1968) modificado por Pessôa e Silva, (1972).

3.6.2 Isolamento de *Enterococcus*

Para o isolamento de *Enterococcus* spp. foi utilizada a metodologia da técnica dos Tubos Múltiplos para a determinação do NMP/100mL de água analisada (APHA, 2005), e também desafiados a termotolerância a 45°C em caldo BHI com 6,5% NaCl. As amostras de água positivas para *Enterococcus* spp. foram semeadas em ágar Mueller Hinton (MH) e incubadas

em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Colônias características foram coradas pelo método do Gram e submetidas ao teste da catalase e citocromo oxidase, e também as provas bioquímicas conforme APHA (2005).

3.6.3 Padrões microbiológicos de referência de água

Os valores padrão de balneabilidade em água para recreação segundo COPAM (1986) para a presença de coliformes totais é de até 5000 NMP/100 mL e para coliformes fecais termotolerantes é de até 1000 NMP/100 mL. Valores encontrados acima de 1000 NMP/100 mL para coliformes fecais classificam a água como imprópria. Para *Enterococcus*, segundo CONAMA (2001) o valor padrão é até 400 NMP/100 mL. Os valores de NMP/100 mL para a água ser considerada potável deverá ser igual a zero.

3.7 Análises bacteriológicas dos peixes

Dos peixes foram coletados tegumentos superficiais através da zaragatoa, após serem anestesiados e eutanasiados por choque térmico em contato com gelo, dentro de caixa de isopor. Após a sedação, coletou-se arcos branquiais para o isolamento de *Flavobacterium* spp., *Salmonella* spp. e *Aeromonas* spp. Após a coleta, o espécime foi acondicionado em saco plástico em isopor com gelo e enviado ao laboratório de Ictiossanimidade, onde era dissecado em capela de fluxo laminar para coleta de amostras de músculo, rim e conteúdo intestinal para a pesquisa de Enterobacteriaceae, Pseudomonadales, *Aeromonas* e GNNF, e do sistema nervoso central (SNC) para *Streptococcus* spp. (Noga 1996).

3.7.1 Pesquisa de Enterobacteriaceae, *Salmonella* e GNNF

As amostras de brânquias, músculo, rim e conteúdo intestinal foram processadas de acordo com a metodologia empregada do fluxograma descrito por Hofer, (2006); e

com os protocolos e esquemas de isolamento propostos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001 e BRASIL, 2001).

As colônias obtidas como típicas H₂S positivas e lactose (Lac) negativas suspeitas para o gênero *Salmonella*, e as atípicas (H₂S negativa e Lac positiva) da família Enterobacteriaceae foram submetidas a provas bioquímicas e outras provas complementares para identificação conforme descrito por Hofer (2006). As amostras classificadas como GNNF foram identificadas segundo metodologia proposta por Schreckenberger CDC modificado (2000).

3.7.2 Pesquisa de *Aeromonas* spp.

As amostras de brânquia, músculo, rim e fêzes foram previamente inoculadas em caldo BHI e incubadas em estufa bacteriológica a 28-30°C por 24 horas. Após este primeiro passo foram estriadas em meio ADE (Ágar ampicilina, dextrina e etanol) com alta impedância, o que é indicado para amostras de fontes de água poluídas por esgoto, minimizando assim a microbiota competitiva (Imzilen et al., 1997), e incubadas em estufa bacteriológica a 28-30°C por até 24 horas. Depois de 18 a 24 horas de crescimento, as colônias típicas amarelas, com fermentação da dextrina, e crescimento contínuo no indúlio bacteriano (CCIB) foram repicadas em ágar MH. Esse repique foi realizado para poder ser posteriormente proceder a análise da oxidase, teste da catalase, avaliação morfo-tintorial do Gram, inoculação em meio OF (oxidation-fermentation, metabolismo oxidante e/ou fermentativo), SIM (produção de H₂S, indol e motilidade), IAL, LIA (Lisina Iron Agar), TSI (Triple Sugar Iron) e alguns carboidratos (Hugh e Leifson, 1953; Krieg, 1984; Imzilen et al., 1997; Janda e Abbott, 2010).

3.7.3 Pesquisa de *Flavobacterium* spp.

A coleta de amostras de superfície foi obtida com swabe (swab), acompanhando a linha lateral anatômica e nas reentrâncias das

nadadeiras, logo após a retirada dos peixes da lagoa. Fragmentos de lamelas brânquiais foram dissecados, após sedação e eutanásia do animal, e inoculados em caldo BHI, incubado em estufa bacteriológica à 27°C por 24 horas. Posteriormente foram realizados repiques em placas contendo Ágar Cytofaga e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. As colônias típicas foram submetidas à análise morfo-tintorial pelo Gram e testes bioquímicos padrões segundo Griffin (1992), Shamsudin e Plumb (1996) e Decostere, (1998).

3.7.4 Pesquisa de *Streptococcus* spp.

As amostras de SNC foram maceradas com bastão de vidro estéril, semeados em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo dextrose azida, e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 a 72 horas. Posteriormente foram realizados repiques em placas contendo ágar sangue azida sódica, e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. As colônias características foram submetidas a provas confirmatórias de característica morfo-tintorial de Gram, avaliação da presença ou ausência de hemólise em ágar sangue, teste catalase e oxidase, teste de Camp, hidrólise da esculina, crescimento em ágar Mac Conkey e teste de O.F. com utilização da D-glicose segundo (Goh et al., 1998; Dodson et al., 1999; Russo et al., 2006).

3.8 Análise bacteriológica dos filés de peixe

3.8.1 Preparação dos filés de peixe

Os peixes foram adquiridos no momento da pesca e levados ao laboratório de Ictiosanidade após coleta de brânquias e tegumentos, acondicionados em recipientes próprios sob refrigeração. No laboratório, em capela de fluxo laminar, os peixes foram submetidos à assepsia da pele com gaze estéril embebida em álcool 70% e iodo 0,5%(v/v) Os filés foram removidos assepticamente, através uma incisão no dorso posterior no sentido crânio-caudal para a retirada da carne, sem perfurar a

cavidade celomática, para evitar contaminação do músculo com conteúdo do trato digestivo. Do material coletado, foram pesados 25 gramas em balança analítica dentro da cabine de fluxo laminar, para garantir a assepsia (Vieira et al., 2004; ANVISA, 2001; Sallam, 2007).

3.8.1.1 Tratamento com Extrato de limão

Limão do tipo branco ou galego (*Citrus limon*) foi coletado na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, pertencente à EV/UFMG e levados ao laboratório, onde foram lavados em água clorada e as superfícies higienizadas com álcool 70% (v/v) iodado 0,5% e enxaguados com água destilada estéril. Foram cortados no seu diâmetro com lâminas de bisturi estéreis e o extrato obtido por esmagamento e acondicionado em becker estéril.

Utilizaram-se amostras de filé de peixe em duplicatas, do um mesmo exemplar, sendo uma tratada com extrato de limão (pH 4,0) por 20 minutos e outra mantida sem tratamento. Toda análise bacteriológica para a pesquisa de *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., Enterobacteriaceae e GNNF foi realizada segundo a metodologia proposta pela ANVISA (2001) e MAPA (2003). Os protocolos seguidos neste estudo, “*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods*” e o “*Bacteriological Analytical Manual*” foram empregados de acordo com as exigências da legislação brasileira para exames microbiológicos de alimentos (ANVISA, 2001).

Para pesquisa, do isolamento específico de *Salmonella* spp. e Enterobacteriaceae foi utilizada a técnica descrita por Hofer (2006), que consiste em se colocar os 25 gramas de filé em 100 mL de meio de cultura para pré enriquecimento da amostra com solução salina com 0,85% NaCl Peptonada 1% e Tamponada, homogeneizando por um minuto e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do exame bacteriológico da água, dos quatro pontos estudados na

lagoa da Pampulha, ao longo das duas estações seca e chuva 2008/2009, respectivamente estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2: resultados do exame bacteriológico da água da Lagoa da Pampulha coletados em quatro pontos, no período de seca e chuva, em 2008 e 2009.

Pontos de coletas	Coliformes Totais (NMP/100 mL X 1000)		Coliformes Fecais Termotolerantes 45°C (NMP/100mL x1000)		Colilert Coliformes Totais		Colilert Coliformes Fecais		<i>Enterococcus</i> spp. (NMP/100 mL)	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
01	18,0	12,0	9,5	6,5	+	+	+	+	160	95
02	35,0	35,0	2,3	2,1	+	+	+	+	1.400	1.200
03	7,0	7,9	7,0	0,0	+	+	+	+	280	160
04	13,0	17,0	1,1	1,1	+	+	+	+	4.400	850

* Estação seca: agosto e setembro de 2008(1); estação chuvosa: fevereiro e março 2009(2).

Os resultados bacteriológicos obtidos com as amostras de água coletadas nos pontos um, dois, três e quatro nos anos de 2008/2009, como pode ser visto na tabela 2 foram superiores aos níveis mínimos de coliformes totais e coliformes fecais termotolerantes 45°C, estabelecidos pelas portarias do Ministério da Saúde Nº 518/2004, APHA 2005, Copam Nº 010/1986, e Conama Nº 020/2001, para que uma água esteja dentro dos padrões de potabilidade e balneabilidade.

Pode-se observar na tabela 2 que os valores médios de coliformes totais no período foram de 15.000 NMP/100 mL valor este três vezes superior ao estabelecido pelas portarias, que é de 5.000 NMP/100mL. Já os valores de coliformes fecais termotolerantes a 45°C, em quase todos os pontos de coleta, foram acima de 1.000 NMP/100 mL que é o valor máximo permitido pela legislação. Entretanto, no ponto de coleta três não foi detectado coliformes fecais termotolerantes a 45°C, no período das chuvas, possivelmente pela presença de nascentes, que não estão contaminadas por ação antropica. Já no período da seca, o número de coliformes fecais termotolerantes a 45°C foi de 7.000 NMP/100 mL, superior ao nível máximo exigido, classificando a água da lagoa da Pampulha como imprópria para recreação. Em ambas as estações estudadas foram

encontrados valores elevados de coliformes, embora na estação chuvosa, os valores de NMP/100 mL entre (900 a 6000) encontrados tenham sido mais baixos, porém não significativos ($p > 0,05$).

Os testes enzimáticos para pesquisa qualitativa para coliformes totais e fecais termotolerantes a 45°C apresentaram correlação positiva com os testes quali- quantitativos, podendo ser utilizados como teste de triagem, na avaliação de coleção de águas quanto à potabilidade e balneabilidade, o que está de acordo com os trabalhos de Trepeta e Edberg, (1984); Rice et al. (1990); Eckner (1998).

Quanto ao teste quantitativo para *Enterococcus* spp. pode-se observar na tabela 2, que os níveis de contaminação nos pontos de coleta um e três, apresentaram valores médios no período de coleta de 128 e 220 NMP/100 mL, respectivamente, valores inferiores a 400 NMP/100 mL exigido pela legislação. Nos outros dois pontos de coleta (dois e quatro) os valores médios foram de 1962 NMP/100 mL de *Enterococcus* spp., superior ao nível mínimo exigido. Apesar dos valores de *Enterococcus* spp. encontrados nos pontos um e três de coleta, serem inferiores aos valores estabelecidos pela legislação, pode-se observar na tabela 2 que os valores de coliformes totais e fecais termotolerantes

45°C inviabilizam a utilização da água da Lagoa da Pampulha para recreação. A água dos pontos dois e quatro nos períodos seco e chuvoso demonstraram altas concentrações de *Enterococcus* spp., caracterizando-se como impróprias para banho, e no período da seca apresentaram níveis mais acentuados de contaminação que no período chuvoso. Quando existem altos índices de *Enterococcus* spp. como os valores encontrados neste trabalho, surge uma preocupação do ponto de vista da saúde pública, por haver uma associação direta destes altos índices e a contaminação de humanos após contato com esse tipo de água, como descrito por Pruss (1998).

Os valores encontrados neste trabalho estão de acordo com os levantamentos feitos por Souza e Gomes (2007), que obtiveram os resultados das análises de coliformes fecais realizados nas amostras de águas coletadas, na lagoa da Pampulha, nos córregos Água Funda, Braúnas, AABB, Olhos D'Água, Sarandi, Tijuco, Mergulhão e Vertedouro, todos com valores acima de 25.000 UFC/100 mL, desta forma com esses níveis de coliformes fecais não estão de acordo com os limites de aceitação do CONAMA, ou seja, imprópria para utilização, com esses elevados valores de bactérias presente nas águas, as quais são um grande risco para saúde das pessoas que ali frequentam.

Questões relativas ao impacto ambiental e à saúde pública são os principais fatores associados à transmissão de bactérias multirresistentes, segundo Murray (1998); McEwen e Fedorka-Cray (2002); Weber e Rutala (1997). O que é de se preocupar sob o ponto de vista de saúde pública, devidos aos riscos sanitários com a qualidade bacteriológica da água da lagoa da Pampulha com os valores de *Enterococcus* spp. encontrados, tornando-a imprópria para o consumo, pela presença deste microrganismo, oriundo de contaminação fecal dos esgotos domésticos, industrial e hospitalar que são lançados nesta lagoa.

A partir dos tubos onde houve crescimento de Coliformes Fecais Termotolerantes 45°C, foram obtidos isolados, onde foram identificadas as seguintes espécies/gêneros

de Enterobacteriaceae: *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Citrobacter* spp. todas da família das Enterobacteriaceae. Foram também identificados bactérias do grupo GNNF, como *Alcaligenes faecalis* e *Pseudomonas* spp. Em nenhuma das amostras de água trabalhada foram obtidos isolados de *Salmonella* spp.

Identificar enteropatógenos é um importante indicador epidemiológico, que demonstram indiretamente a possibilidade de ocorrência de doenças de veiculação hídrica na população e põe em risco sanitário aqueles que alimentam de animais oriundos de água com este tipo de contaminação microbiológica (Braz et al., 1999; Azevedo, 2001; Serra et al., 2003). Os coliformes totais e fecais termotolerantes são amplamente usados como indicadores de contaminação fecal para determinar a qualidade de água, o fato de estes microrganismos serem habitantes da microbiota intestinal, possibilitaria determinar a origem fecal da contaminação da água, seja de animal de sangue quente denominados homeotérmicos e/ou pecilotérmicos (Bordalo, 1993; Allen e Edberg, 1995; Bordalo, 2002; APHA, 2005). Embora, *Escherichia coli*, por sua alta resistência, possa estar presente na água e haver origem fecal direta, o isolamento de outras

Enterobacteriaceae como *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. e outros gêneros encontrados, suportam uma poluição fecal na água (Quinn et al., 1994). Dentre as amostras de coliformes fecais encontradas, todas foram identificadas como *Escherichia coli* sendo este agente, reconhecido como a principal bactéria indicadora de contaminação fecal em água para consumo, esgoto, água para recreação e aquicultura (Murray et al., 2007; Chou, 2004; Allen e Edberg, 1995; APHA, 2005).

Este achado permite inferir que o alto nível de contaminação da Lagoa, está relacionado ao despejo de esgoto residencial em suas águas, tornando-a imprópria as atividades de recreação e pesca.

Outra bactéria sugerida como indicador padrão de balneabilidade para água de

recreação, é a *Pseudomonas* spp., tendo associação à doenças relacionadas com a prática da natação, sendo inclusive resistente à cloração, motivo pelo qual são sugeridas como indicadoras de qualidade para água de lazer e recreação. São indicadores primários da contaminação da água por animais de estimação, roedores, água de riacho e fontes humanas. Este microorganismo pode ser um patógeno humano, “oportunista” e tem a capacidade de se multiplicar em água de recreação na presença de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio (APHA, 2000, 2005). O índice de isolamento de *Pseudomonas* spp. foi muito maior do que de outras enterobactérias o que não era de se esperar, segundo descrição no manual de análise de água do Guidelines for... (2002). Reforçando a importância deste experimento em relação à saúde pública, por se tratar de um agente oportunista.

As implicações da qualidade microbiológica da água são diretas sobre a saúde dos organismos aquáticos. Sabe-se que os peixes da Lagoa da Pampulha, apesar da proibição da pesca, são utilizados como alimento por uma significativa parte da população local de baixa renda, representando um alto risco de toxinfecção alimentar. A grande diversidade e carga bacteriana de coliformes encontrados nas águas da lagoa em todos os pontos e épocas estudadas podem estar relacionadas ao não isolamento de *Salmonella* spp. nas amostras de água, em razão do antagonismo entre patógenos entéricos como *Escherichia coli* e *Proteus* spp., que produzem colicinas, que são substâncias inibidoras com ação bactericida para o crescimento das *Salmonellae*, incluindo as espécies de *S. tennessee*, *S. newport*, *S. enteritidis* e *S. schottmuelleri* (paratifo B) e *Shigella* spp., fato também observado por Frederic e Levine, (1947), Levine e Tanimoto (1954).

Foram capturadas nos quatro pontos de coleta as seguintes espécies de peixes: Tilápias *Oreochromis* spp. (Linnaeus, 1758) (PISCES: CICHLIDAE) Aphia ID: 313195, Tucunaré *Cichla ocellaris* (Bloch & Schneider, 1801) (PISCES: CICHLIDAE) Aphia ID: 280183 e Acará ou Cará

Geophagus brasiliensis (Quoy & Gaimard, 1824) (PISCES: CICHLIDAE) Aphia ID: 280831, segundo International Code Zoological Nomenclature (ICZN) segundo WORMS.

Os peixes estudados eram de aspecto saudável, embora altamente contaminados. Uma observação direta do estudo é a aparente falta de associação dessas bactérias com fatores mórbidos em peixes. Entretanto, os resultados bacteriológicos são de relevância tendo em vista que ausência de sinais indicativos de doenças, nenhuma medida será tomada para a sua condenação. Estes poderão ser fonte para toxinfecções alimentares. O risco sanitário é potencial e direto às populações que os consomem, e amplificável para pessoas em coabitação, onde haja deficiências nas condições de higiene.

Os resultados de isolamento bacteriológico na pele dos peixes (linha lateral e bordas das nadadeiras) revelam a presença em 100,00% das amostras trabalhadas de *Flavobacterium* spp., entretanto, em nenhum dos espécimes foi observado alterações anatomopatológicas e clínicas sugestivas da infecção por este agente. Epidemiologicamente é sabido que todas as espécies de peixes são sensíveis à infecção por alguma espécie da família Flavobacteriaceae, acometendo principalmente brânquias, superfície da pele e nadadeiras (Shotts e Starliper, 1999).

Na tentativa de isolamento bacteriológico no SNC para *Streptococcus* spp., apenas um (4,17%) dos peixes estudados apresentou-se positivo. Em nenhum dos espécimes foram observadas alterações comportamentais, assim como não foram observados animais moribundos (incoordenação motora). Isso é preocupante sob o ponto de vista dos manipuladores desses peixes, que podem se contaminar por essa zoonose, tendo em vista que certos espécimes de peixes podem não aparentar sintomatologia.

Os resultados dos isolados dos pescados em relação às brânquias, fezes, rim e filé por família de bactérias são apresentados na figura 2

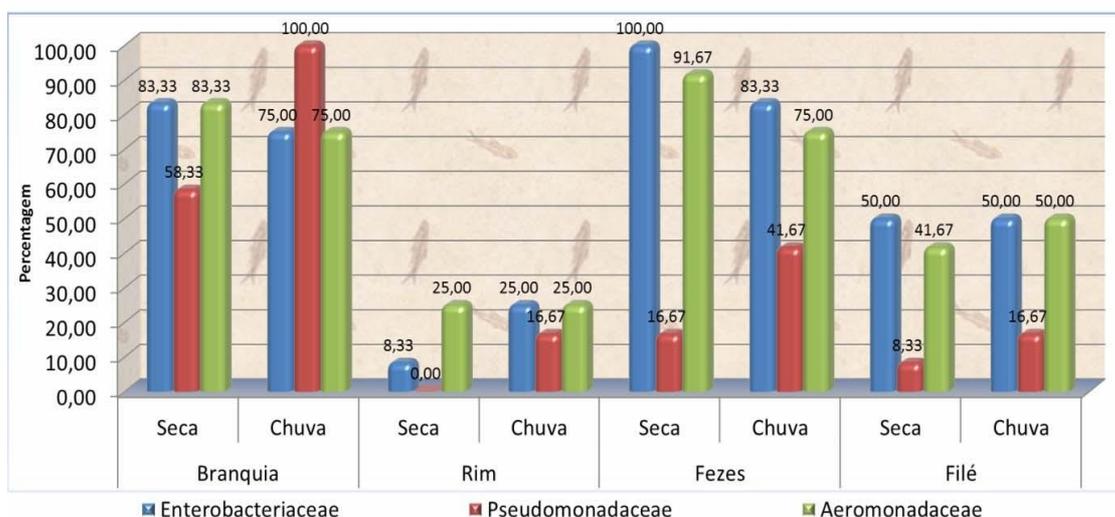


Figura 2: Distribuição de três famílias de bactérias em percentagem em órgãos e fezes de peixes da Lagoa da Pampulha nos períodos de seca e chuva nos anos de 2008/2009, respectivamente.

De acordo com os resultados encontrados na figura 2, pode ser observado que as Enterobacteriaceae foram isoladas com maior frequência das brânquias, fezes e filé, nos dois períodos estudados, existindo uma forte correlação com os isolados da água da lagoa da Pampulha.

Quanto a família da Pseudomonadaceae pode ser observado que a frequência de isolados foi maior nas brânquias no período das chuvas, este fato pode estar relacionado com a maior concentração de oxigênio na água, que é um fator limitante para sua multiplicação. Os isolados da família Aeromonadaceae foram encontrados em grandes quantidades nas brânquias, fezes e filé, em razão da alta taxa de contaminação da lagoa por efluentes domésticos, que apresentam níveis elevados de matéria orgânica, ricos em N_2 , Na e K, que favorecem a multiplicação

destes microrganismos como observado por Janda e Abbott (2010).

Em todos os órgãos e nas amostras dos filés dos peixes estudados foram encontrados coliformes fecais e *Aeromonas* spp., o que reforça o reflexo da microbiota da água e a diversidade bacteriana presentes nos peixes (Markosova e Jezek, 1994; Davis et al., 1995; Nayak; 2010; Janda e Abbott, 2010). O que demonstra a necessidade da avaliação microbiológica para o gênero *Aeromonas* dos organismos aquáticos quando são destinados para consumo, por oferecerem grandes riscos, presentes nos alimentos, oriundos de exposições constantes em ambientes aquáticos contaminados por água de esgoto.

Os resultados dos isolados por espécies das diferentes famílias estudadas, são apresentados nas figuras 3, 4, 5 e 6.

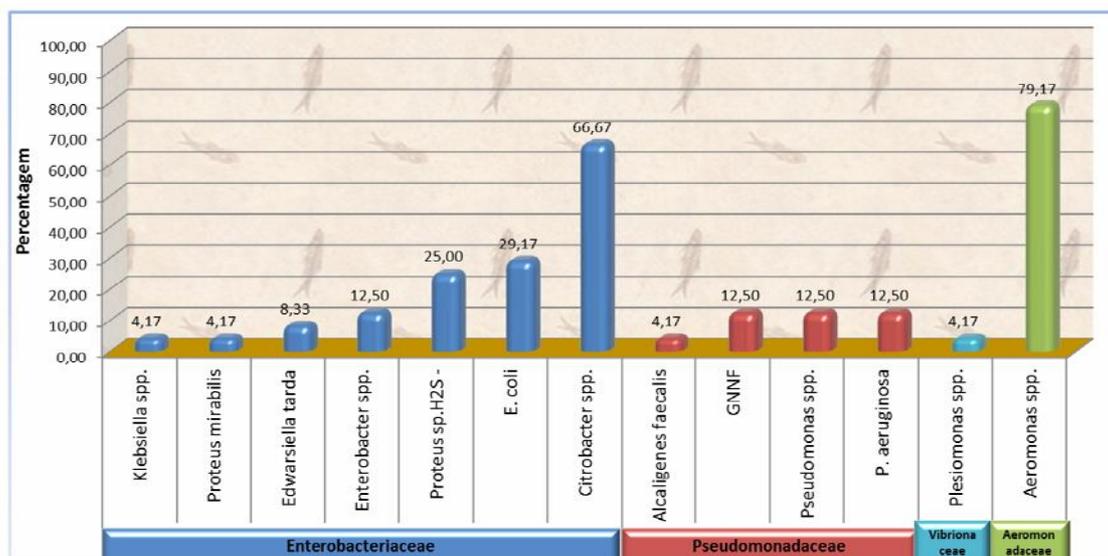


Figura 3: Distribuição de bactérias isoladas em percentagem nas fezes de peixes da Lagoa da Pampulha, no período de seca e chuva nos anos de 2008 e 2009.

Como pode ser visto na figura 3, existe uma correlação entre os agentes bacterianos identificados na água e dos agentes encontrados nas fezes analisadas.

Da família Enterobacteriaceae foram isoladas *Citrobacter* (66,67%) e *Escherichia coli* (29,17%) do grupo dos coliformes fecais termotolerantes, nas amostras das fezes. Estes dados confirmam a relação dos dois gêneros com a ocorrência de isolados dos coliformes fecais. Porém, estes resultados contradizem estudos anteriores realizados por APHA, 1992, 2000. e 2005, que cita a presença, de *Citrobacter* spp., mas em baixa densidade em relação à população de *Escherichia coli*, a qual representa 95,00% dos isolados no grupo dos coliformes, segundo Dufour (1977).

Nas fezes foi de 12,50% para a espécie *P. aeruginosa* e 25,00% para o gênero *Pseudomonas*, o que superou muitos gêneros da família Enterobacteriaceae do grupo dos coliformes, só não superando os gêneros *Proteus* spp. H₂S⁻ também 25,0% de isolamento, *Escherichia coli* com 29,17% e *Citrobacter* spp. 66,67%.

Os isolados das diferentes espécies/gêneros nas famílias estudadas

assim como as Enterobacteriaceae, encontrando num total de sete gêneros, os achados de Pseudomonadales, como *Pseudomonas*, GNNF e *Alcaligenes faecalis*, *Plesiomonas shigelloides* e *Aeromonas* spp. são bactérias presentes na colonização do trato gastro intestinal de peixes, o que está de acordo com a última revisão microbiota gastrointestinal em peixes de Nayak (2010). A grande taxa de microrganismos de ambientes aquáticos, do solo, e dos sedimentos são bactérias colonizadoras do trato gastrointestinal de peixes de água doce e marinha.

Os resultados revelaram o isolamento de 19 (79,17%) dos 24 peixes desta pesquisa com *Aeromonas* spp. nas fezes, o encontro elevados dessa bactéria confirma as observações de outros autores, destacando a ocorrência bastante freqüente de membros deste gênero no ambiente aquático, principalmente em água doce, compondo a microbiota normal de peixes, anfíbios e répteis, ou como agentes de doenças de acordo com Janda e Abbott (2010), e cargas altas desse microrganismo presentes põe em risco o ambiente para os animais ali presente CDC, (1990). Vários estudos têm demonstrado que a concentração de *Aeromonas* spp. é

fortemente correlacionada com a temperatura e excesso de matéria orgânica, sobrecargas ambientais, concentrações elevadas de metais pesados e alta densidade de população no ambiente natural (Rippey e Cabelli, 1980; Imzilin et al.,1997).

Como pode ser visto na figura 4, existe uma correlação entre os agentes bacterianos estudados na água e dos agentes encontrados nas brânquias analisadas.

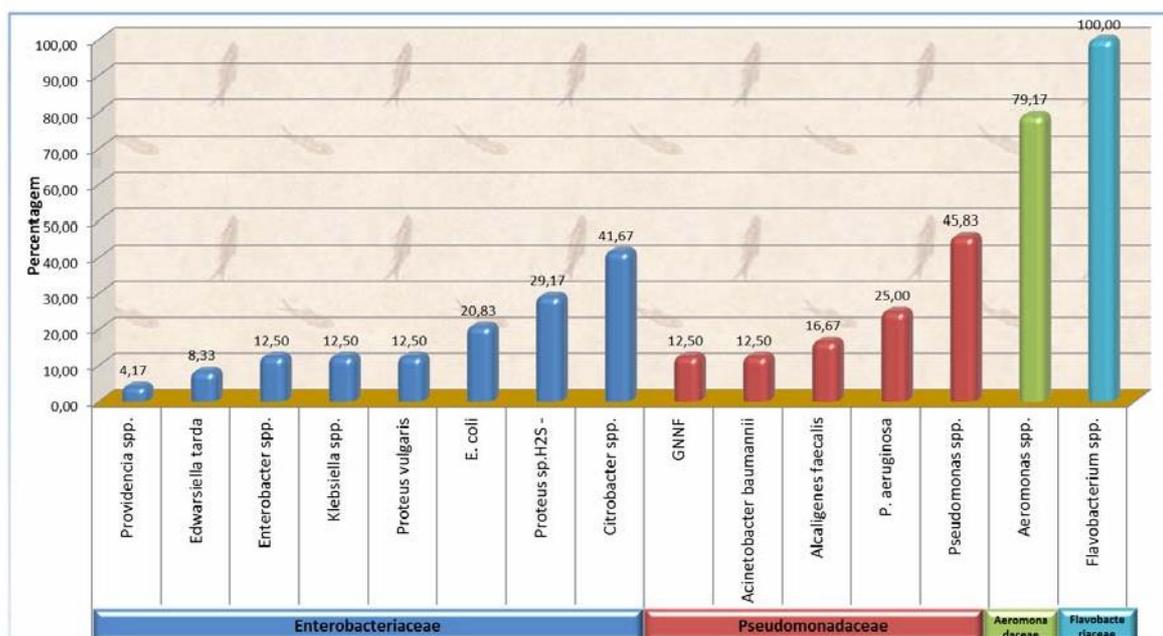


Figura 4: Distribuição de bactérias isoladas nas brânquias de peixes da Lagoa da Pampulha, no período de seca e chuva nos anos de 2008 e 2009.

Nas amostras de brânquias estudadas na família Enterobacteriaceae foram encontrados com as maiores frequências as espécies/gêneros: *Citrobacter* spp. 41,67% *Proteus* spp. H₂S (-) 29,17% e *E. coli* 20,83%. A maioria dos dados encontrados na literatura, destaca *E. coli* com valores bastante elevado em termos percentuais quando comparado aos outros gêneros desta mesma família. Neste trabalho foi observado um predomínio de outros gêneros do grupo dos coliformes, como *Citrobacter* spp. e *Proteus* spp., o que contraria com dados obtidos por Dufour, 1977 e APHA, 2005, em que *Escherichia coli* sempre representa o maior número de achados dentre dos coliformes.

Esses resultados mostram que as brânquias e intestinos apresentam maior diversidade de coliformes fecais. Isso pode ser devido ao fato de que as brânquias estão diretamente em contato com a água, e o intestino por ser o habitat de bactérias entéricas. Trabalho semelhante foi feito no Egito por El-Shafai et al. (2004), onde encontraram maiores contaminações bacteriológica por coliformes primeiro no intestino, em segundo nas brânquias, em terceiro na superfície, e em quarto no fígado. O que corrobora com os valores encontrados das altas contaminações das brânquias nos peixes da lagoa da Pampulha, se assemelha aos estudos de El-Shafai et al. (2004), em comparação com a superfície da pele, podem ser atribuídas

para a estrutura das brânquias, que tem grande superfície de área para o ataque bacteriano, e alta taxa de circulação na passagem de água, durante a filtração e hematose.

Os resultados da ocorrência de *Escherichia coli* nas brânquias e vísceras dos peixes pesquisados reflete os níveis de poluição causados por outros animais e/ou humanos (Muratori, 2000), (Muratori et al., 2000; 2004) desta lagoa, e está entre as principais responsáveis por infecções do trato urinário, diarreias e relacionadas a septicemia e meningite, demonstrando os riscos em alimentar destes pescados da lagoa, e também os perigos da transmissão cruzada de organismos veiculados por mãos e facas aos outros alimentos crus e também aos cozidos (Jay, 2005).

Do total das brânquias estudadas dos peixes, 12,0% desses órgãos estavam infectados com *Acinetobacter baumannii*, o que é de se preocupar devido o contato e manuseio com esses animais, durante a pesca tendo em vista nos tempos atuais esse GNNF é um dos destaques em infecções oportunistas nosocomiais para o homem, causando pneumonia, septicemia, meningite e óbitos em seres humanos, e dificuldades com a eficácia na antibiótica terapia, já demonstrando muita resistência aos fármacos (Schreckenberger e Graevenitz, 1999; Evans et al., 2002; Vieira et al., 2004).

A frequência de isolamentos de *Pseudomonas aeruginosa* foi de 25% para essa espécie, e 45,83% para o gênero

Pseudomonas do total dos isolados nas brânquias, comparando com todas as figuras dos resultados com os respectivos órgãos estudados, uma das possíveis explicações para os valores mais altos nesse órgão, talvez seja devido ao fato dessa bactéria, ser aeróbia, e não sobreviver em condições precárias de oxigênio, predominantemente mais comum ser encontrada na lamina d'água devido à maior oxigenação presente na superfície da água dos lagos, oferecendo melhores condições de sobrevivência e manutenção dessa bactéria, o que demonstra esse órgão estudado um excelente micro-habitat para as condições de oxigenação necessárias.

Nesta pesquisa, foram encontrados em 79,17% *Aeromonas* spp. das brânquias dos peixes estudados. Esse microrganismo que é comumente encontrado em água com altas cargas de poluições por esgoto como no caso desta lagoa estudada, esses animais estão expostos a muitas doenças subagudas como variedades crônicas em peixes mais velhos, como letargia, exoftalmia, hemorragia nos músculo e órgãos internos nas Tilápias e varais outras espécies de peixes, segundo Janda e Abbott (2010).

Flavobacterium spp. foram encontradas em 100,00 % das brânquias dos peixe, isso demonstra a grande susceptibilidade para infecções dérmicas e lesões como úlceras nas bordas das nadadeiras, tendo em vista que todos os peixes foram positivos, leva a crer que há grande contaminação também na água da lagoa (Decostere et al., 1998 e 1999).

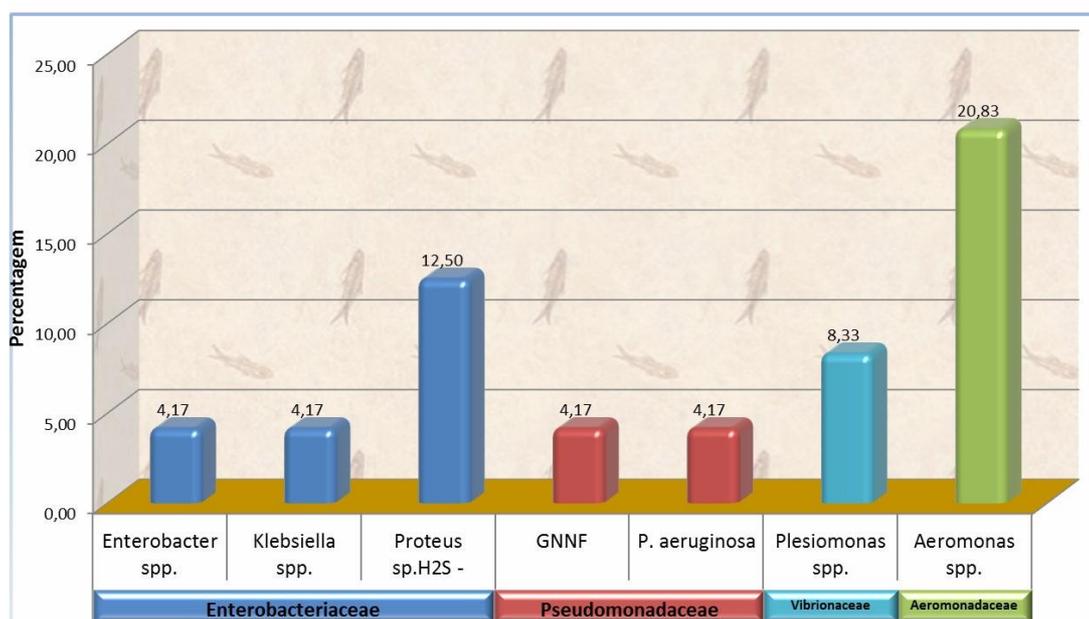


Figura 5: Distribuição de bactérias isoladas no rim de peixes da Lagoa da Pampulha, no período de seca e chuva nos anos de 2008 e 2009.

Como pode ser visto na figura 5, existe uma correlação entre os agentes bacterianos estudados na água e dos agentes encontrados nos rins analisados, pois os achados com maior frequência como *Aeromonas* spp. 20,83%, *Proteus* spp. 12,50% e *Plesiomonas* de 8,33% nos remetem a forte pressão da grande carga bacteriana presente nesse ecossistema aquático dessa lagoa, em ultrapassar barreiras de defesa desses peixes, por essas bactérias estarem presente nesse órgão, o que não é de se esperar, e coloca em risco a sanidade dos mesmos.

De acordo com Guzmán et al. (2004), bactérias penetram no organismo do peixe em concentrações críticas de 10^3 UFC/100 mL na água, possibilitando maiores chances de invasão no animal, o que neste estudo foi observado, com a presença de agentes bacterianos nos órgãos estudados e também no rim, devidos aos valores altos de microrganismos bioindicadores para a qualidade da água que foram encontrados, e sete espécies diferentes de bactérias encontradas nos rins, explicando as

correlações da saúde do peixe com a água que habita, no ambiente aquático poluído.

A taxa de isolamento de *Plesiomonas shigelloides* de 8,33% nos peixes da lagoa da Pampulha foi semelhante ao encontrado por Canabarro (1991), que trabalhando com amostras de peixes de várias espécies encontrou 12,93% de animais infectados com bactérias dessa espécie, no estado do Rio Grande do Sul, sendo um microrganismo normalmente encontrado na água, no organismo de peixes e aves.

Com os maiores achados nas amostras dos rins pesquisados, foram de 20,83%, para espécies de *Aeromonas* spp., o que somente esse microrganismo ou como co-patógenos pode gerar invasão secundária para infecções iniciadas por questão do meio ambiente com muita presença da mesma, portanto em vista desse órgão estudado atingido por essa bactéria, colocam esses peixes desta lagoa expostos a riscos para a sanidade dos mesmos, segundo Janda e Abbott (2010).

A figura 6 demonstra a distribuição das diferentes espécies/gêneros de bactérias encontradas durante as duas estações

(seca e chuva) de todos os filés dos peixes analisados.

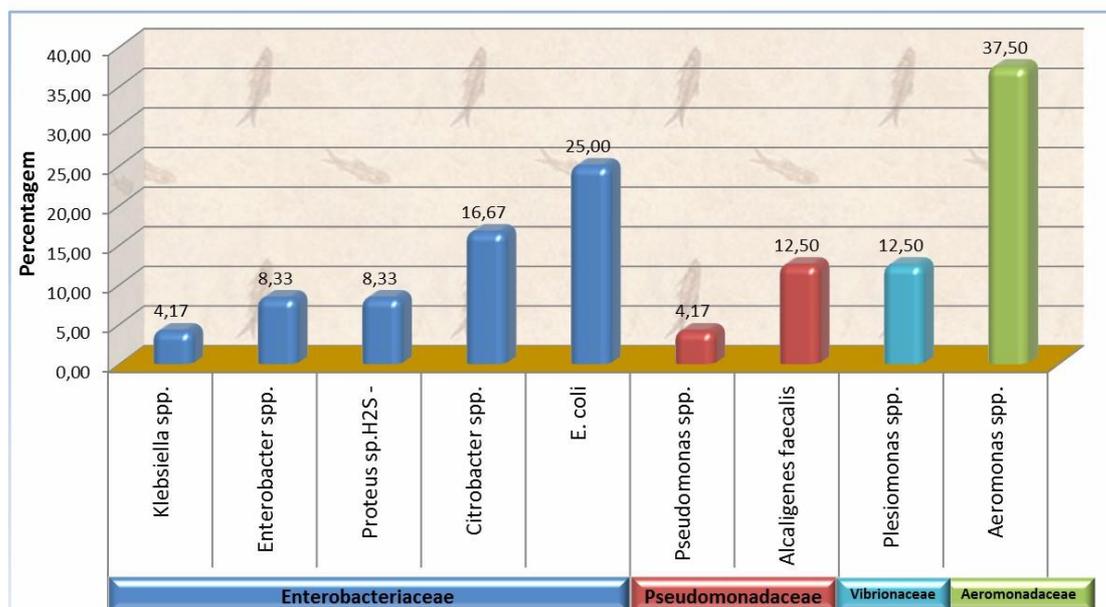


Figura 6: Distribuição de isolados nos filés dos peixes da Lagoa da Pampulha nos períodos seca e chuvoso nos anos de 2008/2009.

Como pode ser observado no gráfico da figura 6, há uma grande diversidade de espécies/gêneros de bactérias do grupo dos coliformes fecais encontradas nos filés, dos quais o maior percentual é *Escherichia coli*, causadoras de infecções alimentares. Entre as enterobactérias mais frequentes encontradas, além de *Escherichia coli* com 25,00%, destacam-se os isolados do gênero *Citrobacter* spp. com 16,67%. Os resultados encontrados foram similares aos estudos anteriores que citam a presença, de *Escherichia coli* em maior concentração quando comparado aos valores de *Citrobacter* spp. (APHA, 2000 e 2005 e Dufour, 1977). A ocorrência desses enteropatógenos nos espécimes analisados compromete a qualidade destes pescados, necessitando que sejam preconizadas medidas e procedimentos que minimizem estes riscos para o consumo.

Nos filés, o gênero *Aeromonas* spp. está presente em maior frequência 37,50%, que

os coliformes fecais. Estes agentes podem causar infecções aos consumidores dos pescados desta lagoa, como gastroenterites e várias outras síndromes (Veira et al., 2004; Hofer et al., 2006; Janda e Abbott, 1996, 2010). Entretanto não fazem parte dos agentes bacterianos indicadores da poluição de águas estabelecidos pela legislação vigente.

Os resultados do isolamento de *Escherichia coli* e *Aeromonas* spp. nos filés de trabalho foram semelhantes aos encontrados por Ogbondeminu e Okoye (1992), que avaliaram a qualidade microbiana de peixes mantidos em tanques com águas residuárias não tratadas e apresentaram contaminação do músculo, por coliformes fecais e *Enterococcus* spp. mesmo quando o NMP foi inferior a 10^4 UFC/100 mL. Outros pesquisadores como Hejkal et al. (1983) e Fatal et al., (1993) também encontraram resultados similares à contaminação por Enterobacteriaceae nos músculos de

pescados criadas nas mesmas condições deste trabalho.

A contaminação dos músculos por *Aeromonas* spp. põe em risco o consumo e a manipulação dos pescados, podendo ocasionar uma variedade de síndromes em humanos, como gastroenterites, diarreia, problemas intra abdominais, infecções oculares, trato respiratório e urogenital, septicemia, como relatado por diversos pesquisadores (Janda e Abbott, 1996; Vieira et al., 2004; Janda e Abbott, 2010). Entretanto a legislação vigente não contempla a pesquisa desse agente como indicador de contaminação de água e organismos aquáticos.

Os resultados negativos observados na pesquisa de isolamento de *Salmonella* spp., podem estar relacionados ao antagonismo entre patógenos entéricos (Levine e Tanimoto, 1954), como *Escherichia coli* e *Proteus* spp., que foram frequentemente encontradas (25,00% e 8,33% respectivamente) nas amostras examinadas nos filés. Estes gêneros produzem colicinas, que são substâncias inibidoras para o crescimento das *Salmonella* spp.. Este fato poderá proporcionar resultados falsos negativos, o que põe em risco o consumo desses pescados.

A *E. coli* exerce antagonismo microbiano na microbiota competitiva, sendo assim persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas intestinais como *Salmonella* e *Shigella*, o que está de acordo com os resultados obtidos de *E. coli* e *Proteus* spp. com frequência na água da Lagoa e nos peixes estudados. Esses microrganismos são deteriorantes e patogênicos oportunistas, que consistem em um risco potencial para os consumidores destes pescados, essas bactérias encontradas interferem na qualidade da carne, pois mais rápida é a sua deterioração e menor sua vida útil para o consumo deste pescado (Vieira et al., 2000).

Segundo as portarias vigentes, a ausência de *Salmonella* spp. a presença das diferentes espécies/gêneros de coliformes encontrados, tais como *Escherichia coli*,

Citrobacter spp., *Proteus* spp. H₂S(-), *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp., não permite a utilização do pescado. Pelos resultados do estudo, os filés estão impróprios para o consumo em razão da grande diversidade de isolados e seu potencial impacto à saúde pública. No entanto, do ponto de vista higiênico sanitário e epidemiológico, abre-se um precedente para o questionamento dos protocolos de análise microbiana de alimentos, principalmente por não estabelecerem parâmetros de ocorrência de outros agentes bacterianos como *Aeromonas* spp., mesmo com surtos reportados na literatura deste assunto.

Com os elevados valores encontrados de *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. e *Escherichia coli* em todos os órgãos estudados, inclusive nos filés, nesta pesquisa demonstram a relevância desses dados (além de *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp.), fica ressaltado a patogenia destas bactérias com as implicações destes filés para o consumo humano. Por ter a maior importância na contaminação alimentar, pode-se destacar o grupo coliforme, os quais são inerentes ao trato intestinal (Hobbs e Roberts, 1999; Muratori, 2007).

Bactérias que foram encontradas nos filés, como *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp., já *Flavobacterium* spp. (100% nas brânquias) têm uma participação na deterioração do peixe, podem contribuir participando deste processo, da degradação inicial das proteínas. Após o rigor mortis, o número de bactérias aumenta e conseqüentemente as enzimas presentes nesses microrganismos, aceleram o processo de putrefação por essas bactérias putrefativas com as descarboxilações e desaminações de vários aminoácidos presente na carne dos peixes, como a descarboxilação da lisina e produção da cadaverina (*Citrobacter*), a desaminação do triptofano em putrefacina (*Pseudomonas*, *Escherichia coli*), a transformação de histidina em histamina (*Proteus* spp., *Morganella morganii* e *Klebsiella* spp.), o

que pode provocar intoxicações de natureza alérgica.

Revela-se uma alarmante condição de risco à população carente, que subsiste com a proteína de pescado da Lagoa da Pampulha. A grande contaminação dos peixes e da água pode estar relacionada à contaminação fecal da água da Lagoa pela intensa impactação antrópica, demonstrada tipicamente por *Aeromonas* spp. isoladas nas diferentes amostras e pontos de coleta, sem levar em conta as variações sazonais.

Os achados de *Plesiomonas shigelloides* de 12,50% nos filés dos peixes estudados da Lagoa da Pampulha foram semelhantes aos encontrados por Canabarro (1991), que trabalhando com amostras de peixes de várias espécies encontrou 12,93% dos animais infectados com bactérias dessa espécie no estado do Rio Grande do Sul, o que demonstra os riscos da alimentação destes pescados em surtos de doenças de origem hídrica, em humanos como diarreia, vômito, e alterações sistêmicas, como descrito por Novotny et al., (2004), em surtos de toxinfecção alimentar em humanos causados por este agente.

A qualidade bacteriológica de filés(músculo) dos peixes da Lagoa da Pampulha submetidos à acidificação com suco de limão (pH 4,0).

O ácido cítrico do limão (*Citrus limon*) (ácido 2 – hidróxi -1,2,3, - propanotricarboxílico) é aditivo INS 330 e neutraliza aminas na carne de pescado, convertendo-as em sais não-voláteis de amônia (ANVISA, 2011).

Nos filés submetidos ao caldo de limão foram isolados *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., GNNF, *Alcaligenes faecalis* e *Aeromonas* spp. indicando que a acidificação não foi eficaz como bactericida, embora a quantidade de isolados tenha sido menor quando comparado com o filé sem

tratamento, aonde foram isolados *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Plesiomonas shigelloides* e *Pseudomonas* spp.. A utilização do extrato de cítricos foi empregada com resultados satisfatórios por diversos pesquisadores (Oboh et al., 1995; Adedeji et al., 2007) frente a bactérias Gram negativas e positivas. O resultado desfavorável encontrado neste experimento pode ter sido causado pelo alto nível de contaminação bacteriana dos pescados da Lagoa da Pampulha.

A partir dos filés tratados com caldo de limão foram isolados *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., GNNF, *Alcaligenes faecalis* e *Aeromonas* spp., indicando que a acidificação não foi eficaz como bactericida, embora a quantidade de isolados tenha sido menor quando comparado com o filé sem tratamento. Um fator que pode ter interferido no efeito bactericida do ácido seria o tempo em que a carne ficou em contato com o mesmo.

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste experimento pode-se concluir que a Lagoa da Pampulha apresenta uma elevada taxa de contaminação bacteriana na água em todos os pontos estudados, tanto na estação seca como na chuvosa aumentando os riscos de doenças de veiculação hídrica. Os peixes da Lagoa constituem um risco à saúde pública, quando consumidos, principalmente pelo fato de não apresentarem sintomatologia. O suco de limão mostrou-se ineficiente como bactericida frente à grande contaminação e que a ocorrência desses enteropatógenos na água e nos espécimes analisados, compromete a qualidade destes pescados, implicando em necessidade de medidas e procedimentos de saneamento, que minimizem os riscos potenciais de doenças de veiculação hídrica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C. The Public Health Significance of Bacterial Indicators in Drinking Water. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, *ANAIS of the University of Leeds, U.K.*, p. 24-27. 1995.
- ADEDEJI, G. B.; FAGADE, O. E.; OYELADE, A. A. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Samples and its sensitivity to Citrus Extract. *African Journal of Biomedical Research*. v.10, p.183-187. 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIASANITÁRIA – ANVISA.
([HTTP://www.anvisa.gov.br/faqdinamica/index.asp?Secao=Usuario&usersecoes=28&userassunto=40](http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica/index.asp?Secao=Usuario&usersecoes=28&userassunto=40)). Acesso em: 11 de fevereiro de 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rde.htm. Acesso em: 15 de março de 2010.
- DETECÇÃO e Identificação de Bactérias de Importância Médica*. ANVISA (Agência de Nacional de Vigilância Sanitária), Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar. Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar: 2001 (Módulo 5), p. 93.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. *Bacterial Fish Pathogens*. Diseases of Farmed and Wild Fish. 4. ed. Edinburgh: UK, Springer Praxis Publishing. 2007. 594 p.
- AZEVEDO, M. V. *Estudo da relação entre hepatite A e condições de balneabilidade em cenários de saneamento precário na região de Mangaratiba, Baía de Sepetiba- RJ*. 2001. (Dissertação de Mestrado em Saúde Pública) Escola Nacional de Saúde, FIOCRUZ, RJ, 2001.
- BARROS, G. C.. Perda de Qualidade do Pescado deteriora e putrefação. *Revista do Conselho Federal de Med. Veterinária*. Brasília/ DF. Ano 9, n.30, p. 59-64, 2003.
- BEJERANO, Y.; SARIG, S.; HORNE, M. T.; ROBERTS, R. J.. Mass mortalities in silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes) associated with bacterial infection following handling. *Journal of Fish Diseases*. v. 2, p. 49-56, 1979.
- BERCOVIER, H.; GHITTINO, C.; ELDAR, A. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Developments in Biological Standard*, v. 90, p.153-160, 1997.
- BORDALO, A. A. Effects of salinity on bacterioplankton: field and microcosm experiments. *Journal of Applied Bacteriology*. v.75, p. 393-398, 1993.
- BORDALO, A. A.; ONRASSAMI, R.; DECHSAKULWATANA, C. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand). *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 864-871. 2002.
- BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológico Para Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 2001.
- BRASIL, 2004. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e de outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 25 de março de 2004.
- BRAZ, V. N.; SOUZA, C. L.; LOUREIRO, E. C. B.; Condições de balneabilidade e presença de Enteropatógeno em praias estuarinas do Norte do Brasil. Cong. Brasileiro de Eng. Sanitária e Ambiental, 20. Rio de Janeiro. *Anais Associação Brasileira Engenharia Sanitária*, 1999.

- BULLER, N. B. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*. CABI Publishing; Wallingford, Oxfordshire. 1. ed. 2004.
- BUNCH, E. C.; BEJERANO, I.. The effect of environmental factors on the susceptibility of hybrid tilapis *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus* to streptococcosis. *Bamidgeh*. v. 49, p. 67-76, 1997.
- CAMUS, A. C.; DURBOROW, R. M.; HEMSTREET, W. G.; THUNE, R. L.; HAWKE, J. P. Aeromonas Bacterial Infections Motile Aeromonad Septicemia. *Southern Regional Aquaculture Center*. Publication, n. 478, p. 1-4, 1998.
- CANABARRO, T. *Isolamentos de bactérias e vírus em peixes de águas do município de Santa Maria e arredores*. Santa Maria, RS, 1991. 81 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.
- CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 248p. 1991.
- CARVALHO-CASTRO. G. A.; LOPES, C. O.; LEAL, C. A. G.; CARDOSO, P. G.; LEITE, R. L.; FIGUEIREDO, H. C. P.. Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*. v. 144, p. 371–376. 2010.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). 1990. *Aeromonas* wound infections associated with outdoor activities – California. *Morb. Mortal. Wkly*7. Rep. v. 39, p. 334-335.
- CDTN - *Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear*. Levantamento Eco-Batimétrico da Lagoa da Pampulha: Relatório Técnico. Belo Horizonte: CDTN,2000.
- CHOU, C. C.; LIN, Y. C.; SU, J. J. Microbial indicators for differentiation of human- and pig-sourced fecal pollution. *Journal of Environmental Science Health Part A Toxicol Hazard Subst Environ Eng*; v. 39, n. 6, p. 1415-1421, 2004.
- COPAM - Conselho de Proteção Ambiental. Deliberação Normativa. *Diário do Executivo - Minas Gerais*, n. 010/86, 1986. Minas Gerais.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Normativa. *Diário oficial da União*, n. 020 de 18 de Junho 1986.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Normativa. *Diário oficial da União*, n. 020, 2001.
- COOK. M. K.; BLANCHARD. V. L.; ROBBINS. M. L.; PARR. L. W.. An Investigation of the antibacterial spectrum of colicines. *Antibiotics & Chetherapy*, v. 3, p.195-202, 1953.
- COLLINS, M. D.; JONES, D.; FARROW, J. A. E.; KILPPER-BALZ, R.; SCHLEIFER, K. H. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 34, p. 220-223, 1984.
- COLWELL, R. R. Non-culturable but still viable and potentially pathogenic bacteria. *Zentralblat Bakteriologie*, v. 279, p. 154-156, 1993.
- DAVIS, E. M.; MATHEWSON, J. J.; De La CRUZ, A. T.. Growth of indicator in a flow-through aquaculture facility. *Water Research*. v. 29, p. 2591-2593, 1995.
- DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F.; DEVRIESE, L. A. Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter colulmnaris*) strains isolated from tropical fish. *Veterinary Microbiology*. v. 62, p. 35- 45,1998.

- DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F.; DRIESSCHE, E. V.; CHARLIER, G.; DUCATELE, R. .; Characterization of the adhesion of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter colummaris*) to gill tissue. *Journal of Fish Diseases*. v. 22, p. 465-474, 1999.
- DIGGLES, B. K.; HINE, P. M.; HANDLEY, S.; BOUSTEAD, N. C.. *A handbook of diseases of importance to aquaculture in New Zealand*. NIWA; Wellington, New Zealand.1. ed. 2002.
- DODSON, S. V.; MAURER, J. J.; SHOTTS, E. B. Biochemical and molecular typing of *Streptococcus iniae* isolated from fish and human cases. *Journal of Fish Diseases*. v. 22, p. 331-336, 1999.
- DUFOUR, A. P. “*Escherichia coli*: The fecal coliform,” Bacterial Indicators/ Health Hazards Associated with Water. *American Society for Testing and Materials*. p. 48-58 (Special technical publication n. 65). 1977.
- ECKNER, K.F. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the colilert and enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and Enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 3079-3083, 1998.
- ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; BERCOVIER, H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus diffcile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*, v. 28, p. 139-143, 1994.
- ELLIOTT, R. P. Preliminary study of total bacterial plate count method for fishery products. *Commercial fisheries review*, v. 10, n. 11, p. 25-30, 1948.
- EL-SHAFI, S. A.; GIJZEN, H. J.; NASR, F. A.; EL-GOHARY, F. A.. Microbial quality of tilapia reared in fecal-contaminated ponds. *Environmental Research*. v. 95, p. 231-238. 2004.
- ESPOSTO, E. M.; RODRIGUES, D. P.; LÁZARO, N. S. Ocorrência de *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* em cama de aves e de peixes criados no sistema de reciclagem de nutrientes. *Revista Brasileira de Med. Veterinária*. v. 24., n.4, p. 166-170, 2002.
- EVANS, J. J.; WIEDENMAYER, A. A.; KLESIUS, P. H.. A transport system for maintenance of viability of *Acinetobacter calcoaceticus*, *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* over varying time periods. *Bulletim Europe Association Fish Pathology*, v.22, p.238-246, 2002.
- EVELYN, T. P. T. The effects of chilling,freezing and cold-smoking on the infectious titre of certain microbial fish pathogens that may occasionally be present in marketed salmonid flesh. 2001. p. 225-229. In: Rodgers, C. J. ed. *Risk Analysis in Aquatic Animal Health. Proceedings of an International Conference*, Paris, France, 8- 10 February, 2000.
- EVISON, L. M. Comparative studies on the survival of indicator organisms and pathogens in fresh and seawater. *Water Research*. v. 20, p. 309-315, 1989.
- FAISAL, M.; POPP, W.; REFAI, M.. Septicaemia caused by *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapias, *Oreochromis niloticus*. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*. v. 102, n.3, p.87-93. 1989.
- FATAL, B.; DOTAN, A.; PARPARI, L.; TCHORSH, Y.; CABELLI, V. J.. Microbiological purification of fish grown in fish grown in fecally contaminated commercial fishpond. *Water Scienci Technology*, v .27, p. 303-311, 1993.
- FOODS and Drugs Administrations. USA *Bacteriological Analytical Manual online, Chapter 5*, 2007. Disponivel em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>. Acesso em: 17 set. 2008.

- FIGUEIREDO, H. C. P.; KLESIOUS, P. H.; ARIAS, C. R.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C.A.; PEREIRA JUNIOR, D. J.; PEIXOTO, M. T. D. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. *Journal of Fish Diseases* v. 28, n. 4, p. 199-204, 2005.
- FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; FARIA, F. C.; COSTA, G. M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. [Communication] *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.4, p.678-680, 2006.
- FREDERIC. P. & LEVINE. M. Antibiotic interrelationships among the enteric group of bacteria. *Journal Bacteriology*, v. 54, p. 785- 792, 1947.
- FRERICHS G. N.; MILLAR, S. D. *Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens*. Pisces Press, Stirling, 1993. 60 p.
- FRICKER, E.J.; FRICKER, C.R. Use of defined substrate technology and a novel procedure for estimating the numbers of enterococci in water. *Journal of Microbiological Methods*, v. 27, p. 207-210. 1996.
- GERMANO, P. M. L.; OLIVEIRA, J. C. F.; GERMANO, M. I. S. O Pescado como causade toxinfecções bacterianas. *HigieneAlimentar*. v.7. n° 28.1993.
- GRAEVENITZ, A. *Aeromonas* and *Plesiomonas*: *Manual of Clinical Microbiology*. 3ª. ed. Washington DC.: American Society for Microbiology, 1980. 149p.
- GRIFFIN, B. R. A simple procedure for identification of *Cytophagalumnaris*. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 4, p. 63-66, 1992.
- GOOGLE. Maps Link Tele Atlas, 2010. Acesso: do Google Maps em 15 de junho de 2009. <http://www.googlemaps.com>
- GOH, S. H.; DRIEDGER, D.; GILLET, S.; LOW, D. E.; HEMMINGSEN, S. M.; AMOS, M.; CHAN, D.; LOVGREN, M.; WILLEY, B. M.; SHAW, C.; SMITH, J. A. *Streptococcus iniae*, a Human and Animal Pathogen: Specific Identification by the Chaperonin 60 Gene Identification Method. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 36, n.7, p. 2164- 2166, 1998.
- GUIDELINES for Canadian Drinking Water Quality. Health Canada, 2002. Canada Communication Group Publishing, Ottawa. (Prepared by the Federal – Provincial Subcommittee on Drinking Water of the Federal – Provincial Committee on Environmental and Occupational Health).
- GUZMÁN, M. C.; BISTONI, M. A.; TAMAGNINI, L. M.; GONZÁLES, R. M.. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. *Water Research*. v.38, p. 2368-2374, 2004.
- HAYES, A. J.; MARKOVIC, B.. Toxicity of *Backhousia citriodora* (*Lemon myrtle*). *Antimicrobial and Chemistre Toxicology*. v. 40, n. 4, p. 535-543, 2002.
- HANSEN, G. H.; RAA, J. K.; OLAFSEN, J. A. Isolation of *Enterobacter agglomerans* from dolphin fish *Corypahena hippurus* L. *Journal of Fish Diseases*. v.13, p. 93-96, 1990.
- HARWOOD, V. J.; BROWNELL, M.; PERUSEK, W.; WHITLOCK, J. E. Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. Isolated from Wastewater and Chicken Feces in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 67, n. 10, p. 4930-4933, 2001.
- HERJKAL, T. W.; GERBA, C. P.; HENDERSON, S.; FREEZE, M.. Bacteriological, virological and chemical evaluation of waste-water-aquaculture system. *Water Research*. v. 17, p. 1749- 1755. 1983.

- HERNANDES, P.; GARCIA, R. R.. Prevalence of *Plesiomonas shigelloides* in surface water. *Archiave Latinoamerica Nutricion*, v, 47, n.1 p.47-49, 1997.
- HINEY, M.; OLIVIER, G. Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*). In Woo, P T K; Bruno, D W (ed) *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. CAB International; Wallingford, Oxfordshire; 1999, p. 341-426.
- HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. *Toxinfecções e Controle Higiénico-Sanitário de Alimentos*. São Paulo. Varela, 1999. P. 376.
- HOFER, E. *Noções sobre a identificação de bactérias Gram negativas não fermentadoras de importância clínica*. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz Fiocruz, 2006. 10p.
- HOFER, E.; REIS, C. M. F.; THEOPHILO, G. N. D.; CAVALCANTE, V. O.; LIMA, N. V.; HENRIQUES, M. F. C. M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Uma - Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 39, n. 2, p. 217-220, 2006.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 784p.
- HUGH. R.; LEIFSON. E. The taxonomic Significance of Fermentative versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by Various Gram Negative Bacteria. *Journal Bacteriology*. v.66, n. 1, p. 24-26, 1953.
- INGLIS, V.; ROBERTS, R. J.; BROMAGE, N. R.. *Bacterial Diseases of Fish*. New Jersey: ed. Jonh Weley Son, 1993. 312 p.
- IMPORT risk analysis: Frozen, skinless and boneless fillet meat of *Oreochromis* spp. from China and Brazil for human consumption, MAF Biosecurity New Zealand *Ministry of Agriculture and Forestry* Wellington New Zealand. March 2008.
- IMZILN, B.; LAFDAL, O. M. Y.; BARAKATE, M.; HASSANI, L.; OUHDOUCH, Y.; BOUSSAID. A; JANA. M. Pril-ampicillin-dextrin-ethanol agar for the isolation and quantification of *Aeromonas* spp. from polluted environmental waters. *Journal of Applied Microbiology*, v. 82, p. 557-566. 1997.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Human pathogens: the Genus *Aeromonas*. *Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology*, v. 7, p. 47-55. 1996.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology*, v. 23, n. 1, p. 35-73. 2010.
- JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6 ed. São Paulo. Arned, 2005. p. 711.
- KRIEG, N. E. (ed.); HOLT, J. G.; MURRAY, R. G. E.; BRENNER, Don. J; et al. *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, vol. 1, Baltimore: Williams and Wilkins,. 1984. p.964.
- LAHIRY, N. L.; MOORJANI, M. N.; BALIGA, B. R. Factors influencing the keeping quality of fresh-water fish in ice. *Food Technology*, v. 17, n. 9, p. 123-125, 1963.
- LEITÃO, M. F. F. Deterioração Microbianado Pescado e sua Importância em Saúde Pública. *Higiene Alimentar*. v. 3, n. 3-4, 1984.
- LEVINE, M.; TANIMOTO, R. H.. Antagonisms among enteric pathogens and coliform bacteria. *Journal of Bacteriology - American Society Microbiology*. v. 67, p.537-541, 1954.
- LIMA, L. C.; FERNANDES, A. A.; COSTA, A. A. P.; VELASCO, F. O.; LEITE, R. C.; HACKETT, J. L.. Communication Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from pacu *Myleus micans*. *Arquivo Brasileiro de Med. Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n.1, p. 275-277, 2008.

- LISTON, J. Microbiology in fishery science. In: Connell, J. J. ed. *Advances in Fish Science and Technology*. Surrey: fishing news books Ltd, England, 1980. p. 138-157.
- MANUAL of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. World Organisation for Animal Health. 5. ed. Paris: OIE, 2006b. p. 1178.
- MARKOSOVA, R.; JEZEK, J. Indicator bacteria and limnological parameters in fish ponds. *Water Research*. v. 28, p. 2477- 2485. 1994.
- McEWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. v. 34, Suppl. 3: p. 93-106, 2002.
- Mc FADDIN, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore: Ed. William & Wilkins Co. 1980. 301p.
- MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). *Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológica para Controle de Produtos de Origem Animal e Água* – Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003.
- McFETERS, G.; BISSONNETTE, G. K.; JEZESKI, J. J. Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Applied Microbiology*. v.27, n.5, p. 823-829, 1974.
- MURATORI, M. C. S. *Consórcio suíno-peixe: riscos ambientais e sanitários. Proposta alternativa para descontaminação*. 2000. 71f. Tese. (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) Escola de Veterinária: UFMG.
- MURATORI, M. C. S.; RIBEIRO, C. P.; MIRANDA, M. O. T. Aspectos higiênico-sanitários na produção de peixes. *Informe Agropecuário*. v. 21, n. 203, p. 62-64, 2000.
- MURATORI, M. C. S.; MARTINS, N. E.; PEIXOTO, M. T. D.; OLIVEIRA, A. L.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. P. R.; SILVA, M. C. C.; LEITE, C. L.. Mortalidade por “septicemia dos peixes tropicais” em tilápias criadas em consorciação com suínos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 53, n. 6, p. 658-662, 2001.
- MURATORI, M. C. S.; COSTA, A. P. R.; VIANA, C. M.; Qualidade sanitária do pescado “in natura”. *Revista Higiene Alimentar*, v. 18, n. 116/117, p. 50-54, 2004.
- MURATORI, M. C. S.; NEVES, R. A.; COSTA, A. P. R. Metodologia alternativa para contagem de bactérias heterotróficas em mãos de manipuladores. *Revista Higiene Alimentar*. v. 21, n. 150, p. 148-149, 2007.
- MURRAY, B. E. Synopses: diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. *Emerging Infectious Diseases*. v. 4, n. 1, p. 37-47, 1998.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H.(Ed.). *Manual of clinical microbiology*, 9. ed, Washington, DC: ASM. 2007, p. 2256.
- NAYAK, S. K. Review Article. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, v. 41, p. 1553-1573, 2010.
- NOVOTNY, L.; DVORSKA, L.; LORENCOVA, A.; BERAN, V.; PAVLIK, I. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Veterinarni Medicina Czech*, v. 49, n. 9, p. 343-358, 2004.
- NOGA, E. J. *Fish disease: diagnostic and treatment*. St. Louis: Mosby, 1996. 367p.
- NUNES, J. P. *Análise Geral do Meio Instituto Adolfo Lutz*. Rio Branco: Universidade Federal do Acre, 1982. 29 p.

- OBOH, P. A.; AGBONLAHOR, D. E.; EKUNDAYO, A. O.; OWHE-URUGHE, U. B. Antibacterial activity of *Citrus arantifolia*(Lime) juice against some Gram positive and negative bacteria. *Nig. Ann. Nat. Sci.* v. 2, p.1-9, 1995.
- OGBONDEMINU, F. S; OKOYE, F. C. Microbiological evaluation of an untreated domestic wastewater aquaculture system. *Journal Aquaculture Tropical.* v. 7, p. 27-34, 1992.
- OIE International Aquatic Animal Health Code. World Organisation for Animal Health; Paris. (6th edition). (2005).
- OIE International Aquatic Animal Health Code. World Organisation for Animal Health; Paris. (6th edition). (2006a).
- MANUAL of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.* World Organisation for Animal Health. 6. ed. Paris: OIE, 2005. p.
- MANUAL of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.* World Organisation for Animal Health. 6. ed. Paris: OIE, 2006a. p.
- MANUAL of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.* World Organisation for Animal Health. 5. ed. Paris: OIE, 2006b. p. 1178.
- OLIVEIRA, E. R.; VIEGAS, E. M. Qualidade do Pescado. In Ranzani-Paiva, Ricardo Takemoto e Maria de los Angeles Perez Lizama. *Sanidade de Organismos Aquáticos.* São Paulo: Livraria Varela, 2004.
- OKPOOKWASILI, G.C.; AKUJOBI, T.C. Bacteriological indicators of tropical water quality. *Environmental Toxicology and Water Quality.* v. 11, p. 77-81. 1996.
- PANANGALA, V. S.; SHOEMAKER, C. A.; McNULTY, S. T.; ARIAS, C. R.; KLESZIUS, P. H. Intra- and interspecific phenotypic characteristics of fish-pathogenic *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda*. *Aquaculture Research.* v. 37, n. 1, p. 49-60, 2006.
- PESSÔA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meio de Rugai e lisina motilidade combinados em um só tubo para identificação presuntiva de enterobactérias. *Revista Instituto Adolfo Lutz,* v.32, p.97-100, 1972.
- PIER, G. B.; MADIN, S. H.. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis.* *International Journal of Systematic Bacteriology.* v. 26, p. 545-553, 1976.
- PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G.. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology. Biochemistry.* v. 7, p. 253-258, 1989.
- PILLAY, T. V. R. Water and wastewater use. In: Pillay, T.V.R. (Ed.), *Aquaculture and the Environment,* 2. ed, p. 49-55, Cambridge University Press, Great Britain. 1992.
- POLPRASERT, C.; UDOM, S.; CHOUDRY, K. H.. Septage disposal in waste recycling ponds. *Water Research.* v. 18, p. 519-528, 1984.
- PLUMB, J. A.; SANCHEZ, D. J.. Susceptibility of five species of fish to *Edwardsiella ictaluri.* *Journal of Fish Diseases.* v. 6, p. 261-266, 1983.
- PLUMB, J. A.. *Edwardsiella* Septicaemias. In: WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. (ed) *Fish Diseases and Disorders,* CAB International; Wallingford, Oxfordshire; 1999. v. 3, p. 479- 522, (Viral, Bacterial and Fungal Infections).
- PRUSS, A. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. *International Journal Epidemiology.*, Oxford, v.27, n.1, p. 1-9, 1998.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R.. *Clinical veterinary microbiology.* Londres: Wolfe, 1994. 648 p.

- QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J. C.; MAGUIRE, D.. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Artmed, 2005, 512p.
- RANZANI-PAIVA, M, J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M de los A. P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Ed. Livraria Varela, 2004. 434 p.
- RODGERS, C. J. (ed) Risk analysis in aquatic animal health – proceedings of an international conference. *World Organization for Animal Health (OIE)*; Paris; pp 215-229. (2008).
- RICE, E. W.; ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C. Efficacy of β -Glucuronidase Assay for the Identification of *Escherichia Coli* By The Defined-Substrate Technology. *Applied Environmental Microbiology*. v. 56, p. 1203, 1990.
- RIPPEY, S. R.; CABELLI, V. J. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in Limnetic environments: Relationship of the organism to trophic state, *Microbial Ecology*, v. 6, p. 45-54, 1980.
- RUGAI, E.; ARAÚJO, A. Meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos intestinais Gram negativos . *Revista do Instituto Adolph Lutz*, v. 28, p. 73-83, 1968.
- RUGAI, J. F.; ARAÚJO, S. F; TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F. and TRABULSI, L. R. EPM: modificação do meio de Rugai & Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. *Revista de Microbiologia*, v. 13, n. 4, p. 309-315, 1982.
- RUSSO, R.; MITCHELL, H.; YANONG, R. P. E.. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. *Aquaculture*. v. 256, p. 105-110, 2006.
- SALLAM, K. I.. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*. v. 18, n, 5, p. 566-575, 2007.
- SALEH, W. D. Isolation and identification of *Edwardsiella tarda* from infected Nile tilapia fish “*Oreochromis niloticus*”. *Bulletin of Faculty of Agriculture, Cairo University*. v.56, n. 4, p. 839-846, 2005.
- SALES, R. O.; OLIVEIRA, J. A. P.; COSTA, F. J. L.; SALES, A. M.. Avaliação do estado de frescor do pescado capturado em água doce e mantido sob refrigeração, no açude de Orós, Ceará. *Ciência Agrônômica*. V. 19, n. 2, p. 109-115, 1988.
- SHAMSUDIN, M. N.; PLUMB, J. A. Morphological, biochemical and physiological characterization of *Flexibacter columnaris* isolates from four species of fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 8, p. 335-382, 1996.
- SERRA, C. L. M.; CAVALCANTE, P. R. S.; ALVES, L. M. C.; NASCIMENTO, A. R.; DINIZ, S. C. C. S. Avaliação de parâmetros físicos e químicos e pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em águas do estuário do rio Anil (São Luís, Est. Do Maranhão). *Acta Scientiarum Biological Sciences*. Maringá, v. 25, n. 2, p. 261-266, 2003.
- SHEWAN, J. M. Bacteriological standards for fish and fishery products. *Chemistry Ind*. London. v. 6, p. 193-199. 1970.
- SHEWAN, J. M. The Microbiology of fish and fishery products: a progress report. *Journal Applied Bacteriology*. v. 34, p. 299- 315, 1971.
- SHALES, A. J.; DWIVEDI, P.. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the Prevention of Antimicrobial Resistance in Hospitals. *Clinical Infectious Diseases*, n. 25, p. 584-99, 1997.

- SCHIEFER, K. H.; KILPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nomb. rev. as *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 34, p. 31-34, 1984.
- SCHRECKENBERGER, P. C.; GRAEVENITZ, A. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium*, and other non fermentative gram negative rod. p. 539-560, 1999. In P. R. MURRAY, E. J. BARON, M. A. PFALLER, F. C. TENOVER, R. H. YOLKEN (ed.), *Manual de clinical microbiology*, ed. 7 ASM Press, Washington, D. C.
- SCHRECKENBERGER, P. C. *Practical Approach to the Identification of Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Bacilli*. A Guide to Identificação 2.ed. Chicago III: University of Illinois College of Medicine at Chicago, 2000.
- SHOTTS, E. B.; STARLIPER, C. E.. Flavobacterial Diseases: Columnaris Disease, Cold-water Disease and Bacterial Gill Disease. In: Woo, P. T. K.; Bruno, D W (ed) *Fish Diseases and Disorders*, CAB International; Wallingford, Oxfordshire; 1999. v. 3. p. 559-576. (*Viral, Bacterial and Fungal Infections*).
- SOUZA, A. N.; GOMES, S. F. O. Pesquisa de contaminantes nos efluentes da Lagoada Pampulha - Região Metropolitana de Belo Horizonte, *Revistas Eletrônicas Newton Paiva.br/se*, 2007.
- STANDARD Methods for the examination of Water and Wastewater*, 20.ed. Washington: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). DC 2000. 1557 p.
- STANDARD Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21.ed. Washington: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). DC. 2005. 1450 p.
- TREPETA, R. W.; EDBERG, S. C.. Methylumbelliferyl B-D-Glucuronide-Based Medium for Rapid Isolation and Identification of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.19, n. 2, 1984.
- UPADHYAY, R. K.; DWIVEDI, P.; AHMAD, S.. Screening of Antibacterial Activity of Six Plant Essential Oils Against Pathogenic Bacterial Strains. *Asian Journal of Medical Sciences*. v. 2, n. 3, p. 152-158, 2010.
- VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; BARRETO, N. S. E.; SOUSA, O. V.; TÔRRES, R. C. O.; RIBEIRO, R. V.; SAKER-SAMPAIO, S.; NASCIMENTO, S. M. M.; COSTA, F. A. P.; MADEIRA, Z. R.. *Microbiologia Higiene e Qualidade do Pescado teoria e prática*. São Paulo: Varela, 2004. 380 p.
- VIEIRA, K. V. M.; MAIA, D. C. C.; JANEIRO, D. I.; VIEIRA, R. H. S. F.; Influência das condições higiênicas-sanitárias no processo de beneficiamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em filés congelados. *Higiene Alimentar*, v. 14, n. 71, p. 37-40, São Paulo, 2000.
- WEINSTEIN, M. R.; LITT, M.; KERTESZ, D. A.; WYPER, P.; ROSE, D.; COULTER, M.; McGEER, A.; FACKLAM, R.; OSTACH, C.; WILLEY, B. M.; BORCZYK, A.; LOW, D. E.. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *N. England. Journal Medicine*, v. 337, p. 589-594, 1997.
- WIEDENMAYER, A. A.; EVANS, J. J.; KLESZIUS, P. H.. Experimental *Edwardsiella tarda* infection in nonabraded channel catfish *Ictalurus punctatus* by immersion. *Fisheries Science*. v. 72, n. 5, p. 1124-1126, 2006.
- WEBER, D. J.; RUTALA, W. A. Role of Environmental Contamination in the transmission of Vancomycin Resistant Enterococci. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. v.5, n.18, p. 306-309. 1997.
- WORMS (world register of marine species) Acesso em: 15 de dezembro de 2010, Base: <http://www.marinespecies.org>