



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

STEFANE DE LYRA PINTO

**OS MOLUSCOS *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791) E
Tagelus plebeius (LIGHTFOOT, 1786) COMO BIOINDICADORES
DE POLUIÇÃO ORGÂNICA NO ESTUÁRIO DA BACIA DO
PINA, RECIFE – PE, BRASIL**

RECIFE

2012

STEFANE DE LYRA PINTO

**OS MOLUSCOS *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791) E
Tagelus plebeius (LIGHTFOOT, 1786) COMO BIOINDICADORES
DE POLUIÇÃO ORGÂNICA NO ESTUÁRIO DA BACIA DO
PINA, RECIFE – PE, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Oceanografia

ORIENTADORA: Prof^a Dra. Deusinete de Oliveira Tenório
Departamento de Oceanografia – UFPE

CO-ORIENTADORA: Prof^a Dra. Emiko Shinozaki Mendes
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Recife

2012

Catálogo na fonte

Bibliotecária: Rosineide Mesquita Gonçalves Luz / CRB4-1361 (BCTG)

P659m Pinto, Stefane de Lyra.

Os moluscos *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) e *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) como bioindicadores de poluição orgânica no estuário da Bacia do Pina, Recife-PE, Brasil / Stefane de Lyra Pinto – Recife: O Autor, 2012.

xiv, 111f. il., figs., gráfs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Deusinete de Oliveira Tenório.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2012.

Inclui Referências e Anexos.

1. Oceanografia. 2. Bioindicadores ambientais. 3. Poluição Microbiológica. 4. Bioacumulação. 5. *Anomalocardia brasiliiana*. 6. *Tagelus plebeius*. 7. Litoral brasileiro. I. Tenório, Deusinete Oliveira (Orientadora). II. Mendes, Emiko Shinozaki (Co-Orientadora). IV. Título.

551.46 CDD (22.ed)

UFPE/BCTG-2012 / 171

FOLHA DE APROVAÇÃO

OS MOLUSCOS *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791) E *Tagelus plebeius* (LIGHTFOOT, 1786) COMO BIOINDICADORES DE POLUIÇÃO ORGÂNICA NO ESTUÁRIO DA BACIA DO PINA, RECIFE – PE, BRASIL

POR

STEFANE DE LYRA PINTO

BANCA EXAMINADORA
TITULARES

Prof^a Dra. Deusinete de Oliveira Tenório (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Aláise Gil Guimarães
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Fernando Antônio do Nascimento Feitosa
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Héliida Maria Gomes de Mélo
Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Pernambuco

Prof. Dr. Silvio José de Macêdo
Universidade Federal de Pernambuco

SUPLENTE

Prof^a Dra. Sigrid Neumann-Leitão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Carlos Nascimento de Barros
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico este trabalho ao meu pai, Manoel de Lyra Pinto Neto (*in memorian*) e a minha mãe, Marlene de Lyra Pinto por tudo que me ensinaram e aos meus irmãos Andréa e André de Lyra Pinto que são os meus companheiros de jornada na atual existência.

“Mestre é aquele que caminha com o tempo, propondo paz, fazendo comunhão, despertando sabedoria. Mestre é aquele que estende a mão, inicia o diálogo e encaminha para a aventura da vida. Não é só aquele que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas aquele que também questiona e desperta para a realidade. Não é aquele que dá de seu saber, mas aquele que faz germinar o saber do discípulo. Feliz é aquele que transfere o saber e aprende o que ensina!”.

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

A tessitura dos afetos chega em versos de palavras, com o movimento poético e harmonioso da composição das águas em mar de contentamento. Descortinar as linhas que compõem os nomes que desenham as páginas das histórias de vida e academia, elo que aproxima o homem da sua condição de reverência necessária e que ultrapassa a ciência e chega à essência das tramas humanas para mergulhar no tear dos agradecimentos genuínos. Permitam aqui a distância das regras acadêmicas.

E, assim, venho bordar as verdades da trilha tecida no percurso que finaliza e faz principiar uma nova caminhada:

A DEUS. Inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, desenho gratidão pela oportunidade que me deu de mais uma existência para o meu crescimento espiritual e intelectual. Por caminhar junto a mim indicando a esperança nos momentos mais difíceis e a certeza de um bordado mais amadurecido. Pelo seu amor e bondade, que nos deixa caminhar livremente dando a cada um a capacidade e coragem para tecer seu futuro.

Aos meus pais, Manoel Lyra (*in memoriam*) e Marlene Lyra. Cada um com a sua batuta comandaram com gestos de maestros harmoniosos, unidos em um único sentimento as rimas de cada postura enquanto pais. Em meio aos diversos ritmos, notas, escalas, agudas e graves de cada canção delineada, nos entremeios das relações permitiam o surgimento de um laço forte que perduraria até então. Dentro de mim há um pouco de cada um e aprendi a respeitar. A eles agradeço duas canções particulares: minha irmã Andréa Lyra e meu irmão André Lyra. Espíritos de longas caminhadas, cada um trazendo em si fios para serem traçados de maneira peculiar, mas inspirados com a melodia da possibilidade de crescer infinitamente, compartilhar e sonhar. E assim a escala do tempo e o caminhar de cada um de nós que segue em histórias distintas, mas num fio em traços únicos que somos NÓS.

A Deusinete de Oliveira Tenório, colheita acadêmica de orientação. Firme na composição científica necessária, por ter aceitado o desafio de guiar esta pesquisa e confiar no meu trabalho. Pela tessitura da amizade, incentivo e tranquilidade na trajetória da pesquisa.

A Emiko Shinozaki Mendes, segunda colheita acadêmica de orientação. Também firme na composição científica necessária, por ter permitido desenhar a trilha desta pesquisa e pelos conhecimentos em microbiologia. Pela tessitura da amizade, atenção e apoio sempre no momento certo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, lugar que encontrei para dar prosseguimento ao bordado da minha formação acadêmica e aos Coordenadores da gestão anterior - Manoel de Jesus Flores-Montes e Fernando Antônio do Nascimento Feitosa e a atual Tereza Cristina Medeiros de Araújo e Manoel de Jesus Flores-Montes, pelo compromisso em manter firme a tessitura dos sonhos e a história iniciada a mais de cinco décadas o curso.

Não poderia deixar de agradecer àquela que possibilitou a dar vida ao bordado desta história que hoje finaliza a Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, em meio aos tantos traçados e viés acadêmicos, me concedeu o afastamento do fio do tapete docente.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, cada um com uma história particular para ser soprada, perpetuada e assim continuar o longo fio da tessitura dos conhecimentos.

A Myrna Medeiros, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, por saber desenhar as trilhas de cada aluno e acolher com sorrisos e bom humor a todos.

A Aláise Gil Guimarães, Héliida Maria Gomes de Mélo, Sigrid Neumann-Leitão, Sílvia José Macêdo (titulares), Fernando Antônio do Nascimento Feitosa e José Carlos Nascimento de Barros (Suplentes), por terem a delicadeza de juntarem seus fios dourados do saber e acrescentarem um bordado especial a esta história.

A José Roberto Botelho de Souza, por tecer de forma inestimável o bordado cheio de cálculos, tabelas e números desta história.

Ao amigo Marcos Souto Alves, pela caminhada de tantos anos nas descobertas profissionais, pela sensibilidade em ouvir os afetos que nos aproxima na trilha da amizade, pela mão sempre presente em tecer ajuda e compartilhar. Pelo compromisso com a ética e com a lealdade.

As amigas conquistadas, Marluce Souza pelo companheirismo nos traçados delicados dos finais de semana, feriados e pelos momentos alegres compartilhados. Héliida Mélo pelas longas conversas tecidas nos almoços e por desenhar as trilhas do incentivo e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (LICAL) – UFRPE: Alexandre Duarte, Andréia Barretto, Carolina Barros, Eduardo Melo, Ducilene Nascimento, Fabíola Carneiro, Givanildo Silva, João Guimarães, Juliana Carvalho, Laís França, Laelia Pessoa, Marcela Silva, Monique Monteiro, Rejane Luna, Rodrigo Zeymer, Sarah Galvão, Suely Bezerra,

Valéria Santos, Valéria Vaz e Virginia Pessoa, pela colaboração direta ou indireta na tessitura deste tapete e pelos momentos de convivência.

A Gilberto Faustino da Silva Filho, por ser um dos tecelões deste tapete. Adam Malhoit, o tecelão encarregado de bordar os abstracts.

A Jorge, um tecelão que sabe conduzir com mão firme o leme da embarcação e a “Nano” que já começou a traçar sua história, o compartilhar nas trilhas das coletas e também nos momentos de brincadeiras.

Ao catador Sr. Lula por permitir compartilhar sua experiência e traçar fios nas coletas do unha-de-velho.

As amigas bordadeiras da 8ª turma do Grupo Zumbaiar, pelos caminhos tecidos, pelas trilhas de carinho e momentos compartilhados. Em especial a Glória Cavalcanti, Jacyara Baracho e Margareth Soares pelo início do caminhar na tessitura do bordado Era Uma Vez...

A Carol Lemos (Zumbaiar), que traz em si a sabedoria dos contadores ancestrais e com seu olhar, reconduz-nos a resgatar o longo fio do tapete do Era Uma Vez... Obrigada por fazer despertar em mim a criança adormecida e a enxergar o quanto é importante as histórias para as pessoas.

A todos os professores das diversas fases da minha vida, por terem compartilhado o seu saber e possibilitado descobertas, trilhas, sonhos e transformá-los em bordados de amadurecimento, como pessoa e profissional. Em especial a Antonieta Cordeiro chamada primeira, início das descobertas, pelo primeiro ponto do longo fio da história e a Rosa de Lima Mello por traçar novas trilhas no bordado, em momento mais maduro, por descortinar o amor aos moluscos e por tecer traços de incentivo.

Cabe aqui recordar os meus parentes, de ontem e hoje, pelos momentos trilhados, sonhos vividos, bordados difíceis e alegres, afetos guardados no coração para que o fio desta história possa continuar a ser bordada em forma de poesia nas gerações vindouras.

A todos os amigos dessa jornada encantadora que se chama vida pelas trilhas afetuosas percorridas, pelos tons, composições e compassos tecidos com os fios dos sentimentos.

E finalizo com um agradecimento especial a todos os catadores, pescadores e caranguejeiros do estuário da Bacia do Pina, que na sua faina diária pela subsistência, provêm nossas mesas com moluscos, peixes e crustáceos.

RESUMO

Um molusco indicador de contaminação microbiológica deve ser constante, ter ampla distribuição espacial, ser abundante, ser filtrador e bioacumular bactérias. O objetivo desta pesquisa foi identificar entre dois bivalves o melhor bioindicador de poluição orgânica e de qualidade ambiental na Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. Para isso procedeu-se análises microbiológicas das partes moles de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) e *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) e da água. Foram coletadas 24 amostras durante doze meses consecutivos, entre maio/2009 e junho/2010, que geraram 918 isolados de vibrios, aeromonas e coliformes. Os parâmetros ambientais foram correlacionados com as bactérias dos bivalves e da água para detectar padrões na distribuição espacial e temporal. Foram identificadas 43 espécies de bactérias pertencentes às famílias Vibrionacea, Aeromonadaceae e Enterobacteriaceae. As espécies de maior ocorrência foram *Aeromonas encheleia*, *A. schubertii*, *A. media*, *Vibrio metschnikovii*, *V. haliotocoli*, *V. mytili* e *V. natriegens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *E. gergoviae*. Não há um padrão detectável de variação temporal ou espacial, as espécies ocorreram aleatoriamente tanto nos animais como na água. Testes estatísticos indicaram que não houve diferenças significativas na composição qualitativa das bactérias em *A. brasiliiana*, *T. plebeius* e a água, nem houve influência detectável de nenhum dos parâmetros ambientais avaliados. *T. plebeius* e *A. brasiliiana* são contaminadas por via hídrica, bioacumulam, funcionam como hospedeiro intermediário de bactérias e exportam bactérias para o ambiente. As duas espécies possuem capacidade de bioacumular, porém, *A. brasiliiana* é melhor indicada como instrumento de aferição de qualidade microbiológica da água, quando comparada com *T. plebeius*.

Palavras-chave: bioindicadores ambientais, poluição microbiológica, bioacumulação, *Anomalocardia brasiliiana*, *Tagelus plebeius*, litoral brasileiro

ABSTRACT

A mollusk indicator of microbiological contamination needs to stay constant, have wide spatial distribution, be plentiful, act as a filter feeder and bioaccumulate bacteria. The objective of this research was to identify the best two bivalve bioindicators of organic pollution and environmental quality in the Pina Basin, Recife, Pernambuco, Brazil. Microbiological analysis of the soft tissues of *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) and *Anomalocardia brasiliiana*, (Gmelin, 1791) and water were conducted. 24 samples were collected for twelve consecutive months, between May 2009 and June 2010, which generated 918 isolates of *Vibrio*, *Aeromonas* and coliform. The environmental parameters were correlated with the bacteria from the shellfish and water to detect patterns in spatial and temporal distribution. We identified 43 species of bacteria belonging to the families Vibrionaceae, Aeromonadaceae and Enterobacteriaceae. The most frequently occurring species were *Aeromonas encheleia*, *A. schubertii*, *A. media*, *Vibrio metschnikovii*, *V. halioticoli*, *V. mytili* and *V. natriegens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, and *E. gergoviae*. There is no detectable pattern of temporal or spatial variation, the species occurred randomly in both animals and in the water. Statistical tests showed that there were no significant differences in the qualitative composition of bacteria in *A. brasiliiana*, *T. plebeius* and water, nor was there any detectable influence of environmental parameters evaluated. *T. plebeius* and *A. brasiliiana* are contaminated by water, bioaccumulate, act as intermediate hosts of bacteria and then expel bacteria back to the environment. Both species have the ability to bioaccumulate, however, *A. brasiliiana* is better suited as the benchmark of microbiological water quality when compared to *T. plebeius*.

Keywords: environmental bioindicators, microbiological pollution, bioaccumulation, *Anomalocardia brasiliiana*, *Tagelus plebeius*, the Brazilian coast

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Artigo I

Figura 1	Mapa da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, indicando os locais de coletas da água e dos bivalves <i>Anomalocardia brasiliiana</i> e <i>Tagelus plebeius</i> no estuário da Bacia do Pina.	48
Figura 2	Variação mensal da temperatura da água, oxigênio dissolvido e saturação do oxigênio durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)	49
Figura 3	Variação mensal da DBO e da salinidade durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)	50
Figura 4	Variação mensal do pH e da precipitação pluviométrica durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)	51
Figura 5	Escalonamento multidimensional das espécies de <i>Vibrio</i> e <i>Aeromonas</i> na água (A) e nos bivalves <i>Anomalocardia brasiliiana</i> (Ab) e <i>Tagelus plebeius</i> (T) durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.	54

Artigo II

Figura 1	Mapa da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, indicando os locais de coletas da água e dos bivalves <i>Anomalocardia brasiliiana</i> e <i>Tagelus plebeius</i> no estuário da Bacia do Pina.	77
Figura 2	Variação mensal da temperatura da água, oxigênio dissolvido e saturação do oxigênio durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)	81
Figura 3	Variação mensal da DBO e da salinidade durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)	82
Figura 4	Variação mensal do pH e da precipitação pluviométrica durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)	83

Figura 5 Escalonamento multidimensional das espécies de coliformes na água (A) e nos bivalves *Anomalocardia brasiliiana* (Ab) e *Tagelus plebeius* (T) durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

89

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Artigo I	
Tabela 1 Espécies de <i>Vibrio</i> spp. isoladas da água e dos bivalves <i>Anomalocardia brasiliiana</i> e <i>Tagelus plebeius</i> durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.	52
Tabela 2 Espécies de <i>Aeromonas</i> spp. isoladas da água e dos bivalves <i>Anomalocardia brasiliiana</i> e <i>Tagelus plebeius</i> durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.	53
Tabela 3 Média da contagem de <i>Vibrio</i> spp. (UFC ml ⁻¹ ou g ⁻¹) na água e nos bivalves <i>Anomalocardia brasiliiana</i> e <i>Tagelus plebeius</i> nos dois pontos de coleta durante o período de junho de 2009 a maio de 2010, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.	55
Tabela 4 Média da contagem de <i>Aeromonas</i> spp. (UFC ml ⁻¹ ou g ⁻¹) na água e nos bivalves <i>Anomalocardia brasiliiana</i> e <i>Tagelus plebeius</i> nos dois pontos de coleta durante o período de junho de 2009 a maio de 2010, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.	56
Artigo II	
Tabela 1 Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e termotolerantes (CT) na água e nos bivalves <i>Anomalocardia brasiliiana</i> e <i>Tagelus plebeius</i> no ponto 1, do estuário da Bacia do Pina – PE, no período de junho de 2009 a maio de 2010.	84
Tabela 2 Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e termotolerantes (CT) na água e nos bivalves <i>Anomalocardia brasiliiana</i> e <i>Tagelus plebeius</i> no ponto 2, do estuário da Bacia do Pina – PE, no período de junho de 2009 a maio de 2010.	85
Tabela 3 Espécies de bactérias do grupo coliformes isoladas na água, <i>Anomolacardia brasiliiana</i> e <i>Tagelus plebeius</i> no ponto 1 durante o período de junho de 2009 a maio de 2010, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.	88
Tabela 4 Espécies de bactérias do grupo coliformes isoladas da água, <i>Anomolacardia brasiliiana</i> e <i>Tagelus plebeius</i> no ponto 2 durante o período de junho de 2009 a maio de 2010, Bacia do Pina Recife, Pernambuco, Brasil.	88

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERÊNCIAS	20
3 ARTIGO I – Bivalves indicadores de vibrios e aeromonas em um estuário tropical do Nordeste do Brasil	27
ANEXO 1 – Normas da Revista Marine Pollution Bulletin	57
4 ARTIGO II – Moluscos como indicadores de contaminação em um estuário tropical no Nordeste do Brasil	72
ANEXO 2 – Normas da Revista Marine Ecology Progress Series	105
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	111

1. INTRODUÇÃO

A importância da Bacia do Pina

Devido ao desenvolvimento humano e a alta ocupação populacional em áreas costeiras, os estuários vêm normalmente sofrendo inúmeros impactos ambientais. Estes impactos variam desde o lançamento de efluentes até a alteração da bacia estuarina para que esta se adeque às necessidades humanas, tais como dragagens, aterros e retificações de canais (BRANCO, 2001).

O ambiente estuarino da bacia do Pina, caracterizado, principalmente, por se constituir numa região de encontro entre a água do mar e a água de rios, vem sendo degradado por meio de ações antrópicas, ao longo dos tempos. Esses fatos fazem com que seu monitoramento se torne altamente necessário, a fim de se estabelecerem medidas mitigadoras para mantê-lo o mais próximo possível de seu equilíbrio natural (SANTOS et al., 2009). A bacia do Pina está situada no perímetro urbano do município do Recife, é uma área que apresenta um importante estoque de moluscos comestíveis que representam elevado potencial econômico, entretanto, a quantidade de efluentes domésticos e outras fontes de poluição orgânica, afetam a qualidade dos produtos da pesca e podem comprometer a saúde humana.

Bivalves como Bioindicadores

Segundo Costa et al. (2004) os organismos vivos estão sujeitos a fortes impactos em seu ambiente, assim medições múltiplas são necessárias para averiguar o estado ecológico para se identificar e separar os efeitos antropogênicos dos efeitos naturais. Através da medição da qualidade ambiental podem-se inferir relações causais entre tensores e efeitos biológicos. Os organismos que melhor caracterizam esses efeitos em nível biológico são denominados bioindicadores.

Dentre os animais aquáticos, os moluscos reúnem as características para uso como bioindicador: sésil ou baixa mobilidade, ampla distribuição e abundância na área, fácil de ser amostrado e capacidade de filtrar grandes volumes de água. Como estão em contato direto com a água eles são eficientes para capturar partículas de alimentos e também acumular substâncias tóxicas associadas a partículas ou a organismos patogênicos que podem ocorrer na água (BELL, 1998).

A quantidade disponível de alimento para os moluscos é em parte determinada pelo volume de água transportado através de suas brânquias e em parte pela eficiência com que estas partículas são retidas (MOHLENBERG e RIISGARD, 1978).

Alguns moluscos chegam a filtrar cerca de 100 litros de água por dia (DAME, 1996; SUPPLY, 2000). Segundo Lira et al. (2001) os moluscos bivalves, filtram de 19 a 50 litros de água por hora em seu processo fisiológico de alimentação e acumulam na massa visceral, lúmen do intestino e hepatopâncreas, todos os agentes biológicos e abióticos que se encontram na água onde vivem. Em razão de serem consumidos frequentemente crus ou levemente cozidos, os moluscos passam a ser um problema particular de saúde pública. Os mariscos, pelos quais passam grande quantidade de água durante o processo de filtração, recolhem desta maneira os microorganismos que tem origem no solo e na água, incluindo os patogênicos presentes. A maioria dos moluscos é capturada em águas estuarinas e assim há a possibilidade de contaminação com patógenos do esgoto, bem como pelo ambiente.

As comunidades bentônicas são influenciadas por vários fatores ambientais, alguns são mais marcantes e delimitam a ocorrência e espaço geográfico das espécies. Essas influências, em geral, são as mesmas que afetam as espécies em qualquer estuário, porém existem características peculiares regionais ou locais que fazem com que determinado fator ambiental interfira na distribuição das espécies. Os moluscos bivalves do estuário da Bacia do Pina, respondem a determinados fatores abióticos de modo a delimitar suas populações em áreas onde o sedimento é mais compatível com sua existência, formando bancos naturais. Essas espécies são tipicamente estuarinas, geralmente com uma elevada densidade populacional, alto grau de resiliência e grande biomassa.

Além dos fatores abióticos, o estresse ambiental causado por ações antrópicas, entre os quais se podem destacar lançamento de efluentes domésticos e industriais, especulação imobiliária, desmatamentos para construção de marinas, viveiros, entre outros, interferem direta ou indiretamente na distribuição espacial e temporal dos moluscos e, muitas vezes, pode comprometer a sua sobrevivência.

Os moluscos bivalves *Anomalocardia brasiliiana* e *Tagelus plebeius*

A espécie *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) é um molusco bivalve lamelibrânquio da família Veneridae, encontra-se amplamente distribuído ao longo da costa do Brasil, e é comumente conhecido como "berbigão", "papa-fumo", "samanguaiá" e "maçunin", dentre outros nomes populares (RIOS, 2009). Habita áreas protegidas da ação de ondas e correntes, na faixa entremarés e no infralitoral raso, onde se enterram a pequenas profundidades no substrato areno-lodoso (BOEHS e MAGALHÃES, 2004). Tem brilho vítreo e coloração amarelada, apresentando frequentemente manchas ou faixas sinuosas cinza-escuras, de interior porcelanoso, muitas vezes com manchas acinzentadas na região posterior (BOFFI, 1979).

A referida espécie *A. brasiliiana* possui valor econômico estando entre os moluscos bivalves marinhos mais explorados comercialmente (BOEHS et al., 2010), sendo utilizado como fonte de alimento e de renda para comunidades pesqueiras, além de ser utilizado por muitos artesões como matéria-prima para objetos variados. De acordo com Boehs (2000), parece estar bem adaptada a condições ambientais geralmente estressantes à maioria dos organismos, como as oscilações de temperatura e as reduções da umidade do sedimento, decorrentes da exposição das faixas entre-marés durante os períodos da baixamar; além de apresentar uma ampla distribuição, ocorrendo desde a desembocadura até setores estuarinos com salinidade média de 17.

Em Pernambuco, região Nordeste do Brasil, o marisco é naturalmente encontrado principalmente no litoral Norte, onde a pesca artesanal sempre foi uma atividade tradicional. A exploração desordenada deste recurso na região pode comprometer os estoques naturais, alterando o ambiente costeiro através do esforço de pesca realizado por diversas famílias que sobrevivem da extração de moluscos bivalves. Em 2006 a coleta de marisco no litoral pernambucano foi responsável por 17,7% da produção pesqueira estadual, em torno de 2.475,3 t, sendo a espécie *A. brasiliiana* mais importante em termos de produção, com destaque para os municípios de Goiana, Itapissuma e Igarassu (CEPENE, 2008). A extração de *A. brasiliiana* representa uma fonte tradicional de alimento e renda para muitas mulheres pescadoras, denominadas “marisqueiras” (BARREIRA e ARAÚJO, 2005).

A espécie *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786), conhecida popularmente no Brasil como “unha-de-velho”, “canivete”, “unha-de-urubu” (BOFFI, 1979) pertence à família Solecurtidae e tem distribuição em toda a costa brasileira. Habita regiões estuarinas onde se enterram até a profundidade de 80 cm em substratos de areia e areno-lodoso próximo às desembocaduras de rios (RIOS, 2009). É considerada uma espécie eurihalina e tolera ampla variação de temperatura. Suas conchas são retangulares e com extremidades truncadas e abertas, seu umbo está localizado mais ou menos no centro. A maioria das espécies de *Tagelus*, incluindo *Tagelus plebeius*, é importante economicamente como fonte de alimento no Chile, China, Espanha e outros países, com coleta superior a 4.000 toneladas por ano no Chile (CLEDÓN et al., 2004).

Outro aspecto que se destaca com relação aos moluscos refere-se ao fato de ser uma fonte alimentar amplamente utilizada. Moluscos bivalves são mundialmente procurados pelo seu sabor, facilidade de coleta e preparo, podendo, até mesmo, ser ingeridos *in natura*. Sua ocorrência na natureza foi e continua sendo de máxima importância (SOARES et al., 1982).

Odores e sabores podem indicar problemas de qualidade, sejam eles provenientes da contaminação do pescado (gasolina, diesel, detergentes, desinfetante, etc.) ou mesmo de própria

deterioração. A manipulação de moluscos bivalves marinhos e do seu consumo *in natura* pode possibilitar o risco de contaminação cruzada. Os exames microbiológicos de moluscos bivalves são indicativos da microbiota do ambiente marinho e da presença de contaminantes, inclusive patogênicos. Assim os resultados microbiológicos são como sentinelas para a saúde pública, no que tange ao controle de infecções alimentares (DIAS et al., 2003; CUNHA NETO et al., 2002).

Segundo Schaeffer-Novelli (1989), as capturas de ostra (*Crassostrea rhizophorae*), sururu (*Mytella charruana*) e berbigão (*Anomalocardia brasiliiana*), estão entre as de maior destaque em áreas estuarinas e de manguezais. Na Bacia do Pina, essas espécies são as mais coletadas na mariscagem, embora outros animais como a taioba (*Iphigenia brasiliensis*), a unha-de-velho (*Tagelus plebeius*) e a lambreta ou sarnambi (*Lucina pectinata*) sejam também capturados em menor escala.

Moluscos como indicadores microbiológicos

Por sua localização em zona urbana fortemente impactada, a Bacia do Pina apresenta condições ambientais favoráveis a presença de vários tipos de microrganismos no ambiente e por consequência a possibilidade de haver bioacumulação nas partes moles dos moluscos bivalves, sobretudo, pelo fato de apresentarem hábitos filtradores. *Anomalocardia brasiliiana* e *Tagelus plebeius* são de grande importância sócio-econômica, pois além de servirem como fonte saudável de proteína animal para as populações ribeirinhas constituem importante atividade comercial, representando a única ou principal fonte de renda familiar para os chamados “marisqueiros” que praticam grande esforço de pesca nos bancos de moluscos naquela área.

Os problemas de saúde pública associados à poluição dos recursos hídricos não estão vinculados apenas aos organismos entéricos ou de origem fecal, mas também àqueles que ocorrem naturalmente nos ambientes aquáticos (ISLAM e TANAKA, 2004). As gastroenterites e as infecções cutâneas são, geralmente, causadas por bactérias autóctones de ambientes aquáticos, como *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp. Em função dos altos níveis de nutrientes na água, provenientes da entrada de material orgânico advindo das emissões de esgotos domésticos, tais bactérias têm seu crescimento favorecido com outros microrganismos heterotróficos (CHOPRA e HOUSTON, 1999).

O gênero *Vibrio* engloba um grupo diversificado de bactérias Gram-negativas, habitantes do ambiente aquático tanto em clima tropical como temperado, incluindo algumas espécies simbióticas e patogênicas. Este último grupo inclui *Vibrio cholerae*, o agente causador da cólera, e *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, que juntos são responsáveis pela maioria dos casos de

intoxicação causadas por consumo de frutos do mar (LIPP e ROSE, 1997). A maioria dos estudos sobre *Vibrio* spp. têm focado sua presença em peixes, ostras, mexilhões e outros bivalves, também em águas e plâncton. Algumas espécies são halofílicas como *Vibrio vulnificus* e *V. parahaemolyticus*, que requerem um ambiente salgado para se desenvolverem.

A distribuição e quantidade de certos *Vibrio* na região costeira são influenciadas por fatores ambientais como a salinidade, temperatura e ocorrência de organismos hospedeiros (KASPAR e TAMPLIN, 1993; MOTES, et al., 1998). Alguns *Vibrio* spp. são patogênicos para peixes e moluscos, como também para o homem (MACIÁN et al., 2000). As espécies que ocasionam doenças no homem incluem *Vibrio cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii* e *Photobacterium damsela* (CAVALLO e STABILI, 2004).

Os representantes do gênero *Aeromonas* atualmente pertencem à família Aeromonadaceae e são caracterizadas como bactérias Gram negativas em forma de bastonete, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, que utilizam a glicose como única fonte de energia. São amplamente distribuídas em ambientes aquáticos, sendo isoladas de águas doces, salgadas, tratadas, estuários e esgotos domésticos (ISONHOOD et al., 2002). Espécies de *Aeromonas* são agentes significantes em doenças de origem alimentar, sendo isoladas de vegetais e de diversos produtos de origem animal, incluindo carne bovina, aves, peixes, camarões, leite e outros (GALBIS et al., 2002).

Dentre as espécies descritas do gênero *Aeromonas*, somente cinco (*A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. jandaei* e *A. schubertii*) são reconhecidas como patógenos humanos e em peixes, associadas principalmente com gastroenterites, septicemias e infecções. Além disso, a presença de *Aeromonas* em alimentos pode ser fatal para pacientes imunodeprimidos (JANDA e ABOTT, 1998). Entre as espécies mencionadas *A. hydrophila* tem atraído atenção especial devido a sua frequente associação com infecções nos seres humanos, e são principalmente encontradas em pacientes com história de acidentes, onde houve exposição de feridas a ambientes aquáticos, em indivíduos imunodeficientes e geralmente estão associadas com meningite, endocardite, peritonite, síndrome hemolítica urêmica ou septicemia (JANDA e ABOTT, 1998; MARCEL et al., 2002).

No Brasil vários estudos relatam a ocorrência de isolamento destes patógenos do ecossistema aquático, são procedentes dos alimentos de origem marinha: peixe, ostras, mexilhões e caranguejos e de lesões cutâneas no homem causadas pela pesca (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2006 e 2010; PEREIRA et al., 2004). Estes estudos são importantes para a saúde pública devido à associação de alguns desses microrganismos em doenças transmitidas por

alimentos e infecções extra intestinais (HOFER et al., 2006; PEREIRA et al., 2008). Outros estudos também foram realizados em estuários tropicais avaliando a qualidade da água e de moluscos quanto a presença de *Aeromonas* (MARCEL et al., 2002; SERRA et al., 2003; MARTINS et al., 2009).

Muito embora a legislação brasileira não inclua a presença de *Aeromonas* em águas e alimentos, a alta prevalência ambiental dessa bactéria pode ser considerada como importante ameaça à saúde pública, sendo que as infecções provocadas por esses patógenos geralmente acontecem mediante contato direto com a água e os alimentos contaminados (CHOPRA e HOUSTON, 1999).

Dentre os indicadores microbiológicos de poluição fecal, o grupo coliforme é o mais empregado. A característica é sua forma em bastão, Gram-negativo, não esporulado e fermentador da lactose com formação de gás a 35°C. Estão incluídas nesse grupo, espécies típicas da microbiota fecal, pertencentes à família Enterobacteriaceae e dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter* (HAGLER e HAGLER, 1988).

Essas bactérias são típicas da microbiota fecal, mas também podem ser isoladas de outros locais com exceção da *E.coli* cuja origem é estritamente fecal (HAGLER e HAGLER, 1988). Algumas bactérias do grupo coliforme são encontradas no solo e em vegetais, e têm a capacidade de se multiplicar na água com relativa facilidade (VIEIRA et al., 1999). Segundo Lebaron et al. (1994) o dado importante em relação a presença, em grande quantidade, de coliformes termotolerantes numa coleção d'água, mesmo as águas estuarinas ou marinhas, é que a *E. coli*, o maior representante dos coliformes e termotolerantes, é capaz de conjugar em meio salino, podendo em alguns casos transferir plasmídeos resistentes a metais pesados e diferentes antibióticos à população autóctone.

Dessa forma, o estudo de poluição microbiológica do meio aquático reveste-se de importância, uma vez que avalia de algum modo, a qualidade da água utilizada por uma determinada população. Em um reservatório natural cujos índices de coliformes totais e termotolerantes são altos, há presença de contaminação por fezes, fato que concorre para a disseminação de doenças tais como infecções diarreicas, inclusive cólera.

A ocorrência de bactérias pertencentes ao grupo coliforme em águas ambientais e nos moluscos tem sido relatada por diversos pesquisadores: Vieira e Façanha (1994), Lira et al. (2001), Silva et al. (2003a, 2003b), Sousa et al. (2004), Barros et al (2005), Pereira et al (2006), Chiroles-Rubacalba et al. (2007), Kolm e Absher (2008), Vieira et al. (2008), Muñoz et al. (2008), Gonzalez et al. (2009), Sande et al. (2010), Ramos et al. (2010), Gayathri et al. (2011).

Estas pesquisas tiveram por base o monitoramento de indicadores microbiológicos de poluição e qualidade sanitária, tais como os coliformes termotolerantes e mais especificamente a detecção de *Escherichia coli*. Esta é uma bactéria de origem estritamente fecal, como mencionado anteriormente, cujo habitat é o trato intestinal homem e/ou animais de sangue quente e chegam ao mar transportado por esgotos e efluentes como: rios, riachos, córregos e galerias pluviais.

Portanto, é de fundamental importância, do ponto de vista de saúde pública e ambiental, o conhecimento dos níveis de contaminação bacteriológicos nessas espécies, evitando assim, riscos toxicológicos para a população, via ingestão destes organismos crus ou mal cozidos. Garantir a qualidade do produto da pesca para o consumo humano é fundamental para a manutenção desta relevante atividade econômica informal que representa a fonte de subsistência e principal fonte de recursos financeiros para a população litorânea da Bacia do Pina. Além disso, informações sobre os níveis bacteriológicos em amostras de água, bivalves e sedimentos podem constituir uma importante ferramenta no diagnóstico e gerenciamento da qualidade ambiental nessa área.

Durante esta pesquisa, procederam-se coletas de dados ambientais, e análises laboratoriais e estatísticas, que permitiram avaliar a possível utilização dos moluscos bivalves *Anomalocardia brasiliensis* e *Tagelus plebeius* como bioindicadores de poluição orgânica e de qualidade ambiental na Bacia do Pina, área urbana de Recife, Pernambuco, Brasil.

Os dados obtidos durante o desenvolvimento desta pesquisa resultaram na elaboração de dois manuscritos, o primeiro apresenta os resultados relativos aos vibrios e aeromonas intitulado “Bivalves indicadores da presença de vibrios e aeromonas em um estuário tropical do Nordeste do Brasil” que será submetido ao Periódico Marine Pollution Bulletin. O segundo manuscrito, intitulado “Moluscos como indicadores de contaminação microbiológica em um estuário tropical no Nordeste do Brasil” concentra os dados da pesquisa do grupo Coliformes e será submetido para publicação no Periódico Marine Ecological Progress Series. As normas para publicação nos dois periódicos encontram-se nos anexos.

2. REFERÊNCIAS

- BARREIRA, C.A.R.; ARAÚJO, M.L.R. Ciclo reprodutivo de *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin, 1791) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 9-20, 2005.
- BARROS, L.M.O.; THEOPHILO, G.N.D.; COSTA, R.G.; RODRIGUES, D.P.; VIEIRA, R.H.S.F. Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará. *Revista de Ciência Agronômica*, Fortaleza, v. 36, p. 285-289, 2005.

- BELL, K. *Environmental performance indicators*. Wellington: Ministry for the Environment, 1998. 20p.
- BOEHS, G. *Ecologia populacional, reprodução e contribuição em biomassa de Anomalocardia brasiliiana (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil*. 2000. 201 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.
- BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 21, n. 4, p. 865-869, 2004.
- BOEHS, G.; VILLALBA, A.; CEUTA, L.O.; LUZ, R.J. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). *Journal of Invertebrate Pathology*, Califórnia, v.103, n.1, p.43-47, 2010.
- BOFFI, A.V. *Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico*. São Paulo: HUCITEC, 1979. 182 p.
- BRANCO, E.S. *Aspectos da comunidade fitoplanctônica no sistema estuarino de Barra das Jangadas (Jaboatão dos Guararapes – Pernambuco – Brasil)*. 2001. 117 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.
- CAVALLO, R.A.; STABILI, L. Culturable vibrios biodiversity in the Northern Ionian Sea (Italian coasts). *Scientia Marina*, Barcelona, v. 68, Suppl. 1, p. 23-29, 2004.
- CENTRO DE PESQUISA E GESTÃO DE RECURSOS PESQUEIROS DO LITORAL NORDESTE - CEPENE. Boletim da estatística da pesca marítima e estuarina do Nordeste do Brasil - 2006. Tamandaré, PE: CEPENE, 2008. 385 p.
- CHIROLES RUBALCABA, S.; GÓNZALEZ GÓNZALEZ, M.I; TORRES ROJAS, T.; VÁLDEZ AVILA, M. Y DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ, I. Bacterias Indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba). *Revista Higiene y Sanidad Ambiental*, Granada, v.7, p.222-227, 2007.
- CHOPRA, A.K.; HOUSTON, C.W. Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis. *Microbes and Infection*, Paris, v. 1, p. 1129-1137, 1999.
- CLEDÓN, M.; BRICHTOVA, A.C.P.; GUTIÉRREZ, J.L.; PENCHASZADEH, P.E. Reproductive cycle of the stout razor clam, *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786), in the mar

Chiquita coastal lagoon, Argentina. *Journal of Shellfish Research*, Groton, v. 23, n. 2, p. 443–446, 2004.

- COSTA, M.F.; NEUMANN-LEITÃO, S.; SOUZA-SANTOS, L.P. Bioindicadores da qualidade ambiental. In: ESKINAZI-LEÇA, E.; NEUMANN-LEITÃO, S.; COSTA, M.F. (Orgs.) *Oceanografia: um cenário tropical*. Recife: Bagaço, 2004. 761 p.

- CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 22, p. 263-271, 2002.

- DAME, R. F. Organismic level processes. In: DAME, R. F. *Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach*. c. 3, p. 35-74. New York: CRC Press, 1996.

- DIAS, J.F.B.; MESQUITA, E.F.M.; FRANCO, R.M.; JESUS, E.F.O.; OLIVEIRA, L.A.T. Redução da carga bacteriana da ostra nativa [*Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828)] *in natura*, resfriada e congelada, através da radiação gama. *Higiene Alimentar*, São Paulo, p. 224-256, 2003.

- EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; VIEIRA, R.H.S.F.; CARVALHO, F.C.T.; TORRES, R.C.O.; SANT'ANNA, E.; RODRIGUES, D.P.; REIS, C.M.F. *Aeromonas* spp isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 129-133, 2006.

- EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; CARVALHO, F.C.T., VIEIRA, R.H.S.F.; REIS, C.M.F.; MACRAE, A.; RODRIGUES, D.P. Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 41, p. 452-460, 2010.

- GALBIS, D.M.; FARFÁN, M.; LORÉN, J.G.; FUSTÉ, M.C. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 420-430, 2002.

- GAYATHRI, V.; BAHEERATHI, C.G.; REVATHI, K.; SETHI S. Identification of gut microflora from green mussel (*Perna viridis*). *Proceedings of International Conference on Implications of Biotechnology on Biodiversity and its Conservation*, Chennai, v. 10, p. 119-122, 2011.

- GONZÁLEZ, M; GRAÜ, C.; VILLALOBOS, L.B.; GIL, H.; VÁSQUEZ-SUÁREZ, A. Calidad microbiológica de la ostra *Crassostrea rhizophorae* y aguas de extracción, Estado Sucre, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*, Maracaibo, v. XIX, n. 6, p. 659 – 666, 2009.

- HAGLER, A.N.; HAGLER, L.C.S.M. Indicadores Microbiológicos de qualidade sanitária. In: Roitman I, Travassos LR, Azevedo JL (ed.). *Tratado de microbiologia*. São Paulo, v. 1, p. 88-96, 1988.
- HOFER, E.; REIS, C.M.F.; THEOPHILO, G.N.D.; CAVALCANTI, V.O.; LIMA, N.V.; HENRIQUES, M.F.C.M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 39, p. 217-220, 2006.
- ISLAM, M.S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, Oxford, v. 4, p. 624-649, 2004.
- ISONHOOD, J.H.; GERARD, P.; LEENANON, B.; DRAKE, M. Stress response of *Aeromonas hydrophila* following environmental challenges. *Food Microbiology*, Illinois, v. 19, p. 285-293, 2002.
- JANDA, J.M.; ABOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Reviews of Infectious Disease*, Oxford, v. 27, p. 332-44, 1998.
- KASPAR, C.W.; TAMPLIN, M.L. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 59, p. 2425–2429, 1993.
- KOLM, H.E.; ABSHER, T.M. Bacterial density and coliform organisms in waters and oysters of Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 49 – 59, 2008.
- LEBARON. P.; BATAILLER, N.; BALEUX, B. Mobilization of a recombinant nonconjugative plasmid at the interface between wastewater and the marine coastal environment. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 15, p. 61-70, 1994.
- LIPP, E.K.; ROSE, J.B.. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Review Scientific Technical*, v. 16, p.620–640, 1997.
- LIRA, A.A.; BARROS, G.C.; MOTA, R.A. *Vibrio parahaemolyticus* em bivalves comercializados no Grande Recife, PE. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 15, n. 90/91, 2001.
- MACIÁN, M.C.; ARIAS, C.R.; AZNAR, R.; GARAY, E.; PUJALTE, M.J. Identification of *Vibrio* spp. (other than *V. vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural samples. *International Microbiology*, Madrid, v. 3, n. 1, p. 51-3, 2000.

- MARCEL, K.A.; ANTOINETTE, A.A.; MIREILLE, D. Isolation and characterization of *Aeromonas* species from an eutrophic tropical estuary. *Marine Pollution Bulletin*, Oxford, v. 44, p.1341-1344, 2002.
- MARTINS, A.G.L.A.; NASCIMENTO, A.R.; VIEIRA, R.H.S.F.; SERRA, J.L.; ROCHA, M.M.R.M. Quantificação e identificação de *Aeromonas* spp. em águas de superfície do estuário do rio Bacanga em São Luís / MA (Brasil). *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 107-118, 2009.
- MOHLENBERG, F.; RIISGARD, H.U. Efficiency of particle retention in 13 species of suspension feeding bivalves. *Ophelia*, v. 17, p. 239-246, 1978.
- MOTES, M.L.; DEPAOLA, A.; COOK, D.W.; VEAZEY, J.E.; HUNSUCKER, J.C.; GARTHRIGHT, W.E.; BLODGETT, R.J.; CHIRTEL, S.J. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology*. Washigton, v. 64, p. 1459-1465, 1998.
- MUÑOZ, D.; MARÍN, C.G.; VILLALOBOS B., L.B.; MARTÍNEZ, C.; ZERPA, A. Indicadores bacterianos em los mejillones *Perna perna* (Linné, 1758) y *P. viridis* (Linné, 1758) y en aguas de extracción de bivalvos procedentes de la costa norte y sur del estado Sucre, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*, Maracaibo, v. 16, p. 595-606, 2008.
- PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro/RJ. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, Campinas, v. 24, p. 562-566, 2004.
- PEREIRA, C.S.; AMORIM, S.D.; SANTOS, A.F.M.; REIS, C.M.F.; THEOPHILO, G.N.D.; RODRIGUES, D.P. Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de neonatos hospitalizados na cidade do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 41, p.179-182, 2008.
- PEREIRA, M.A.; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R.V. 2006. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea Gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 37, p.159-163, 2006.
- RAMOS, R.J.; PEREIRA, M.A.; MIOTTO, L.A.; FARIA, F.B.; SILVEIRA JUNIOR, N.; VIEIRA, C.R.W. Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 69, n. 1, p.32-39, 2010.

- RIOS, E.C. *Compendium of brazilian sea shells*. Rio Grande: Fundação Cidade do Rio Grande – Museu Oceanográfico, 2009. 368 p.
- SANDE, D.; MELO, T.; OLIVEIRA, G.S.A.; BARRETO, L.; TALBOT, T.; BOEHS, A.J.L. Prospecção de moluscos bivalves no estudo da poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus, Bahia, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 47, p.190-196, 2010.
- SANTOS, T.G.; BEZERRA-JUNIOR, J.L.; COSTA, K.M.P.; FEITOSA, F.A.N. 2009. Dinâmica da biomassa fitoplancônica e variáveis ambientais em um estuário tropical (Bacia do Pina, Recife, PE). *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, São Luís, v. 4, n. 1, p. 95-109, 2009.
- SCHAEFFER – NOVELLI, Y. Perfil dos ecossistemas litorâneos brasileiros, com ênfase sobre o manguezal. *Publicação Especial Instituto Oceanográfico*, São Paulo, n. 7, p. 1-16, 1989.
- 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, Estado do Maranhão). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 25, n. 2, p. 261-266, 2003.
- SILVA, A.I.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENEZES, F.G.R.; FONTELES-FILHO, A.A.; TORRES, R.C.O.; SANT’ANNA, E.S. Bactérias fecais em ostras, *Crassostrea rhizophorae*. *Arquivos de Ciências do Mar*, Fortaleza, v. 36, p. 63-66, 2003a.
- SILVA, A.I.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENEZES, F.G.R.; FONTELES-FILHO, A.A.; TORRES, R.C.O.; SANT’ANNA, E.S. Bacteria of fecal origin in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Cocó river estuary, Ceará state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 34, p. 126-130, 2003b.
- SOARES, H.A.; SCHAEFFER-NOVELI, Y.; MANDELLI JR, J. “Berbigão” *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), bivalve comestível da região da Ilha do Cardoso, estado de São Paulo, Brasil: aspectos biológicos de interesse para a pesca comercial. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 9, p. 21-38, 1982
- SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENEZES, F.G.R.; REIS, C.M.F.; HOFER, E. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó River Estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 59-62, 2004.

SUPLICY, F. A capacidade de suporte nos cultivos de moluscos: está no Decreto, mas poucos sabem exatamente do que se trata. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 57, p. 21-24, jan/fev, 2000.

- VIEIRA, R.H.S.F.; FAÇANHA, S.H.F. Parâmetros físicoquímicos e pesquisa de coliformes totais, fecais e *Vibrio parahaemolyticus* nas águas do rio Cocó, Fortaleza-Ceará. *Revista de Ciência Agronômica*, Fortaleza, v. 25, n. 01/02, p. 24-31, 1994.

- VIEIRA, R.H.S.F.; SILVA, P.R.G.; LEHUGEUR, L.G.O.; SOUSA, O.V. Colimetria da água da praia da Barra do Ceará – Fortaleza – Ceará. *Arquivo de Ciências do Mar*, Fortaleza, v.32, p.119-122, 1999.

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

3. ARTIGO I

Bivalves indicadores da presença de vbrios e aeromonas em um estuário tropical do Nordeste do Brasil

Manuscrito a ser submetido 

Marine Pollution Bulletin

ISSN 0025-326X

Bivalves indicadores da presença de vibrios e aeromonas em um estuário tropical do Nordeste do Brasil

Stefane de Lyra Pinto^{a*}, Deusinete de Oliveira Tenório^b, Emiko Shinozaki Mendes^c, Marcos Souto Alves^a, José Roberto Botelho de Souza^d, Carolina Notaro de Barros^c, Sarah Michele R. Galvão^c

^aUniversidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Dept. de Biologia, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52.171-900 Recife – PE, Brasil,

^bUniversidade Federal de Pernambuco – UFPE, Dept. de Oceanografia, Av. Arquitetura, s/n, Cidade Universitária, 50.740-550 Recife – PE, Brasil

^cUniversidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Dept. de Medicina Veterinária, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52.171-900 Recife – PE, Brasil

^dUniversidade Federal de Pernambuco – UFPE, de Zoologia, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, 50.670-901 Recife – PE, Brasil.

RESUMO

Objetivou-se determinar as espécies e a concentração de *Vibrio* e *Aeromonas* em *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) e água, correlacionar com os fatores ambientais (T°C, S, pH, O₂, DBO) e determinar dentre os moluscos o melhor indicador de contaminação microbiológica na Bacia do Pina, Pernambuco, Brasil. Foram coletadas 24 amostras de cada molusco em dois pontos na Bacia do Pina no período de junho de 2009 a maio de 2010. As espécies de maior ocorrência foram *A. encheleia*, *A. schubertii*, *A. media*, *V. metschnikovii*, *V. haliotocoli*, *V. mytili* e *V. natriegens*. Não houve diferença significativa na composição qualitativa das bactérias em *A. brasiliiana*, *T. plebeius* e a água. Não houve um padrão detectável de variação temporal ou espacial, os microorganismos ocorreram aleatoriamente tanto nos animais como na água, durante todo o período e nos dois pontos de coletas ($P \geq 0,05$). *A. brasiliiana* demonstra ser a espécie melhor indicada como instrumento de aferição de qualidade microbiológica da água, quando comparada com *T. plebeius*.

Palavras-chave: bioindicadores ambientais, poluição microbiológica, bioacumulação, *Anomalocardia brasiliiana*, *Tagelus plebeius*, litoral brasileiro

* Autor para correspondência: Fax: +55 81 33206300

E-mail: s.lyra@db.ufrpe.br

ABSTRACT

The objective was to determine the species and concentration of *Vibrio* and *Aeromonas* in *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) and water; in correlation with environmental factors (T°C, S, pH, O₂, DBO), to determine the best indicator of microbiological contamination in the Pina Basin, in the city of Recife, Brazil. 24 samples were collected at two locations between June 2009 and May 2010. The most frequent species found were *Aeromonas encheleia*, *A. schubertii*, *A. media*, *Vibrio metschnikovii*, *V. halioticoli*, *V. mytili* and *V. natriegens*. No significant differences were found in the qualitative composition of the bacteria *A. brasiliiana*, *T. plebeius*, or water. There is no detectable pattern of temporal or spatial variation, the microorganisms occurred randomly in both animals and in water during the test period and at both collection points ($P \geq 0.05$). The species *A. brasiliiana* proves to be the superior benchmark of microbiological water quality when compared with *T. plebeius*.

Keywords: environmental bioindicators, microbiological pollution, bioaccumulation, *Anomalocardia brasiliiana*, *Tagelus plebeius*, the Brazilian coast

INTRODUÇÃO

O ecossistema manguezal representa uma importante fonte de recursos naturais renováveis, dentre estes, os moluscos bivalves são bastante utilizados como fonte de proteína animal, tanto para o consumo direto da comunidade ribeirinha, como para comercialização. Os bivalves são animais micrófagos, filtradores não seletivos de matéria orgânica particulada, microrganismos em suspensão na água e organismos planctônicos. O nível de absorção de nutrientes depende da temperatura, salinidade e salubridade do ambiente de onde estes moluscos são extraídos. Dessa forma, seu consumo pode representar risco para o homem quando oriundos de áreas poluídas ou contaminadas (Pereira et al., 2004).

A humanidade tem uma longa história de exploração das zonas costeiras e estuarinas, utilizando-as para o comércio, transporte, alimentação e estabelecimento. Essas áreas têm grande importância ecológica para muitas espécies, no entanto, estes ecossistemas são submetidos a uma variedade de pressões antrópicas as quais são responsáveis por impactos ambientais consideráveis (Duffy et al., 2007). Em função do aumento da densidade da população humana na zona costeira, os estuários podem sofrer vários impactos com a entrada de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas. Em função da geomorfologia destas áreas, associadas com os regimes de marés e da descarga fluvial, padrões distintos de circulação são gerados para cada estuário, podendo estes atuar como filtros ou como exportadores de matéria orgânica e inorgânica para áreas costeiras vizinhas (Noriega et al., 2009).

A bioacumulação e a eliminação de bactérias entéricas e vírus por moluscos bivalves variam de acordo com a espécie, o tipo de microrganismo, as condições ambientais e época do ano (Burkhardt III e Calci, 2000). Resultados de exames microbiológicos de moluscos bivalves podem servir como alerta para a saúde pública, no que tange ao controle de infecções alimentares (Dias et al., 2003; Cunha-Neto et al., 2002).

Os bioindicadores ecológicos podem ser usados para avaliar a condição do ambiente ou auxiliar o seu monitoramento ao longo do tempo. Eles podem fornecer um sinal de alerta de mudanças no ambiente, e podem ser utilizados para diagnosticar a causa de um problema ambiental. Também quantificam a magnitude do estresse, o grau de exposição a este estresse ou grau de resposta à exposição (Dale e Beyeler, 2001)

As comunidades bentônicas marinhas e estuarinas são usadas para monitorar a qualidade ambiental, pois cada organismo tem preferência de habitat e apresentam diferentes graus de tolerância a poluição (Pinto et al., 2009) e não refletem apenas as condições no momento da amostragem, mas também as condições que a comunidade foi previamente exposta (Gappa et al., 1990). Os moluscos bivalves são amplamente utilizados como sentinelas para o monitoramento de poluição do ambiente costeiro marinho. Pela sua condição de organismos filtradores, podem vir a bioacumular, através do fluxo de água, grande quantidade de bactérias patogênicas, toxinas marinhas e metais. A concentração dos contaminantes podem se apresentar bem acima dos níveis presentes na água circunvizinha e no sedimento, podem fornecer informações sobre as fontes de poluição local e sua microbiota bacteriana guarda relação com a qualidade do meio onde se encontram (Solé et al., 2000; Graü et al., 2004).

Os estuários urbanos do município de Recife têm grande aporte de efluentes domésticos e outras fontes de poluição orgânica que afetam a qualidade dos produtos da pesca e que comprometem a saúde humana (Feitosa e Passavante, 1990). Assim sendo, objetivou-se determinar a concentração de *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp. nos moluscos *Anomalocardia brasiliensis* e *Tagelus plebeius* da Bacia do Pina, Recife-PE, Brasil; relacionando com os fatores abióticos da água e determinar a melhor espécie bioindicadora da qualidade microbiológica.

MATERIAL E MÉTODOS

O material que fundamentou este trabalho foi procedente do estuário da Bacia do Pina que está localizado na área urbana do município de Recife, Pernambuco, Brasil (08°04'03"S-34°52'16"W), e é formado pela confluência dos rios Tejipió, Jiquiá, Jordão, Pina e pelo braço sul do Capibaribe (Fig. 1). O estuário recebe alto fluxo de descargas oriundos das indústrias e efluentes domésticos e por ser uma área portuária, há um constante tráfego de embarcações. Sua

extensão é de 3,6 km e largura variável, sendo a mínima de 0,26 km e a máxima de 0,86 km, perfazendo uma área total de aproximadamente 2,02 km².

A área estudada apresenta dois períodos climáticos bem definidos pelo regime de precipitação pluviométrica; um período chuvoso que compreende os meses de março a agosto, e um período de estiagem ou seco, que corresponde aos meses de setembro a fevereiro.

O estuário é uma área de importância sócio-econômica, principalmente para os pescadores artesanais que coletam moluscos comestíveis de valor comercial, tais como *A. brasiliana*, *T. plebeius*, *Iphigenia brasiliana* e a *Mytella charruana* (Feitosa et al., 1999).

Fig. 1. Mapa da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, indicando os locais de coletas da água e dos bivalves *Anomalocardia brasiliana* e *Tagelus plebeius* no estuário da Bacia do Pina.

Amostras dos bivalves e da água

Foram realizadas coletas quinzenais de *A. brasiliana*, *T. plebeius* e da água, durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 em dois pontos na Coroa do Passarinho, na Bacia do Pina (Fig. 1). Em maré baixa, os bivalves foram coligidos manualmente no banco de areia, cada amostra constituindo-se de aproximadamente 100 exemplares de cada espécie com tamanho médio de 19,16 mm (*A. brasiliana*) e 35,00 mm (*T. plebeius*), com a finalidade de se obter 80 g do material intravalvar para a realização das análises. Os exemplares foram devidamente acondicionados em sacos plásticos identificados e mantidos em recipiente isotérmico. A água foi coletada nos locais de extração dos moluscos em garrafas estéreis de 200 ml e acondicionada em caixa isotérmica. Todo o material foi transportado ao Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (LICAL) do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde as análises bacteriológicas foram realizadas.

No laboratório, os bivalves foram lavados em água corrente e limpos com escova para remoção de todo material incrustado em sua concha. As valvas foram abertas assepticamente e o líquido intravalvar e parte mole foram transferidos para um recipiente estéril e pesados 25 g de cada espécie, o qual foi homogeneizado em 225 ml de Água Peptonada Alcalina (APA) em stomacher durante 1 minuto, perfazendo a diluição 10⁻¹, a partir da qual foram feitas diluições subsequentes (10⁻² e 10⁻³). A identificação dos vibrios e aeromonas nos moluscos e na água foi realizada conforme método citado por Silva et al. (2007) e Palumbo et al. (1985), respectivamente. Foi realizada a contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas contendo entre 25 e 250 colônias. As colônias características foram selecionadas e isoladas em tubos com Ágar Triptona de Soja (TSA), sendo que para os *Vibrio* foi suplementado com 2,0% de cloreto de sódio (NaCl) e incubados por 24 horas. Decorrido esse

período, os isolados foram submetidos a testes bioquímicos, baseados em métodos descritos por Buller (2004), Holt et al. (1994) e Silva et al. (2007), para a identificação das espécies.

Variáveis ambientais

A temperatura da água foi registrada *in situ* com auxílio de um termômetro comum de álcool submerso nos pontos de coletas. As amostras para determinação dos parâmetros hidrológicos foram coletadas na lâmina d'água adjacente ao banco de areia, de acordo com os procedimentos usuais. A salinidade foi determinada método de Morh-Knudsen e o oxigênio dissolvido na água (OD) pelo método de Winkler, ambos descritos por Strickland e Parsons (1972); a demanda bioquímica do oxigênio (DBO) pela técnica descrita no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (Apha, 1985); a taxa de saturação do oxigênio foi determinada, utilizando-se a tabelas Oceanográficas Internacionais (Unesco, 1986); o pH foi medido através de um pH-metro de bancada. As análises de água para a determinação dos parâmetros físico-químicos foram realizadas no Laboratório de Oceanografia Química do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco.

Os dados de precipitação pluviométrica foram cedidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), ponto do Curado, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – 3º DISME. Foi verificado o acumulado pluviométrico de dez dias anteriores a cada coleta, durante todo o período da pesquisa.

Análise estatística

Os dados foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade e posteriormente foi feito o escalonamento multidimensional (MDS) a partir de uma matriz de similaridade, utilizando o índice de Bray-Curtis, com os dados de abundância de bactérias nos três substratos *A. brasiliana* e *T. plebeius* e água, não transformados. As análises foram feitas com os programas Primer 6.2. e Permanova (Anderson, 2005).

Os dados de abundância das bactérias e fatores abióticos (OD, DBO, salinidade, pH, temperatura da água e índice de precipitação) foram analisados através de correlação múltipla e a significância testada através de teste t.

RESULTADOS

Dados abióticos

A temperatura da água na Bacia do Pina apresentou pequena amplitude térmica com valores oscilando entre 25,5°C e 30°C, com média de 28,13 °C no ponto 1 e entre 27°C e 32°C, com média de 29,13 no ponto 2 (Fig. 2), sendo a diferença entre os dois pontos significativa

($F_{(1,46)} = 7,59$; $p = 0,008$), mas sem diferença significativa entre o período chuvoso e seco ($F_{(1,46)} = 0,10$; $p = 0,75$)

O OD variou de valores indetectáveis (condição de anoxia) nos dois pontos, no mês de junho/2009 a $11,43 \text{ ml l}^{-1}$ no ponto 2 no mês de outubro/2009, com média de $3,04 \pm 1,60 \text{ ml l}^{-1}$ no ponto 1 e $3,27 \pm 2,18 \text{ ml l}^{-1}$ no ponto 2. Com relação ao percentual de saturação, observaram-se algumas oscilações, com mínimo de 0% nos dois pontos e máximos de 155,36% e 253% nos pontos 1 e 2, respectivamente (Fig. 2), sem diferença significativa entre os dois pontos ($F_{(1,46)} = 0,17$; $p = 0,680$), mas com diferença significativa entre o período chuvoso e seco ($F_{(1,46)} = 4,127$; $p = 0,048$).

Fig. 2 – Variação mensal da temperatura da água, oxigênio dissolvido e saturação do oxigênio durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)

Com relação à DBO, variou de valores indetectáveis nos dois pontos e o maior foi $14,33 \text{ mg l}^{-1}$ no ponto 2, no mês de outubro/2009. As médias nos dois pontos para esta variável ambiental foram $1,67 \pm 2,48 \text{ mg l}^{-1}$ e $1,84 \pm 3,32 \text{ mg l}^{-1}$, nos pontos 1 e 2, respectivamente (Fig. 3), sem diferenças significativas entre os dois pontos ($F_{(1,46)} = 0,04$; $p = 0,84$), e entre o período chuvoso e o seco ($F_{(1,46)} = 0,58$; $p = 0,449$).

A salinidade variou entre 10,84 (julho/2009) e 31,81 (março/2010), os menores teores foram registrados nos meses com maior precipitação pluviométrica e aporte de água doce proveniente dos rios adjacentes à área (Fig. 3), com diferença significativa entre os dois pontos. No ponto 1 foi significativamente maior do que no ponto 2 ($F_{(1,46)} = 10,605$; $p = 0,002$), e no período seco foi significativamente maior do que no chuvoso ($F_{(1,46)} = 10,417$; $p = 0,0023$).

Fig. 3 – Variação mensal da DBO e da salinidade durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)

Quanto ao potencial hidrogeniônico da água (pH), houve pequena variação, estando sempre alcalino durante todo o período estudado. O menor pH foi de 7,05 no ponto 2, em janeiro/2010 e o maior foi de 8,16 no ponto 2, em junho de 2009 (Fig. 5).

A precipitação pluviométrica variou de um mínimo de 0,00 mm em outubro e dezembro de 2009, e máxima de 11,85 mm com média $4,91 \pm 3,87 \text{ mm}$, sendo a diferença entre os dois períodos significativa ($F_{(1,46)} = 9,306$; $p = 0,004$).

Fig. 4. Variação mensal do pH e da precipitação durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)

Dados bióticos

Foram isoladas 21 espécies de *Vibrio* e nove espécies de *Aeromonas* ao longo do estudo em *Anomalocardia brasiliana*, *Tagelus plebeius* e água, sendo que *Vibrio neptunius*, *V. penaeicida* e *Aeromonas veronii sobria* ocorreram apenas na água. *V. vulnificus* e *A. caviae* ocorreram apenas em *T. plebeius* e nenhuma espécie ocorreu exclusivamente em *A. brasiliana* (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Espécies de *Vibrio* spp. isoladas da água e dos bivalves *A. brasiliana* e *T. plebeius* durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

Tabela 2 - Espécies de *Aeromonas* spp. isoladas da água e dos bivalves *A. brasiliana* e *T. plebeius* durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

Do total de 30 espécies entre *Vibrio* e *Aeromonas* isoladas, 23 estiveram presentes em *A. brasiliana*, das quais nove são patogênicas para o ser humano. As mais frequentes foram *Aeromonas schuberti* e *A. encheleia* e com menor frequência, *V. agarivorans* e *V. ordalii*. De acordo com a diversidade de bactérias por amostra, o número de espécies encontradas em *A. brasiliana* variou de 0 a 8, com moda de duas espécies de bactérias/amostra.

Foram identificadas 25 espécies de bactérias em *T. plebeius*, sendo 11 patogênicas para seres humanos. As mais frequentes foram *V. metschnikovii*, *V. halioticoli*, e *A. encheleia* e *Aeromonas schuberti* e com menor frequência foram isoladas *V. natriegens*, *V. vulnificus* e *A. sobria*. Com relação à diversidade desses microrganismos por amostra, foram encontradas entre 0 a 6, em *T. plebeius*, com moda de três espécies de bactérias/amostra.

Nas amostras de água 26 espécies de *Vibrio* e *Aeromonas* foram isoladas, destas onze são patogênicas para humanos. Foi registrado como mais frequentes *A. schubertii*, seguida de *A. media*, e *V. metschnikovii*. As espécies *V. neptunius*, *V. xuii* e *A. sobria* foram isoladas com menor frequência. Com relação à diversidade por amostra de água, o número de espécies variou entre 0 a 6, com moda de três espécies de bactérias/amostra.

As associações de bactérias dos gêneros *Aeromonas* e *Vibrio* não apresentaram uma estrutura distinta entre os três substratos: *A. brasiliiana*, *T. plebeius* e na água, como pode ser observada na figura 4. Não sendo observada diferença significativa entre os três substratos ($F_{(2,22)}=0,84$; $P= 0,9029$).

Fig. 5. Escalonamento multidimensional das espécies de *Vibrio* e *Aeromonas* na água (A) e nos bivalves *Anomalocardia brasiliiana* (Ab) e *Tagelus plebeius* (T) durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

As várias espécies de bactérias estão fracamente correlacionadas com os parâmetros ambientais, sendo o maior coeficiente de determinação encontrado de 36,8% para a presença de *V. alginolyticus* com a DBO.

As espécies que apresentaram correlação com OD *Vibrio alginolyticus* ($r= 0,46$; $<0,0001$) e *A. brasiliiana*; *V. diazotrophicus* na água ($r= 0,431$; $p= 0,002$) e em *T. plebeius* ($r= 0,337$; $p= 0,033$) e *V. metschnikovii* ($r= -0,293$; $p= 0,047$) na água.

As espécies que estão correlacionadas com DBO foram *V. alginolyticus* ($r= 0,606$; $p <0,0001$) em *A. brasiliiana*, *V. diazotrophicus* na água ($r= 0,297$; $p= 0,044$); as espécies correlacionadas com a salinidade foram *A. veronii veronii* ($r= -0,320$; $p= 0,033$) em *A. brasiliiana*, *A. eucrenophila* ($r= 0,297$; $p= 0,044$), *A. media* ($r= 0,297$; $p= 0,002$), *V. agarivorans* ($r= 0,343$; $p= 0,019$) e *V. penaeicidae* ($r= -0,327$; $p= 0,026$) na água.

A correlação das espécies com a temperatura da água foi observada em *A. veronii veronii* ($r= -0,419$; $p= 0,004$) em *A. brasiliiana*, *V. diazotrophicus* ($r= 0,407$; $p= 0,009$) em *T. plebeius* e na água ($r= 0,524$; $p= 0,002$), *V. penaeicida* ($r= -0,379$; $p= 0,009$) e *A. veronii sobria* ($r= -0,347$; $p= 0,017$) na água.

O pH está correlacionado com *V. fluvialis* ($r= -0,309$; $p= 0,040$) em *Anomalocardia brasiliiana*, *V. cincinnatiensis* ($r= 0,402$; $p= 0,010$) e *V. vulnificus* ($r= 0,320$; $p= 0,043$) em *T. plebeius* e *A. schubertii* ($r= -0,307$; $p= 0,037$) isoladas da água.

O índice de precipitação pluviométrica está correlacionado com *V. diazotrophicus* ($r= -0,307$; $p= 0,037$) e *A. media* ($r= 0,365$; $p= 0,012$) isolados da água.

O número e a diversidade de *Vibrio* patogênicos para seres humanos encontrados nos moluscos e na água foram próximos, exceto *V. ordalii* presente em *A. brasiliiana* e *T. plebeius*, *V. vulnificus* encontrada apenas em *T. plebeius* e *V. penaeicida* ocorreu apenas na água. Em relação às espécies patogênicas de *Aeromonas*, foram isoladas *A. allosaccharophila* e

A. veronii veronii em *Anomalocardia brasiliana*, *Aeromonas caviae*, *A. sobria* e *A. veronii veronii* em *T. plebeius* e *A. allosaccharophila*, *A. sobria* e *A. veronii sobria* na água.

A contagem de vibrios (Tabela 3) e de *Aeromonas* (Tabela 4) (UFC ml⁻¹ ou g⁻¹) em *Anomalocardia brasiliana* e em *T. plebeius* foi superior quando comparada a da água. Não sendo observada diferença significativa entre os períodos chuvoso e seco nos três substratos.

Tabela 3 – Média da contagem de *Vibrio* spp. (UFC ml⁻¹ ou g⁻¹) na água e nos bivalves *Anomalocardia brasiliana* e *Tagelus plebeius* nos dois pontos de coleta durante o período de junho de 2009 a maio de 2010, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

Tabela 4 – Média da contagem de *Aeromonas* spp. (UFC ml⁻¹ ou g⁻¹) na água e nos bivalves *Anomalocardia brasiliana* e *Tagelus plebeius* nos dois pontos de coleta durante o período de junho de 2009 a maio de 2010, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

DISCUSSÃO

O estuário da Bacia do Pina é reconhecidamente uma área com forte impacto ambiental, proveniente de galerias fluviais, efluentes domésticos e resíduos industriais, tendo, além disso, alto fluxo de embarcações o que torna este ambiente propício à proliferação de microrganismos. Os bivalves estudados, *A. brasiliana* e *T. plebeius*, devido aos seus hábitos filtradores, têm sido apontados como potenciais indicadores de contaminação microbiológica, não só por bactérias ambientais, como por aquelas consideradas patogênicas. Os *Vibrios* e *Aeromonas* isolados das partes moles dos moluscos e da água da Bacia do Pina, entretanto, apesar de apresentarem alta diversidade de espécies (30) não demonstraram um padrão detectável de associações típicas entre uma ou um grupo de bactéria com algum dos moluscos analisados, e os pontos 1 e 2 do estuário do Pina, não apresentaram diferenças significativas quanto a qualidade microbiológica.

Em estuários europeus, espécies do gênero *Mytillus* são amplamente utilizados como indicadores de qualidade ambiental a exemplo de Ripabelli et al. (1999) que em estudo utilizando *M. galloprovincialis* de um estuário na Itália, encontraram *Vibrio alginolyticus* (32,2%), *V. vulnificus* (17.7%), *V. cincinnatiensis* (3,2%), *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* e *V. cholerae* não O1 em apenas 1,6%. La Rosa et al. (2001) estudaram a variação da comunidade de bactérias numa área de cultivo de *M. galloprovincialis* na Baía de Gaeta (Mediterrâneo), Stabili et al. (2005) encontraram concentrações elevadas de *Vibrio* em *M. galloprovincialis* no Mar do Golfo de Taranto (Itália) com resultados semelhantes aos do presente estudo.

A presença de *Vibrio* tem sido comumente reportada em outros mitilídeos e também outros animais marinhos. Em Sucre (Venezuela), Graü et al. (2004) encontraram três espécies de

Vibrio ao estudarem as condições sanitárias de *Arca zebra* e *Perna perna*, com predomínio do *Vibrio alginolyticus* em ambos os moluscos. Pereira et al. (2007) estudando o mexilhão *Perna perna* da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil, encontraram *V. alginolyticus* (19%), *V. cholerae* não-O1 (17%), *V. parahaemolyticus* (8%), *V. carchariae* (6%), *V. vulnificus* (4,4%) e *V. damsela* (4,4%) e mais três espécies em baixa frequência. Mendes et al. (2009) avaliando a qualidade microbiológica da água e do camarão *Litopenaeus vannamei* de fazendas de cultivo do litoral de Pernambuco, Brasil, identificaram *V. anguillarum* (16,5%), *V. fluvialis* (15%), *V. parahaemolyticus* (13%), *V. vulnificus* (8,5%), *V. damsela* (8,5%), *V. carchariae* (7%), *V. proteolyticus* (5,5%), *V. harveyi* (5,5%), *V. hollisae* (5,5%), *V. cincinnatiensis* (4,25%), *V. metschnikovii* (4,25%), *V. fischeri* (4,25%), *V. mimicus* (1,25%) e *V. mediterranei* (1%).

Sousa et al. (2004) encontraram uma única amostra com a presença de *V. parahaemolyticus* em *Crassostrea rhizophorae* no estuário do Rio Cocó (Ceará, Brasil). Pereira et al. (2006), estudando a qualidade microbiológica da ostra *Crassostrea gigas* de três áreas de cultivo e de pontos onde são comercializadas na região litorânea de Santa Catarina, Brasil, não isolaram *V. cholerae* e nem *V. parahaemolyticus*. Nesta pesquisa, *V. parahaemolyticus* teve um percentual inferior a 4% nos moluscos e de apenas 5,27% na água, estando de acordo com o estabelecido na Resolução RDC nº 12/01 (Brasil, 2001) em que o nível máximo aceitável desta espécie em frutos do mar consumidos não crus é de 10^3 UFC/g.

Macián et al. (2000) encontraram uma grande abundância de *Vibrio* nas amostras de água em Valência (Espanha), com predominância de *V. harveyi* (24%), *V. splendidus* (19%) e *V. alginolyticus* (8%). Serra et al. (2003) analisando as condições da água do estuário do Rio Anil (Maranhão, Brasil) onde são extraídos moluscos de interesse econômico, encontraram em mais de 50% das amostras o *V. parahaemolyticus*. Estes registros indicam que os *Vibrio* não atendem a um padrão específico de distribuição espacial ou temporal, estando a sua distribuição presumivelmente relacionada com a concentração e a natureza dos efluentes que desembocam nas áreas costeiras, podendo ocorrer em outros organismos aquáticos, embora a maior concentração das bactérias seja reportada para bivalves filtradores.

Alta frequência de isolados de *Aeromonas* é comum em estuários tropicais. Marcel et al. (2002) observaram a presença de *A. sobria*, *A. hydrophila* e *A. caviae* com maior frequência na área urbana do estuário de Ebrie (Côte d'Ivoire, África) (82,53%). Martins et al. (2009) encontraram em água do estuário do Rio Bacanga (Maranhão, Brasil) as espécies *A. caviae* (52,7%), *A. hydrophila* (23,8%), *A. veronii* (19,5%) e *A. sobria* (3,7%). Evangelista-Barreto et al. (2010) pesquisando a presença de *Aeromonas* na água do estuário do Rio Cocó, na região de Sabiaguaba (Ceará, Brasil) identificaram sete espécies *A. caviae* (42,0%), *A. veronii* bv.

sobria (19,0%), *A. veronii* bv. *veronii* (11,0%), *A. trota* (7%), *A. media* (7%), *A. sobria* (6%) *Aeromonas* spp. e *A. hydrophila* (3%).

A frequência de isolados de *Aeromonas* na água está diretamente relacionada com a quantidade de matéria orgânica, inclusive fezes humanas (Marcel et al., 2002), estes autores sugeriram que *Aeromonas* poderiam ser boas indicadoras de contaminação fecal na água.

No presente estudo, a presença de excrementos fecais no ambiente foi observada *in loco*, indicando que aquela área recebe grandes aportes de esgotos domiciliares e resíduos sanitários, provenientes das comunidades ribeirinhas, desprovidas de saneamento básico, porém, a frequência de isolados de *Aeromonas* na água foi menor do que o relatado por outros autores, provavelmente, devido ao ambiente estudado receber um grande aporte de massa d'água oceânica durante as preamares, mantenedora da alta resiliência daquele ambiente, e que resulta na diluição da concentração das bactérias.

Assim, a bactéria *Aeromonas* ocorre nos bivalves estudados, elas também são comuns em outros organismos marinhos. Pereira et al. (2004) estudando *Perna perna* no Rio de Janeiro, Brasil, encontraram *A. media* (12,36%), *A. hydrophila* (10%), *A. veronii veronii* (7,10%), *A. caviae* (5,80%) e *Aeromonas* sp. (4,73%), entre outras, com maior frequência no período seco. Evangelista-Barreto et al. (2006) identificaram oito espécies de *Aeromonas*, em *Crassostrea rhizophorae* de um estuário tropical no Ceará, Brasil, sendo as mais frequentes *A. veronii sobria* (43%), *A. veronii veronii* (43%), *A. media* (37%) e *A. caviae* (23%).

As espécies *Vibrio* isoladas neste estudo são cosmopolitas, fortemente adaptadas a ambientes costeiros de áreas urbanas com grande aporte de efluentes domésticos, tanto de águas de clima tropical como temperado. Contudo, a não detecção um padrão de associação – água x moluscos – simultaneamente, e a sua presença, em um ou outro meio, pode ser devido ao acaso, aferido através de análises pontuais. Cavallo e Stabilli (2002) em área de cultivo de *Mytillus galloprovincialis* em Mar de Piccolo (Itália), isolaram o *Vibrio alginolyticus*, o *V. mediterranei*, o *V. parahaemolyticus*, o *V. diazotrophicus*, o *V. nereis* e o *V. splendidus* tanto na água como no molusco.

Cerutti e Barbosa (1991) demonstraram que não existe uma real simultaneidade entre amostras de água e amostras de bivalves; a água fornece a microbiota no momento da coleta e os bivalves correspondem à integração total ou parcial das características microbiológicas e ambientais da massa d'água que se sucederam antes da coleta. Neste trabalho observou-se o mesmo fato e recomenda-se que, para se estabelecer se há uma relação direta e simultânea, entre os microrganismos presentes na água e o mecanismo de filtração dos bivalves, seria recomendável que as coletas de água fossem efetuadas dois ou três dias anteriores e posteriores à coleta dos moluscos.

Os resultados desse estudo não permitiram detectar qualquer padrão de correspondência entre os vibrios presentes na água e os isolados dos bivalves estudados, contudo, todas as espécies de bactérias isoladas das partes moles dos bivalves ocorrem na água, uma vez que a alimentação e respiração dos moluscos são realizadas através da corrente ventilatória e filtração da água na cavidade do manto, portanto, a contaminação ocorre exclusivamente por via hídrica. Dessa forma, uma bactéria que foi encontrada no molusco e não detectada nas amostras de água, é indicativo de que o processo de filtração ocorreu antes da captura do molusco. A microbiota isolada nos bivalves reflete as condições de qualidade da água anteriores à sua coleta e a isolada da água pode refletir os microrganismos de fontes exógenas e/ou oriundas do próprio bivalve.

Romalde e Barja (2010) reportam que espécies de moluscos - em estágios larvar, juvenil e adulto – podem servir de hospedeiros para vibrios patogênicos, que podem se proliferar nas brânquias, hemolinfa, manto, velum e tecidos internos. Os microrganismos presentes na água do mar são acumulados no interior dos moluscos principalmente no hepatopâncreas e no divertículo digestivo, o que pode vir a representar um perigo quando os moluscos são coletados ou cultivados em locais que recebem efluentes, já que as bactérias e vírus dessa fonte contaminante são acumulados e, no interior do corpo dos moluscos a concentração desses microrganismos torna-se, muitas vezes superior a da água em que se encontram (Corrêa et al., 2007).

Cerutti e Barbosa (1991) afirmaram que além da adaptação da bactéria ao ambiente marinho, fatores como a resistência bacteriana à degradação enzimática e utilização do conteúdo digestivo como fonte de nutrientes são provavelmente decisivos na seleção das bactérias pelos bivalves.

A bioacumulação de microrganismos no interior da parte mole do molusco presumivelmente não se deve exclusivamente a fonte exógena – água, uma vez que o molusco pode funcionar como um meio de cultura para proliferação da bactéria e, inclusive, atuar como um hospedeiro temporário. Dessa forma, as bactérias presentes na água podem ter como origem os excrementos fecais e outros materiais expelidos com a água pelo sifão exalante.

Nos organismos que se alimentam por filtração, os fatores que determinam essa concentração são o tipo de espécie, localização na coluna de água e o tempo de permanência na água (Sousa et al., 2004). Lira et al. (2001) pesquisando a presença de *V. parahaemolyticus* em *Crassostrea rhizophorae* e *Mytella charruana* do estuário do Canal de Santa Cruz, Itapissuma (Pernambuco, Brasil), registraram densidades mais elevadas no sururu ($5,8 \times 10^4$ UFC mg⁻¹) e na ostra ($3,0 \times 10^4$ UFC mg⁻¹) do que na água. Neste trabalho, as espécies *V. cincinnatiensis*, *V. fischeri*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. mediterranei* e *V. metschnikovii* ocorreram em maiores concentrações nos bivalves do que na água. Presumivelmente, o hidrodinamismo reduziu a concentração de bactérias na água, mas as bactérias remanescentes, retidas na massa visceral dos

moluscos, se proliferaram aumentando a sua concentração e, podem ter retornado à coluna d'água durante a corrente ventilatória, característica do metabolismo do animal.

A distribuição e a dinâmica das bactérias são influenciadas por fatores ambientais, como a temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes e fatores biológicos, como a predação e a abundância de dinoflagelados e hospedeiros (Thompson e Polz, 2006). DePaola et al. (1990) em amostras de bivalves, encontraram maiores densidades de *V. parahaemolyticus* em águas tropicais quando comparados com os procedentes de região temperada e concluíram que, a temperatura da água foi o parâmetro ambiental correlacionado significativamente com a densidade, com a distribuição sazonal e espacial nos dois locais estudados. La Rosa et al. (2001) estudaram a variação da comunidade de bactérias numa área de cultivo de *M. galloprovincialis* na Baía de Gaeta (Mediterrâneo) e encontraram maiores abundâncias de vibrios na primavera e inverno com densidades que variaram entre 10^2 a 10^3 UFC 100 ml⁻¹. Registraram que o parâmetro ambiental que mais interferiu nas altas densidades foi a temperatura da água. Cavallo e Stabilli (2004) estudando a presença de espécies de *Vibrio* na superfície da água no Mar de Ionian, na costa da Itália, encontraram valores mais altos no período do verão-outono, com densidades variando de $0,7 \times 10$ UFC ml⁻¹ a $2,0 \times 10$ UFC ml⁻¹. Stabili et al. (2005) encontraram concentrações mais elevadas de *Vibrio* em *M. galloprovincialis* ($2,7 \times 10^5$ UFC g⁻¹) do que na água ($0,7 \times 10$ UFC g⁻¹) em um estuário do Golfo de Taranto (Itália); correlação significativa com a temperatura da água e a maior concentração de bactérias no mexilhão foi detectada no verão e os menores no período do inverno tanto na água como no molusco.

No entanto, correlação de densidade de bactérias com a temperatura e outras variáveis não é consensual. Urakawa e Rivera (2006) afirmaram que, em águas tropicais e subtropicais a variação de vibrios é baixa. Molitoris, et al. (1985) encontraram *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus* em temperaturas entre 29° e 32°C e não constatarem a influência da temperatura da água como fator limitante para a presença dessas espécies em águas tropicais.

A ausência de correlação entre a temperatura da água e a frequência de isolados de *Vibrio* e *Aeromonas* é atribuída à pequena amplitude apresentada por esta variável no local estudado. Serra et al. (2003) registraram resultados semelhantes em relação a presença de *Vibrio* e os parâmetros abióticos no estuário do Rio Anil (Maranhão, Brasil) e atribuiu a ausência de variação pela localização ser próxima ao Equador. Costa et al. (2010) também encontraram ausência de correlação entre a temperatura e o densidade de *Vibrio* da água de um estuário no Ceará, Brasil, e atribuem a variação insignificante da distribuição de espécies na área, devido a estabilidade da temperatura e do pH da água.

Neste estudo, embora a diversidade em espécies de vibrios seja alta, a densidade populacional é baixa e não apresenta correlação com a temperatura ou com qualquer outro

parâmetro ambiental investigado. As variáveis ambientais podem ser determinantes na explicação de padrões de distribuição de bactérias, porém, as concentrações das espécies de bactérias apresentaram uma correlação fraca com os fatores ambientais e não houve correlação simultânea entre os substratos – água, *T. plebeius* e *A. brasiliensis*. A distribuição das bactérias na Bacia do Pina não apresenta um padrão definido de distribuição espacial, demonstrando ocorrência ocasional e não são influenciadas pelos períodos climáticos – chuvoso e seco.

Pelo fato das *Aeromonas* serem autóctones de ambientes aquáticos, essas bactérias se adaptam e sobrevivem às mudanças ambientais, podendo ser usadas como indicadoras do estado trófico das águas (Isonhood et al., 2002). A capacidade de crescer em temperaturas extremas varia entre as espécies de *Aeromonas* e parece estar intimamente relacionada à sua origem. Evangelista-Barreto et al. (2010) encontraram densidades de *Aeromonas* spp. variando de <10 para $1,4 \times 10^4$ UFC ml⁻¹ nas águas do estuário do rio Cocó (Ceará, Brasil) e de <10 a $4,0 \times 10^4$ UFC ml g⁻¹ em *Crassostrea rhizophorae* do mesmo estuário (Evangelista-Barreto et al., 2006).

A temperatura da água é um fator importante no ambiente, contudo, em áreas tropicais, esta não chega a ser limitante, tendo apresentado, no ambiente estudado, valores dentro do esperado para um ambiente estuarino, com discreto padrão de variações entre os períodos chuvoso e seco. Desta forma, a temperatura da água durante o período estudado apresentou as condições favoráveis para a presença de *Aeromonas*, o que corrobora com os resultados de Martins et al. (2009) ao investigarem a presença de *Aeromonas* no estuário do Rio Bacanga (Maranhão, Brasil). Sousa e Souza (2001) também observaram maior contagem de *Aeromonas* no período de maior temperatura da água, assim como Urriza et al. (2000), que também constataram maior número de isolamento de *Aeromonas* nos meses mais quentes.

A salinidade é uma variável ambiental que influencia na delimitação espacial e temporal das bactérias. No estuário da Bacia do Pina, a salinidade variou em função da precipitação, sendo significativamente maior no verão e no ponto 1. De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama, 2005), os valores encontrados neste estudo para as amostras de água enquadram estas como salobras (0,5 a 30), típicas de estuários tropicais. A salinidade pode atuar como fator limitante na proliferação das *Aeromonas* (Knøchel, 1990; Marcel et al., 2002), apesar de não se ter verificado correlação entre a concentração das bactérias e a salinidade.

O pH da Bacia do Pina foi caracteristicamente alcalino durante o período estudado e corrobora com os estudos de Feitosa et al. (1999), Nascimento et al. (2003) e Martins et al. (2009). *Aeromonas* toleram valores altos de pH. Tsai e Chen (1996) constataram que *Aeromonas* se desenvolveram em faixas de pH que variam de 5,5 a 9,0. Assim, os valores de pH observado

na água da Bacia do Pina presumivelmente são favoráveis ao crescimento de *Aeromonas* e *Vibrio*, porém, sem correlação entre a densidade e pH.

Os valores de OD estiveram abaixo do preconizado na Resolução nº 357 do CONAMA (Conama, 2005), na qual é citada que, águas salobras, onde haja pesca ou cultivos de organismos para fins de consumo intensivo, devem apresentar uma medida de OD não inferior a 4 mg l⁻¹. Valores mais elevados da Demanda Bioquímica do Oxigênio (DBO) coincidiram com as maiores taxas de saturação do OD, exceto em abril/2010. O percentual de saturação variou de 0% a 253% possivelmente em decorrência da variação de aporte de matéria orgânica, trazida pelos efluentes domésticos oriundos dos rios que deságuam na Bacia do Pina. Os dados de DBO e OD estiveram correlacionados com três espécies de víbrios, porém com baixo poder explicativo.

CONCLUSÕES

A ausência de padrão de distribuição espacial e temporal das concentrações de bactérias e a falta de correlação entre as concentrações e as variáveis dos parâmetros ambientais, mostram que a Bacia do Pina comporta uma grande diversidade de espécies de bactérias ambientais e patogênicas na água, porém a ocorrência é ocasional e influenciada por aportes de efluentes de diversas origens.

Os bivalves *A. brasiliiana* e *T. plebeius*, devido aos mecanismos de filtração, são contaminadas por via hídrica e apresentam respostas fisiológicas de bioacumulação de bactérias, se caracterizando, também como potenciais exportadores de bactérias para a água.

A ausência de diferença significativa na composição qualitativa das bactérias em *T. plebeius* e *A. brasiliiana* indica que ambas as espécies possuem capacidade de bioacumular, exibindo excelente característica como indicadoras de contaminação bacteriana e de poluição orgânica na água.

Devido à maior abundância, a maior amplitude de distribuição espacial, a alta frequência de ocorrência, ao menor de esforço de captura e maior resistência, *A. brasiliiana* demonstra ser a espécie melhor indicada como instrumento de aferição de qualidade microbiológica da água, quando comparada com *T. plebeius*.

REFERÊNCIAS

Anderson, M.J., 2005. Permanova: a Fortran computer program for permutational multivariate analysis of variance. Department of Statistics, University of Auckland, New Zealand.

Apha, 1985. Standard Methods for the Examination of water waste-water, sixteen ed., New York.

- Brasil. 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rdc.htm>. Acesso em 18 de setembro de 2009
- Buller, N.B., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. CABI Publishing:Cambridge.
- Burkhardt III, W., Calci, K.R., 2000. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1375-1378.
- Cavallo, R.A., Stabili, L., 2002. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). Water Res. 36, 3719–3726.
- Cavallo, R.A.; Stabili, L., 2004. Culturable vibrios biodiversity in the Northern Ionian Sea (Italian coasts). Sci. Mar. 68, 23-29.
- Cerutti, R.L., Barbosa, T.C.P., 1991. Flora bacteriana heterotrófica em ostras (*Crassostrea rhizophorea*) e águas da Baía Norte, Ilha de Santa Catarina, Brasil. Rev. Microb. 22, 330-334.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), 2005. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a qualidade dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em 18 de setembro de 2009
- Corrêa, A.A., Albarnaz, J.D., Moresco, V., Poli, C.R., Teixeira, A.L., Simões, C.M.O., Barardi, C.R.M., 2007. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Mar. Environ. Res. 63, 479-489.
- Costa, R.A., Silva, G.C., Peixoto, J.R.O., Vieira, G.H.F., Vieira, R. H.S.F., 2010. Quantification and distribution of vibrio species in water from an estuary in Ceará-Brazil impacted by shrimp farming. Braz. J. Oceanogr. 58 (3), 183-188.
- Cunha-Neto, A., Silva, C.G.M., Stamford, T.L.M., 2002. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. Ciênc. Tecnol. Aliment. 22, 263-271.
- Dale, V.H., Beyeler, S.C., 2001. Challenges in the development and use of ecological indicators. Ecol. Indic. 1, 3–10.

- DePaola, A.; Hopkins, L.H.; Peeler, J.T., Wentz, B., McPhearson, R.M., 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. Coastal Waters and Oysters. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2299-2302.
- Dias, J.F.B., Mesquita, E.F.M., Franco, R.M., Jesus, E.F.O., Oliveira, L.A.T., 2003. Redução da carga bacteriana da ostra nativa [*Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828)] *in natura*, resfriada e congelada, através da radiação gama. Hig. Aliment. 224-256.
- Duffy, J.E., Cardinale, B.J., France, K.E., McIntyre, P.B., Thébault, E., Loreau, M., 2007. The functional role of biodiversity in ecosystems: incorporating trophic complexity. Ecol. Lett. 10, 522–538.
- Evangelista-Barreto, N.S.; Vieira, R.H.S.F.; Carvalho, F.C.T.; Torres, R.C.O.; Sant’anna, E.; Rodrigues, D.P.; Reis, C.M.F., 2006. *Aeromonas* spp isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 48, 129-133.
- Evangelista-Barreto, N.S., Carvalho, F.C.T., Vieira, R.H.S.F.; Reis, C.M.F., Macrae, A., Rodrigues, D.P., 2010. Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. Braz. J. Microbiol. 41, 452-460.
- Feitosa, F.A.N., Passavante, J.Z.O., 1990. Variação sazonal da biomassa primária do fitoplâncton da Bacia do Pina (Recife–Pernambuco–Brasil). Trab. Oceanogr. Univ. Fed. PE. 21, 33-46.
- Feitosa, F.A.N., Nascimento, F.C.R., Costa, K.M.P., 1999. Distribuição espacial e temporal da biomassa fitoplanctônica relacionada com parâmetros hidrológicos na Bacia do Pina (Recife – PE). Trab. Oceanogr. Univ. Fed. PE. 27, 1-13.
- Gappa, J.J.L., Tablado, A., Magaldi, N.H., 1990. Influence of sewage pollution on a rocky intertidal community dominated by the mytilid *Brachidontes rodriguezi*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 63, 163-175.
- Graü, C., Barbera, A.LA, Zerpa, A., Silva, S., Gallardo, O., 2004. Aislamiento de *Vibrio* spp. y evaluación de la condición sanitaria de los moluscos bivalvos *Arca zebra* y *Perna perna* procedentes de la costa nororiental del Edo. Sucre. Venezuela. Rev. Científ. XIV (6), 13 – 521.
- Holt, J.G., Kreig, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. Bergey’s manual of determinative bacteriology, 19 nd Williams & Wilkins, Maryland.
- Isonhood, J.H., Gerard, P., Leenanon, B., Drake, M., 2002. Stress response of *Aeromonas hydrophila* following environmental challenges. Food Microbiol. 19, 285-293.

- Knøchel, S., 1990. Growth characteristics of motile *Aeromonas* spp. Isolated from different environments. *Internat. J. Food Microbiol.* 10, 235-244, 1990.
- La Rosa, T., Mirto, S., Marino, A., Alonzo, V., Maugeri, T.L., Mazzola, A., 2001. Heterotrophic bacteria community and pollution indicators of mussel – farm impact in the Gulf of Gaeta (Tyrrhenian Sea). *Mar. Environ. Res.* 52, 301-321.
- Lira, A.A., Barros, G.C., Mota, R.A., 2001. *Vibrio parahaemolyticus* em bivalves comercializados no grande Recife, PE. *Hig. Aliment.* 15, (90/91), 50-59.
- Macián, M.C., Arias, C.R., Aznar, R., Garay, E., Pujalte, M.J., 2000. Identification of *Vibrio* spp (other than *V. vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural samples. *Int. Microbiol.* 3, 51-53.
- Marcel, K.A.; Antoinette, A.A.; Mireille, D., 2002. Isolation and characterization of *Aeromonas* species from an eutrophic tropical estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 1341–1344.
- Martins, A.G.L.A.; Nascimento, A.R.; Vieira, R.H.S.F.; Serra, J.L.; Rocha, M.M.R.M., 2009. Quantificação e identificação de *Aeromonas* spp em águas de superfície do estuário do Rio Bacanga em São Luís/MA (Brasil). *B. CEPPA* 27, 107-118.
- Mendes, E.S., Lira, S.F., Góes, L.M.N.B., Dourado, J., Mendes, P.P., Alves, C.A.B., 2009. *Vibrio* spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. *Ci. Anim. Bras.* 10, 1191-1199.
- Molitoris, E., Joseph, S.W., Krichevsky, M.I., Sindhuhardja, W., Colwell, R.R., 1985., Characterization and Distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* Isolated in Indonesia. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1388-1394.
- Nascimento, F.C.R., Muniz, K., Feitosa, F.A.N., Araújo, J.P., Silva, R.M.S., Silva, G.S., Flores-Montes M.J., 2003. Disponibilidade nutricional da Bacia do Pina e Rio Tejió (Recife- PE- Brasil) em relação aos nutrientes e biomassa primária. *Tropical Oceanography* 31, 149-169.
- Noriega, C.E., Muniz, K., Flores-Montes, M.J., Macêdo, S.J., Araújo, M., Feitosa, F.A.N., Lacerda, S.R., 2009. Series temporales de variables hidrobiológicas em un estuario tropical (Brasil). *Rev. biol. mar. oceanogr.* 44, 93-108.
- Palumbo, S.A., Maxino, F., Williams, A.C., Buchanan, R.L., Thayer, D.W., 1985. Starch–ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1027–1030.

- Pereira, C.S., Possas, C.A., Viana, C.M., Rodrigues, D.P., 2004. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. Ciênc. Tecnol. Aliment. 24, 562-566.
- Pereira, M.A., Nunes, M.M., Nuernberg, L., Schulz, D., Vieira-Batista, C.R., 2006. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. Braz. J. Microbiol. 37, 159-163.
- Pereira, C.S., Possas, C.A., Viana, C.M., Rodrigues, D.P., 2007. *Vibrio* spp isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de estação experimental de cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Ciênc. Tecnol. Aliment. 27, 387-390.
- Pinto, R., Patrício, J., Baeta, A., Fath, B.D., Neto, J.M., Marques, J.C., 2009. Review and evaluation of estuarine biotic indices to assess benthic condition. Ecol. Indic. 9, 1–25.
- Ripabelli G., Sammarco, M.L., Grasso, G.M., Fanelli, I., Caprioli, A., Luzzi, I., 1999. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. Int. J. Food Microbiol. 49, 43-48.
- Romalde, J.L., Barja, J.L., 2010. Bacteria in molluscs: good and bad guys. In: Méndez-Vilas, A. (ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, p. 136-147.
- Serra, C.L.M., Cavalcante, P.R.S., Alves, L.M.C., Nascimento, A.R., Diniz, S.C.C.S., 2003. Avaliação de parâmetros físicos e químicos e pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em águas do estuário do rio Anil (São Luís, estado do Maranhão). Acta sci., Biol. sci. 25, 261-266.
- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S., Gomes, R.A.R. 2007. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3.ed. São Paulo: Varela, 536p.
- Solé, M., Porte, C., Barcelo, D., Albaiges, J., 2000. Bivalves residue analysis for the Assessment of coastal pollution in the Ebro Delta (NW Mediterranean). Mar. Pollut. Bull. 40 (9), 746-753.
- Sousa, J.A., Souza, A.T.S., 2001. Bacterial community associated with fish and water from Congonhas river, Sertaneja, Paraná, Brazil. Braz. Arch. Biol. Techn. 44, 373-381.
- Sousa, O.V., Vieira, R.H.F., Menezes, F.G.R., Reis, C.M.F., Hofer, E., 2004. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó River Estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 46, 59-62.

- Stabili, L., Acquaviva, M.I., Cavallo, R.A., 2005. *Mytilus galloprovincialis* filter feeding on the bacterial community in a Mediterranean coastal area (Northern Ionian Sea, Italy). *Water Res.* 39, 469–477.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*, second ed, Canada.
- Tsai, G.J., Chen, T.N., 1996. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. *Internat. J. Food Microbiol.* 31, 121-131.
- Thompson, J.R., Polz, M.F., 2006. Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling, in: *The Biology of Vibrios*. ASM Press, Washington, pp. 190-203.
- Unesco. 1986. *International Oceanographic Tables*, v. 4, UNESCO, Technical Papers in Marine Science 40: 1-193.
- Urakawa, H., Rivera, I.N., 2006. Aquatic environment, in: *The Biology of Vibrios*. ASM Press, Washington, pp. 175-189.
- Urriza, M.G., Pineau, L., Capdepuy, M., Roques, C., Caumette, P., Quentin, C., 2000. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. *J. Antimicrob. Chemoth.* 46, 297-301.

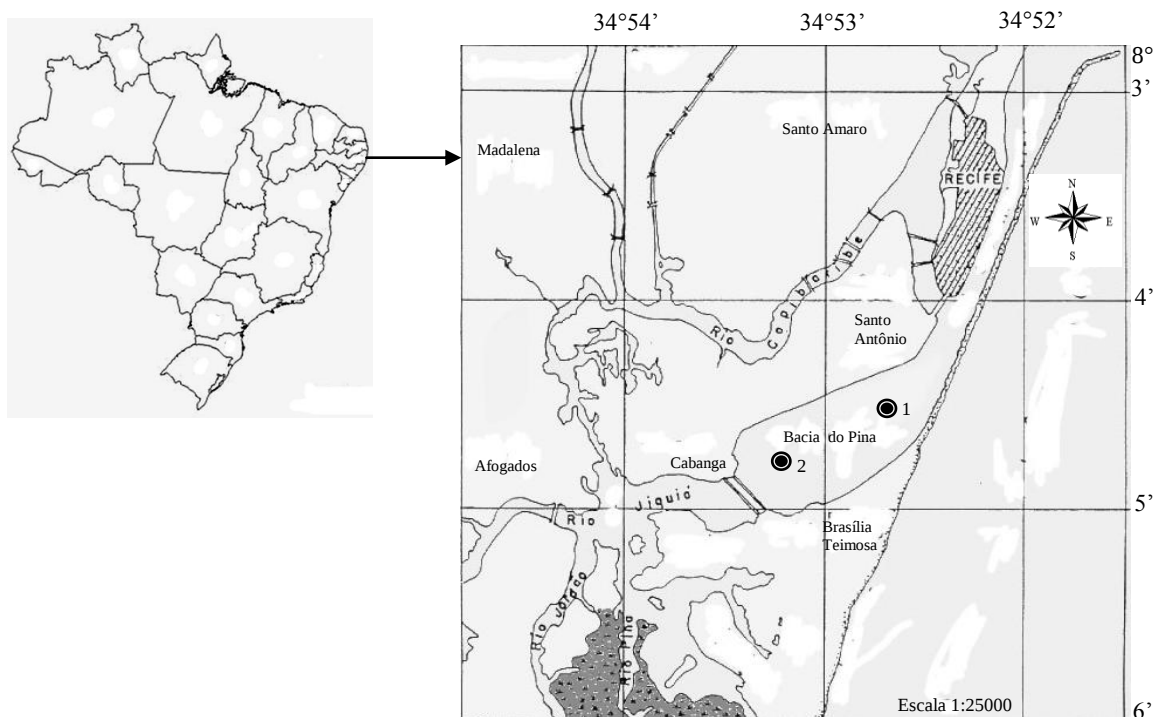


Fig. 1 - Mapa da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, indicando os locais de coletas da água e dos bivalves *Anomalocardia brasiliiana* e *Tagelus plebeius* no estuário da Baía do Pina.

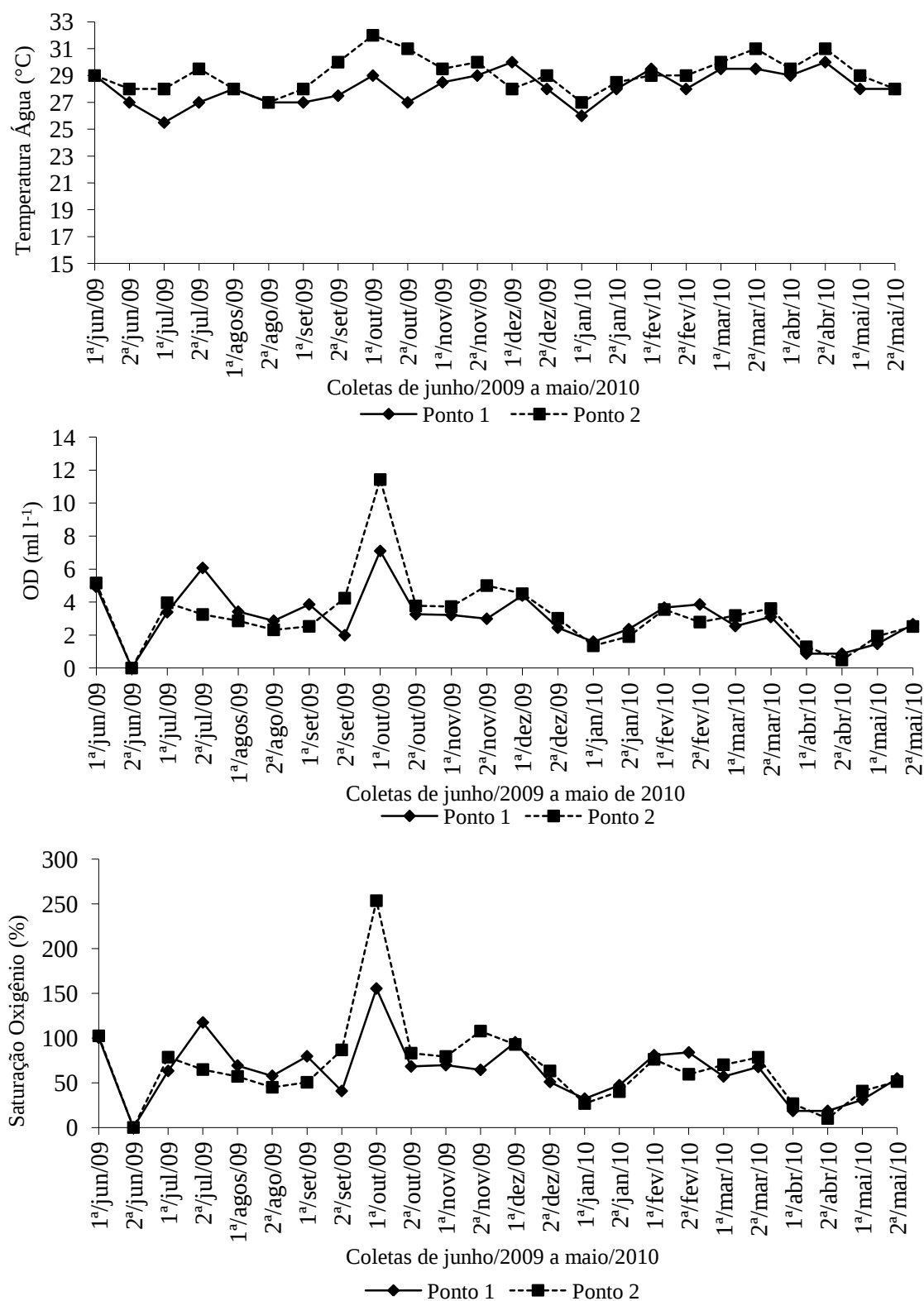


Fig. 2 – Variação mensal da temperatura da água, oxigênio dissolvido e saturação do oxigênio durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Baía do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)

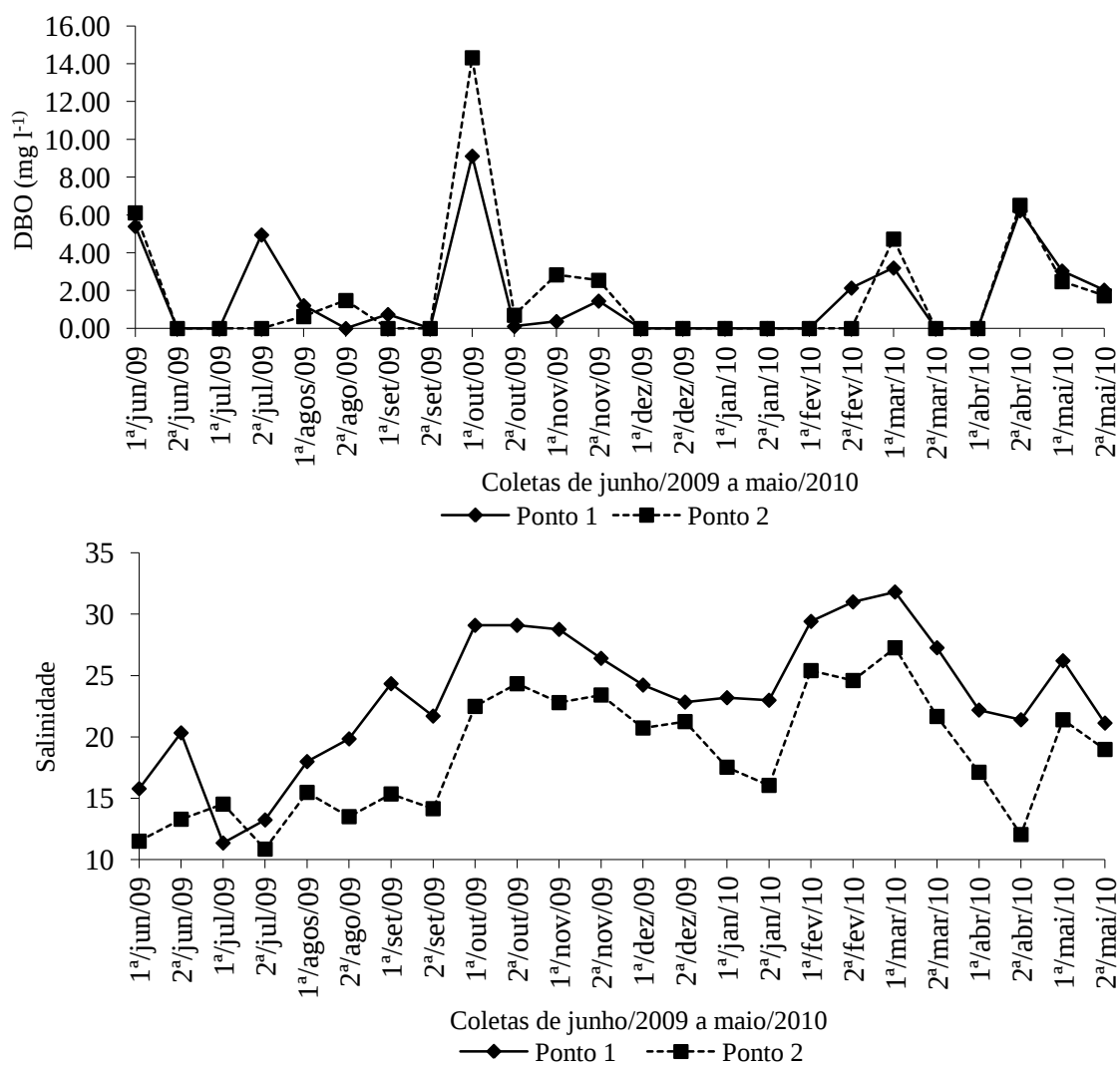


Fig. 3 – Variação mensal da DBO e da salinidade durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1^a e 2^a coletas mensais)

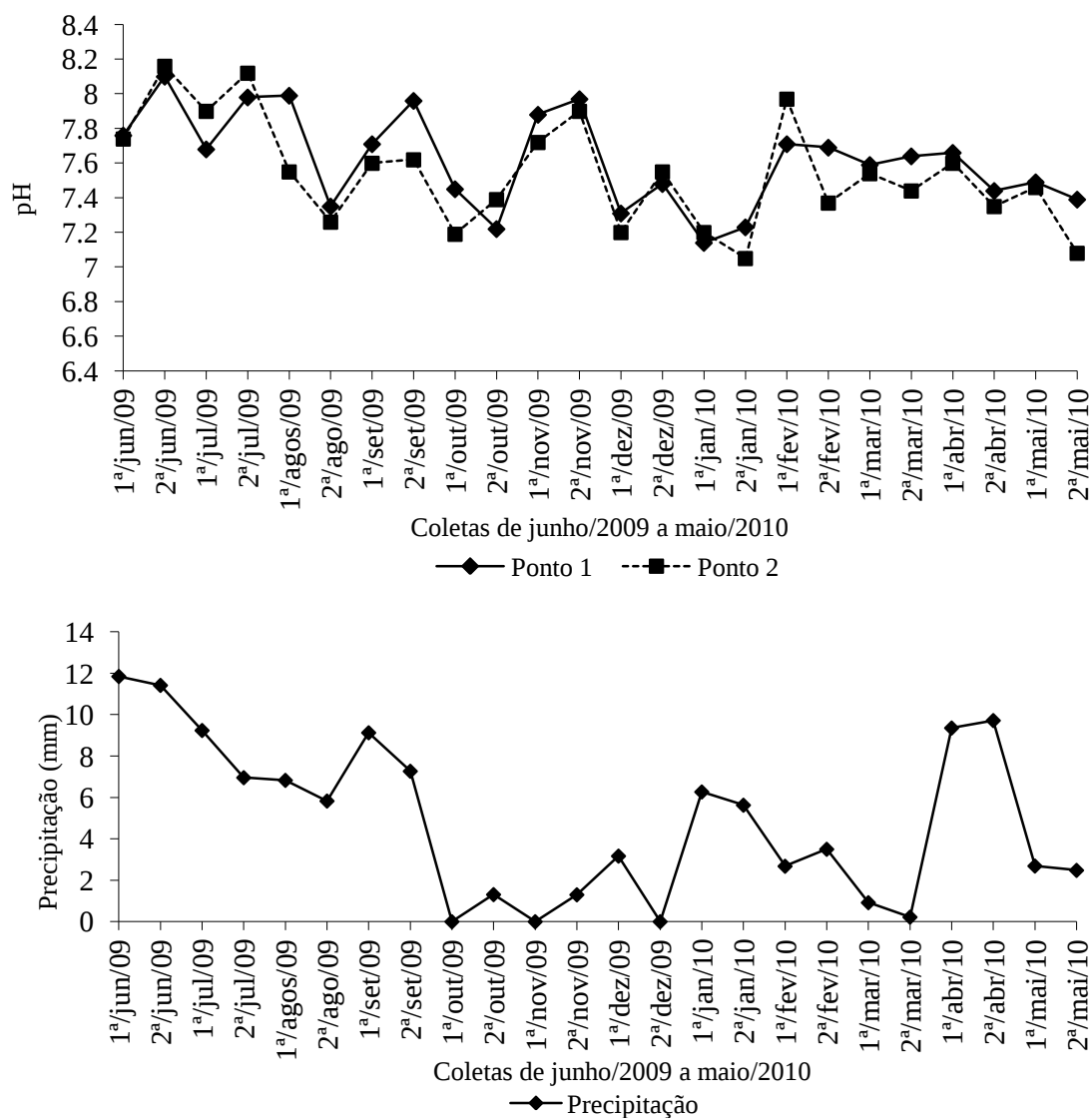


Fig. 4 – Variação mensal do pH e da precipitação durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)

Tabela 1

Espécies de *Vibrio* spp. isoladas da água e dos bivalves *A. brasiliana* e *T. plebeius* durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

Espécies	<i>Anomalocardia</i>		<i>Tagelus</i>		Água		Espécies patogênicas
	<i>brasiliana</i>		<i>plebeius</i>				
	N*	%	N*	%	N*	%	
<i>Vibrio mytili</i>	15	17,44	14	13,00	09	11,85	
<i>V. metschnikovii</i>	10	11,62	19	17,70	14	18,43	
<i>V. haliotocoli</i>	08	9,30	16	14,90	08	10,53	
<i>V. cincinnatiensis</i>	07	8,14	03	2,80	03	3,94	
<i>V. fischeri</i>	07	8,14	02	1,80	04	5,27	X
<i>V. mimicus</i>	07	8,14	03	2,80	03	3,94	X
<i>V. fluvialis</i>	05	5,81	04	3,70	02	2,63	X
<i>V. furnissii</i>	05	5,81	11	10,00	03	3,94	X
<i>V. diazotrophicus</i>	04	4,66	03	2,80	03	3,94	
<i>V. mediterranei</i>	04	4,66	09	8,40	08	10,53	
<i>V. alginolyticus</i>	03	3,49	02	1,80	02	2,63	X
<i>V. parahaemolyticus</i>	03	3,49	03	2,80	04	5,27	X
<i>V. natriegens</i>	02	2,32	01	0,90	-	-	
<i>V. orientalis</i>	02	2,32	04	3,70	04	5,27	
<i>V. scophthalmi</i>	02	2,32	-	-	01	1,31	
<i>V. agarivorans</i>	01	1,17	07	6,50	04	5,27	
<i>V. ordalii</i>	01	1,17	02	1,80	-	-	X
<i>V. neptunius</i>	-		-	-	01	1,31	
<i>V. penaeicida</i>	-		-	-	02	2,63	X
<i>V. vulnificus</i>	-		01	0,90	-	-	X
<i>V. xuii</i>	-		04	3,70	01	1,31	
	86	100	108	100	76	100	

*N= número de isolados

Tabela 2

Espécies de *Aeromonas* spp. isoladas da água e dos bivalves *A. brasiliiana* e *T. plebeius* durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

Espécies	<i>Anomalocardia</i>		<i>Tagelus</i>		Água		Espécies patogênicas
	<i>brasiliiana</i>		<i>plebeius</i>				
	N*	%	N*	%	N*	%	
<i>Aeromonas schubertii</i>	24	36,92	16	23,9	20	27,4	
<i>A. encheleia</i>	14	21,53	22	32,83	13	17,80	
<i>A. media</i>	11	16,92	10	14,92	15	20,55	
<i>A. eucrenophila</i>	10	15,38	08	11,94	08	10,96	
<i>A. veronii veronii</i>	04	6,15	07	10,44	11	15,07	X
<i>A. allosaccharophila</i>	02	3,1	-	-	03	4,11	X
<i>A. caviae</i>	-		03	4,47	-	-	X
<i>A. sobria</i>	-		01	1,5	01	1,37	X
<i>A. veronii sobria</i>	-		-	-	02	2,74	X
	65	100	67	100	73	100	

*N= número de isolados

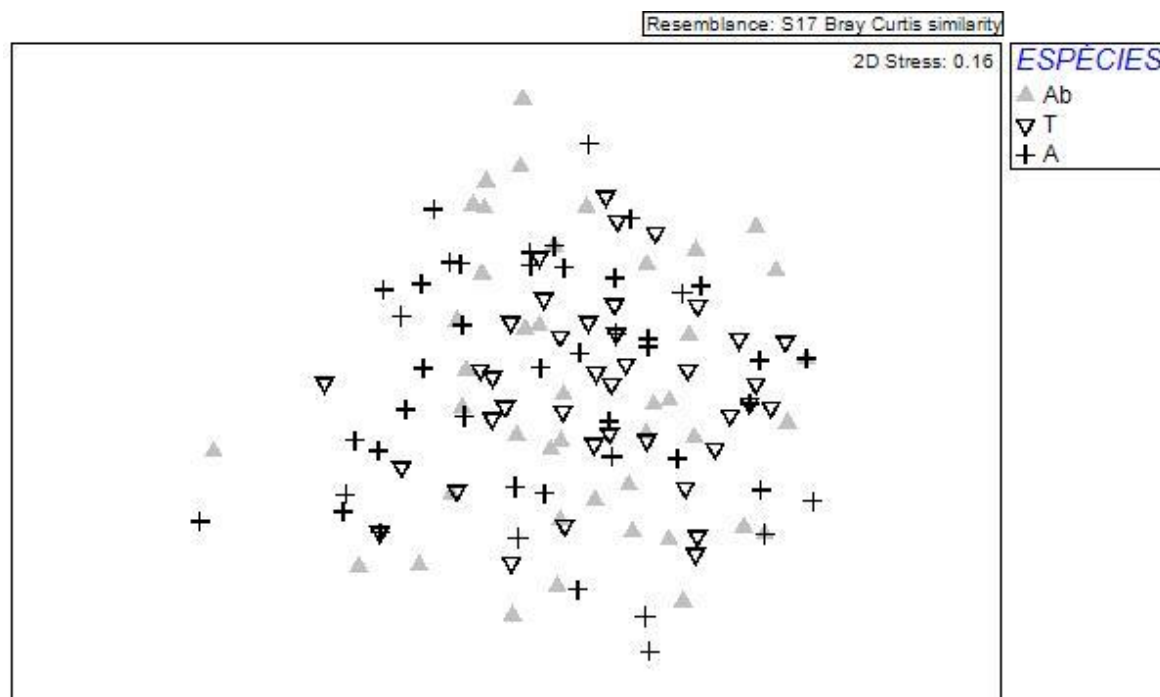


Fig. 5 – Escalonamento multidimensional das espécies de *Vibrio* spp e *Aeromonas* spp na água (A) e nos bivalves *Anomalocardia brasiliana* (Ab) e *Tagelus plebeius* (T) durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

Tabela 3

Média da contagem de *Vibrio* spp. (UFC ml⁻¹ ou g⁻¹) na água e nos bivalves *Anomalocardia brasiliiana* e *Tagelus plebeius* nos dois pontos de coleta durante o período de junho de 2009 a maio de 2010, Baía do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

Período	<i>A. brasiliiana</i>	<i>T. plebeius</i>	Água
Inverno (chuvoso)	3,9 x 10 ⁵ a*	4,9 x 10 ⁴ a*	1,4 x 10 ³ a*
Verão (seco)	2,8 x 10 ⁵ a*	2,8 x 10 ⁴ a*	5,1 x 10 ³ a*

*Não diferem estatisticamente pelo teste t ($P \geq 0,05$)

Tabela 4

Média da contagem de *Aeromonas* spp. (UFC ml⁻¹ ou g⁻¹) na água e nos bivalves *Anomalocardia brasiliiana* e *Tagelus plebeius* nos dois pontos de coleta durante o período de junho de 2009 a maio de 2010, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

Período	<i>A. brasiliiana</i>	<i>T. plebeius</i>	Água
Inverno (chuvoso)	5,9 x 10 ⁴ a*	4,8 x 10 ⁵ a*	2,1 x 10 ⁴ a*
Verão (seco)	3,7 x 10 ⁵ a*	2,2 x 10 ⁵ a*	1,2 x 10 ⁴ a*

*Não diferem estatisticamente pelo teste t ($P \geq 0,05$)



MARINE POLLUTION BULLETIN

The International Journal for Marine Environmental Scientists, Engineers,
Administrators, Politicians and Lawyers

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 0025-326X

DESCRIPTION

Marine Pollution Bulletin is concerned with the rational use of maritime and marine resources in estuaries, the seas and oceans, as well as with documenting marine pollution and introducing new forms of measurement and analysis. A wide range of topics are discussed as news, comment, reviews and research reports, not only on effluent disposal and pollution control, but also on the management, economic aspects and protection of the marine environment in general. A distinctive feature of *Marine Pollution Bulletin* is the number of different categories of articles which are published. Papers (*Reports*) form the core of the journal, while *Baselines* document measurements which are expected to have value in the future. *Reviews* are generally invited by the editors on subjects which cross traditional lines, but suggestions for topics are welcomed. *Viewpoints* are a less formal forum for scientists to comment freely on matters of relevant national and international importance. Other sections of the *Bulletin* include *News*, *New Products*, *Conference Reports*, *Conference Diary*, *Correspondence* and *Book Reviews*. Two volumes are published annually, one of which contains a series of special issues on topics of particular current interest. The importance and influence of these special issues, which address the major marine environmental concerns of our time, is increasingly being recognised not just by the wider scientific community, but also by environmental policy makers at national and international level.

AUDIENCE

Marine pollution environmental scientists, engineers, administrators, managers, politicians and lawyers.

IMPACT FACTOR

2010: 2.359 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

ABSTRACTING AND INDEXING

Aqualine Abstracts

BIOSIS

Cambridge Scientific Abstracts

Chemical Abstracts

Current Contents/ASCA

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

EMBASE

EMBiology

Elsevier BIOBASE

Environmental Periodicals Bibliography

Fish and Fisheries Worldwide

GEOBASE

Health and Safety Science Abstracts

Marine Literature Review

Oceanographic Literature Review

Petroleum Abstracts

Science Citation Index

Scopus

Tox Abstr Environment Abstracts

EDITORIAL BOARD

Editor

Charles Sheppard, Dept. of Biological Sciences, University of Warwick, Gibbet Hill Road, Coventry, CV4 7AL, UK, Email: charles.sheppard@warwick.ac.uk

Baseline Editor

B.J. Richardson, Dept. of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, 83 Tat Chee Avenue, Kowloon, Hong Kong, Email: baseline@cityu.edu.hk

News Editor

P. Kingston, Ship Cottage, Low Causeway, Torryburn, Fife, KY12 8LP, UK, **Email:**
p.f.kingston@hw.ac.uk

Editorial Board

A. Borja, Pasaia, Spain
P.M. Chapman, Burnaby, BC, Canada
G. Cognetti, Pisa, Italy
J.C. Dauvin, Wimereux, France
M. Elliott, Hull, UK
D.A. Holdway, Bundoora, VIC, Australia
P. Hutchings, Sydney, NSW, Australia
R.J. Law, Burnham-On-Crouch, UK
K.M.Y. Leung, Hong Kong, Hong Kong
M. Martin, Marposa, CA, USA
T. McClanahan, Mombassa, Kenya
B. Morton, Hong Kong, Hong Kong
J. Pearce, Falmouth, MA, USA
D.J.H. Phillips, VIDAUBAN, France
J.W. Readman, Hoe, Plymouth, UK
S. Tanabe, Matsuyama, Japan
R.S. Tjeerdema, Davis, CA, USA
V. Wepener, Auckland Park, Johannesburg, South Africa

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

Research Reports; Shorter Research Notes; Baseline Records of Contamination Levels; Viewpoint Articles; Letters to the Editor; Focus Articles (short reviews of 1500 words); Reviews.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are www.elsevier.com/locate/marpolbul 4 included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000

excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language Services

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review.

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/mpb/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Page charges

Marine Pollution Bulletin has no page charges.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- *Corresponding author.* Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- *Present/permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

This should not exceed 150 words.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Where relevant these should include the main species concerned, the geographical area and the contaminant.

Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: Database ID: xxxxx

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- GenBank: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- PDB: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- TAIR: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- NCT: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- MINT: Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)
- MI: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- UniProt: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al.

(2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Linking to and depositing data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: doi:10.1016/0016-7037(95)00105-9. Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly

and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on most Elsevier books, if ordered directly from Elsevier.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit his journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

4. ARTIGO II

Moluscos como indicadores de contaminação microbiológica em um estuário tropical no Nordeste do Brasil

Manuscrito a ser submetido à

Marine Ecology Progress Series

ISSN (ON LINE) 1616-1599 – ISSN (IMPRESSO) 0171-8630

Moluscos como indicadores de contaminação microbiológica em um estuário tropical no Nordeste do Brasil

Stefane de Lyra Pinto^{1,*}, Deusinete de Oliveira Tenório², Emiko Shinozaki Mendes³, Marcos Souto

Alves¹, José Roberto Botelho de Souza⁴, Carolina Notaro de Barros³, Marluce de Souza³

¹Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52.171-900, Recife, Brasil

²Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50.740-550, Recife, Brasil

³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52.171-900, Recife, Brasil

⁴Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50.670-901, Recife, Brasil.

*E-mail: s.lyra@db.ufrpe.br

RESUMO: Objetivou-se determinar as espécies de microrganismos do grupo coliformes encontrados nos moluscos bivalves *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791), *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) e na água, correlacionar com os fatores ambientais e identificar a espécie melhor indicadora de contaminação microbiológica na Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. Foram coletadas 24 amostras de cada molusco e de água em dois pontos do estuário no período de junho/2009 a maio/2010. Os parâmetros ambientais (T°C, S, pH, OD, DBO) foram correlacionados com as bactérias presentes nos bivalves e na água para detectar padrões na distribuição espacial e temporal. Testes estatísticos indicaram que não existem diferenças significativas com relação à presença e distribuição de bactérias em *A. brasiliana*, *T. plebeius* e na água e que os parâmetros ambientais avaliados não influenciaram nesta distribuição. As espécies de maior ocorrência foram *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter gergoviae*. *A. brasiliana* mostrou-se mais constante, abundante e resistente, e demonstrando ser a espécie recomendada como bioindicadora de qualidade microbiológica da água, quando comparada com *T. plebeius*.

Palavras-chave: *Anomalocardia brasiliana*, *Tagelus plebeius*, bioindicadores, bioacumulação, poluição orgânica, enterobactérias.

ABSTRACT

The objective was to determine the species of coliforms found in bivalve molluscs *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) and water, correlating with environmental factors and also to identify the best indicator species of microbiological contamination in the Pina Basin, located in the state of Pernambuco, Brazil. 24 samples were collected at two locations in the estuary between June 2009 and May 2010. Environmental parameters (T°C, S, pH, DO, BOD) were correlated with the bacteria from the shellfish and water to detect patterns in spatial and temporal distribution. Statistical tests indicated that no significant differences regarding the presence and distribution of bacteria in *A. brasiliiana*, *T. plebeius* and water; additionally, the environmental parameters evaluated did not affect this distribution. The most frequently occurring species were *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, and *Enterobacter gergoviae*. *A. brasiliiana* showed to be more constant, abundant and resilient, and is likely to be recommended as a better bioindicator species for microbiological water quality when compared with *T. plebeius*.

Keywords: *Anomalocardia brasiliiana*, *Tagelus plebeius*, biomarkers, bioaccumulation, organic pollution, enterobacteria.

INTRODUÇÃO

Os estuários são considerados ambientes altamente produtivos e exportadores de nutrientes e matéria orgânica para águas costeiras adjacentes, habitats vitais para espécies de importância comercial, além de gerarem bens e serviços para comunidades locais (Lapointe & Clark 1992). Estes ambientes são altamente vulneráveis, podendo ser comprometidos se houver alterações abruptas em alguns de seus parâmetros ambientais. A ocupação desordenada em áreas urbanas e o aumento de atividades industriais, portuárias, pesqueiras e turísticas, sem um plano gestor adequado, coloca em risco os atributos básicos dos estuários brasileiros e ecossistemas

associados, provocando diminuição da qualidade de vida da população local (Troussellier et al. 2004).

Um dos efeitos decorrentes das atividades humanas sobre o estuário é a poluição das águas, oriundas, principalmente, dos esgotos domésticos e efluentes industriais, um grande problema em nível global, quer pelo montante de poluente despejado, quer pelos problemas concretos trazidos à saúde pública (Almeida et al. 2001). Os principais poluentes encontrados nos esgotos domésticos são os restos orgânicos e bactérias do grupo coliformes. Esses poluentes podem causar distúrbios intestinais, diarreia e intoxicações, que podem ser veiculados pela água contaminada, no caso de recreação ou pelo consumo de pescado contaminado (Neill 2004).

Segundo Pruzzo et al. (2005), a filtração da água nos bivalves ocorre graças ao movimento ciliar de células das brânquias e estes animais têm a capacidade de filtrar 19 a 50 l de água por hora, com pouca ou nenhuma capacidade seletiva. Em decorrência disso, podem acumular grande número de bactérias, vírus e parasitos, como também toxinas e metais pesados (Leal & Franco 2008). Em ostras, por exemplo, grande percentual das bactérias ingeridas sobrevive ao processo digestivo, devido a adaptação ao ambiente marinho, aos mecanismos de resistência associados à degradação enzimática e ao uso do ambiente intestinal do hospedeiro como fonte nutricional por esses microrganismos (Cook 1984, Silva et al. 2003).

O consumo de moluscos bivalves provenientes das atividades de extrativismo ou de cultivo deve ser avaliado em relação aos riscos de veiculação de microrganismos patogênicos, o que tem representado sérios problemas de saúde pública (Wait et al. 1983, Miesciner et al. 1992, Regan et al. 1993). Assim, áreas com estas atividades deveriam ser microbiologicamente monitoradas com o uso de microrganismos indicadores. Esses indicadores deveriam incluir microrganismos entéricos patogênicos como, por exemplo, a *Salmonella* e o vírus Norwalk, geralmente relacionados com epidemias por veiculação hídrica (Wang 1997). No entanto, estes organismos são irregularmente distribuídos, ocorrendo em baixas concentrações no ambiente, o que dificulta o monitoramento. Como alternativa, o critério microbiológico tem sido baseado em

bactérias entéricas não patogênicas, como os coliformes termotolerantes, dentre estes a bactéria *Escherichia coli*. Cabe ressaltar, que a utilização do indicador *E. coli* tem sido questionada em função de que a ausência desta bactéria não assegura a ausência de patógenos entéricos (Regan et al. 1993, Machado et al. 2000).

A captura de moluscos na Bacia do Pina ocorre de forma extrativista, estendendo-se, durante todo o ano. Não há regulamentação legal ou mesmo instrução normativa por parte dos órgãos ambientais estaduais e municipais para sua coleta. Existem, no entanto, resoluções e portarias nacionais que regulamentam e estabelecem padrões de qualidade microbiológica indispensáveis, para que a água e os bivalves possam ser utilizados pelo homem com segurança, sem agravos a saúde (Brasil 2003).

Objetivou-se neste contexto, determinar o nível de contaminação do estuário da Bacia do Pina no município de Recife, Pernambuco – Brasil, através da contagem de microrganismos indicadores em *Anomalocardia brasiliiana* (marisco), *Tagelus plebeius* (unha-de-velho) e da água adjacente desse local, com possível uso desses bivalves, como indicadores da qualidade ambiental.

MATERIAL E MÉTODOS

O material que fundamentou este trabalho foi procedente do estuário da Bacia do Pina que está localizado na área urbana do município de Recife, Pernambuco, Brasil (08°04'03"S-34°52'16"W), e é formado pela confluência dos rios Tejipió, Jiquiá, Jordão, Pina e pelo braço sul do Capibaribe (Fig. 1). O estuário recebe alto fluxo de descargas oriundos das indústrias e efluentes domésticos e por ser uma área portuária, há um constante tráfego de embarcações. Sua extensão é de 3,6 km e largura variável, sendo a mínima de 0,26 km e a máxima de 0,86 km, perfazendo uma área total de aproximadamente 2,02 km².

A área estudada apresenta dois períodos climáticos bem definidos pelo regime de precipitação pluviométrica; um período chuvoso que compreende os meses de março a agosto, e um período de estiagem ou seco, que corresponde aos meses de setembro a fevereiro.

O estuário é uma área de importância sócio-econômica, principalmente para os pescadores artesanais que coletam moluscos comestíveis de valor comercial, tais como *A. brasiliana*, *T. plebeius*, *Iphigenia brasiliana* e a *Mytella charruana* (Feitosa et al. 1999).

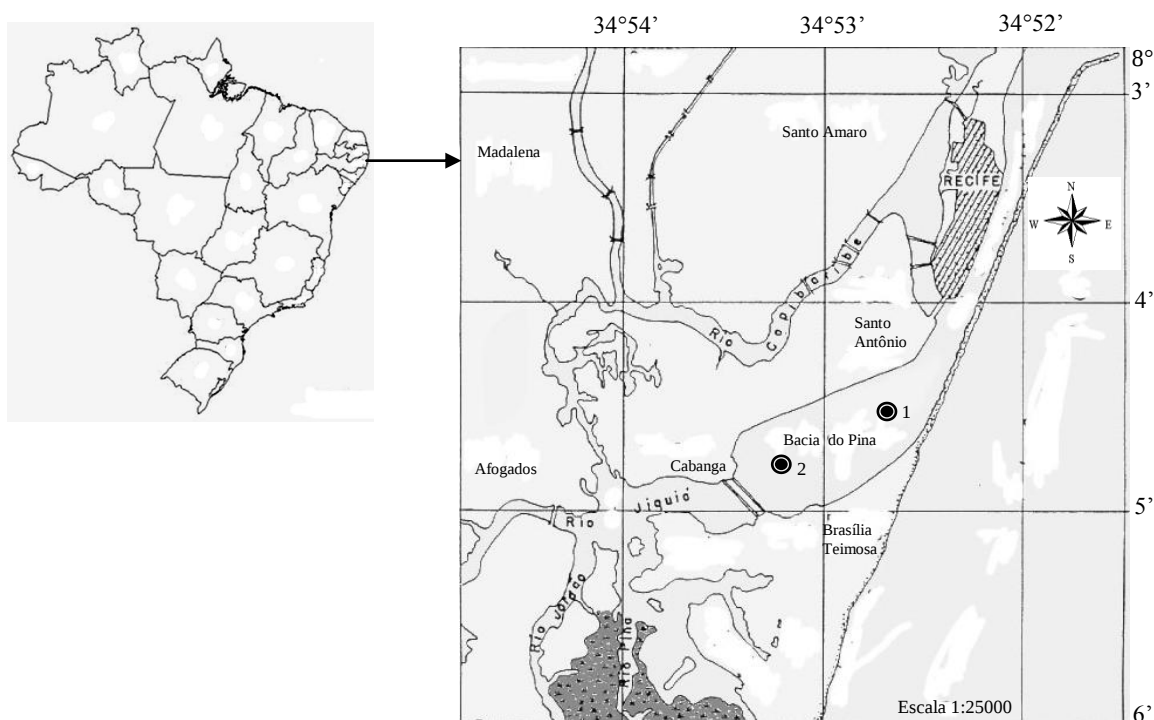


Fig. 1 - Mapa da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, indicando os locais de coletas da água e dos bivalves *Anomalocardia brasiliana* e *Tagelus plebeius* no estuário da Bacia do Pina.

Amostras dos bivalves e da água

Foram realizadas coletas quinzenais de *Anomalocardia brasiliana*, *Tagelus plebeius* e da água, no período de junho de 2009 a maio de 2010 em dois pontos na Coroa do Passarinho, na Bacia do Pina (Fig. 1). Em maré baixa, foram coligidos manualmente 80 exemplares de cada espécie com tamanho médio de 19,16mm (*A. brasiliana*) e 35,00mm (*T. plebeius*), com a finalidade de se obter 80 g do material intravalvar para a realização das análises. Os exemplares foram devidamente acondicionados em sacos plásticos e colocados em recipiente isotérmico. A

água foi coletada nos locais de extração dos moluscos em garrafas estéreis de 200 mL e acondicionada em caixa isotérmica. Todo o material foi transportado ao Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (LICAL) do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde as análises bacteriológicas foram realizadas.

No laboratório, os bivalves foram lavados em água corrente e escovados para retiradas de incrustações, sendo utilizados somente os moluscos com valvas fechadas. Em seguida, as valvas foram assepticamente abertas e todo conteúdo foi transferido para um recipiente estéril e pesados 25 g de cada molusco.

Tanto para as amostras de água quanto para as amostras dos bivalves, a quantificação de coliformes totais e termotolerantes foi realizada segundo o método do Número Mais Provável, citado por Brasil (2003) e Silva et al. (2007). Dos tubos positivos dos caldos VB e EC foram realizados repiques com uma alça de platina e estriadas placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubadas por 18-24 horas, a 36°C.

As colônias típicas foram transferidas para tubos com Ágar Padrão para Contagem (PCA) e incubados por 24h a 36°C para proliferação. As colônias foram identificadas bioquimicamente conforme o recomendado por Holt et al. (1994), Buller (2004) e Silva et al. (2007).

Para pesquisa de *Salmonella* spp foi realizado o pré-enriquecimento, onde se pesou assepticamente 25g da amostra de cada amostra de molusco e adicionou-se 225 mL de água Peptonada Tamponada que foi incubado em estufa bacteriológica a 36°C, por 16 a 20 horas. O enriquecimento foi realizado em tubos contendo 10 mL do caldo selenito cistina e em tubos com 10 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis, incubados em banho-Maria a 42°C por 24 horas. Após este período alíquotas de cada amostra foram estriadas em placas de Petri com meios seletivos Ágar de desoxicolato-lisina-xilose (XLD) e Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) e incubadas a 36°C, por 18 a 24 horas. As colônias suspeitas foram submetidas ao perfil bioquímico, conforme orientação de Brasil (2003).

Variáveis ambientais

A temperatura da água foi registrada *in situ* com auxílio de um termômetro comum de álcool submerso nos pontos de coletas. As amostras para determinação dos parâmetros hidrológicos foram coletadas na lâmina d'água adjacente ao banco de areia, de acordo com os procedimentos usuais. A salinidade foi determinada método de Morh-Knudsen e o oxigênio dissolvido na água (OD) pelo método de Winkler, ambos descritos por Strickland e Parsons (1972); a demanda bioquímica do oxigênio (DBO) pela técnica descrita no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (Apha 1985); a taxa de saturação do oxigênio foi determinada, utilizando-se a tabelas Oceanográficas Internacionais (Unesco 1986); o pH foi medido através de um pH-metro de bancada. As análises de água para a determinação dos parâmetros físico-químicos foram realizadas no Laboratório de Oceanografia Química do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco.

Os dados de precipitação pluviométrica foram cedidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), ponto do Curado, do Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento – 3º DISME. Foi verificado o acumulado pluviométrico de dez dias anteriores a cada coleta, durante todo o período da pesquisa.

Análise estatística

Os dados foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade e posteriormente foi feito o escalonamento multidimensional (MDS) a partir de uma matriz de similaridade, utilizando o índice de Bray-Curtis, com os dados de abundância de bactérias nos três substratos *A. brasiliensis* e *T. plebeius* e água, não transformados. As análises foram feitas com os programas Primer 6.2 e Permanova (Anderson 2005).

Os dados de coliformes totais, coliformes termotolerantes, abundância das bactérias e fatores abióticos (OD, DBO, salinidade, pH, temperatura da água e índice de precipitação) foram analisados através de correlação múltipla e a significância testada através de teste t.

RESULTADOS

Dados abióticos

A temperatura da água na Bacia do Pina teve pequena amplitude térmica com valores oscilando entre 25,5°C e 30°C, com média de 28,13 °C no ponto 1 e entre 27°C e 32°C, com média de 29,13°C no ponto 2 (Fig. 2), sendo a diferença entre os dois pontos significativa ($F_{(1,46)} = 7,59$; $p = 0,008$), mas sem diferença significativa entre os períodos chuvoso e seco ($F_{(1,46)} = 0,10$; $p = 0,75$).

O OD variou de indetectáveis (condição de anoxia) nos dois pontos, no mês de junho/2009 a 11,43 ml l⁻¹ no ponto 2 no mês de outubro/2009 (Fig. 2), com média de $3,04 \pm 1,60$ ml l⁻¹ no ponto 1 e $3,27 \pm 2,18$ ml l⁻¹ no ponto 2. Com relação ao percentual de saturação, observaram-se algumas oscilações, com mínimo de 0% nos dois pontos e máximos de 155,36% e 253% nos pontos 1 e 2, respectivamente, sem diferença significativa entre os dois pontos ($F_{(1,46)} = 0,17$; $p = 0,680$), mas com diferença significativa entre os períodos chuvoso e seco ($F_{(1,46)} = 4,127$; $p = 0,04799$).

Com relação à DBO, o menor valor observado foi < 1 mg l⁻¹ nos dois pontos e o maior foi 14,33 mg l⁻¹ no ponto 2, no mês de outubro/2009 (Fig. 3). As médias nos dois pontos para esta variável ambiental foram $1,67 \pm 2,48$ mg l⁻¹ e $1,84 \pm 3,32$ mg l⁻¹, nos pontos 1 e 2, respectivamente, sem diferenças significativas entre os dois pontos ($F_{(1,46)} = 0,04$; $p = 0,84$), e entre o período chuvoso e o seco ($F_{(1,46)} = 0,58$; $p = 0,449$).

A salinidade variou entre 10,84 (julho/2009) e 31,81 (março/2010), os menores teores foram registrados nos meses com maior precipitação pluviométrica e aporte de água doce proveniente dos rios adjacentes à área (Fig. 3), com diferença significativa entre os dois pontos. No ponto 1 foi significativamente maior do que no ponto 2 ($F_{(1,46)} = 10,605$; $p = 0,002$), e no período seco foi significativamente maior do que no chuvoso ($F_{(1,46)} = 10,417$; $p = 0,0023$).

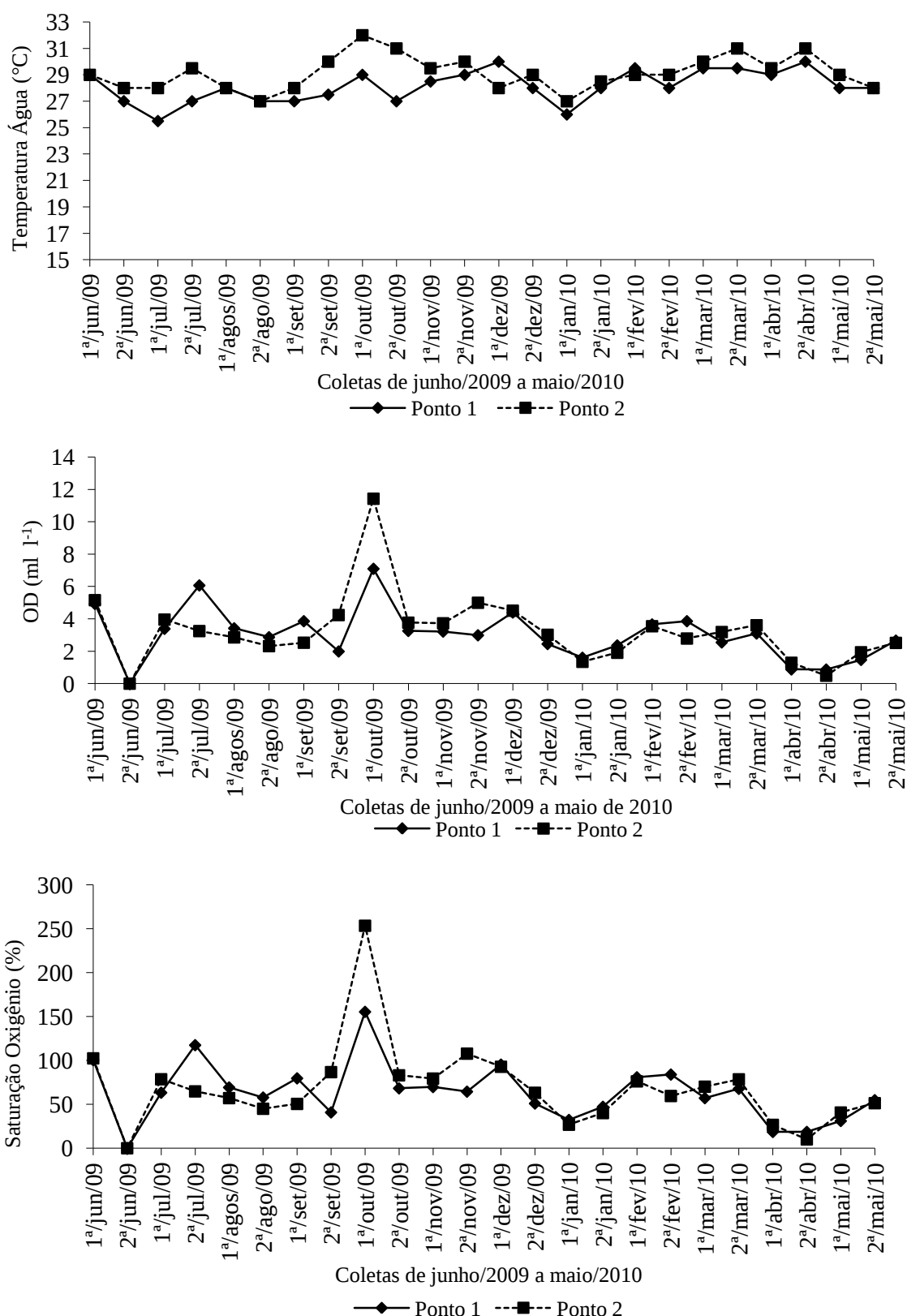


Fig. 2 – Variação mensal da temperatura da água, oxigênio dissolvido e saturação do oxigênio durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)

Quanto ao potencial hidrogeniônico da água (pH), houve pouca variação, estando sempre alcalino durante todo o período estudado. O menor pH foi de 7,05 no ponto 2, em janeiro/2010 e o maior foi de 8,16 no ponto 2, em junho/2009 (Fig. 4).

A precipitação pluviométrica, variou de um mínimo de 0,00 mm em outubro e dezembro de 2009, e máxima de 11,85 mm com média $4,91 \pm 3,87$ mm, sendo a diferença entre os dois períodos significativa ($F_{(1,46)} = 9,3065$; $p = 0,00378$).

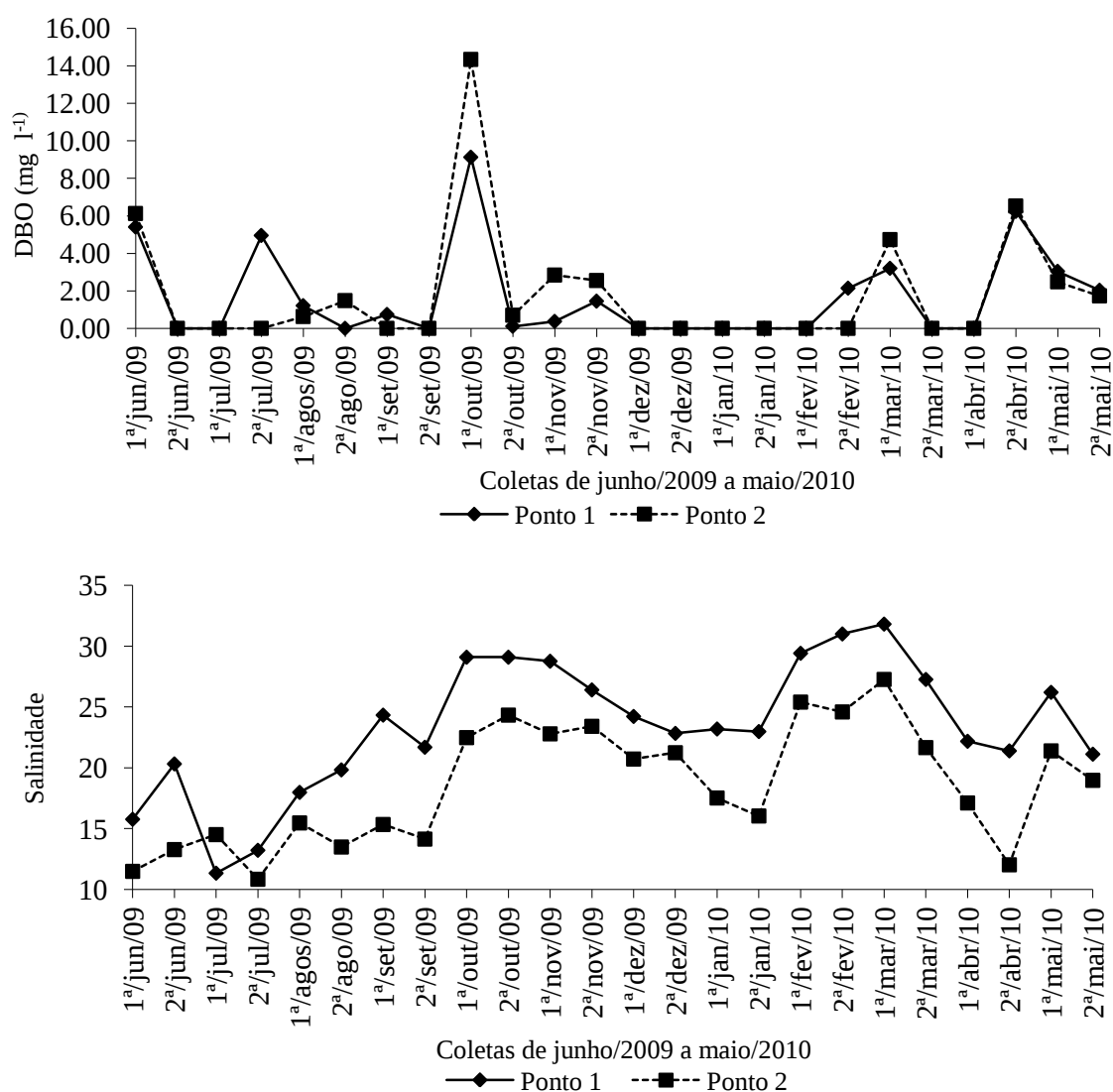


Fig. 3 – Variação mensal da DBO e da salinidade durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)

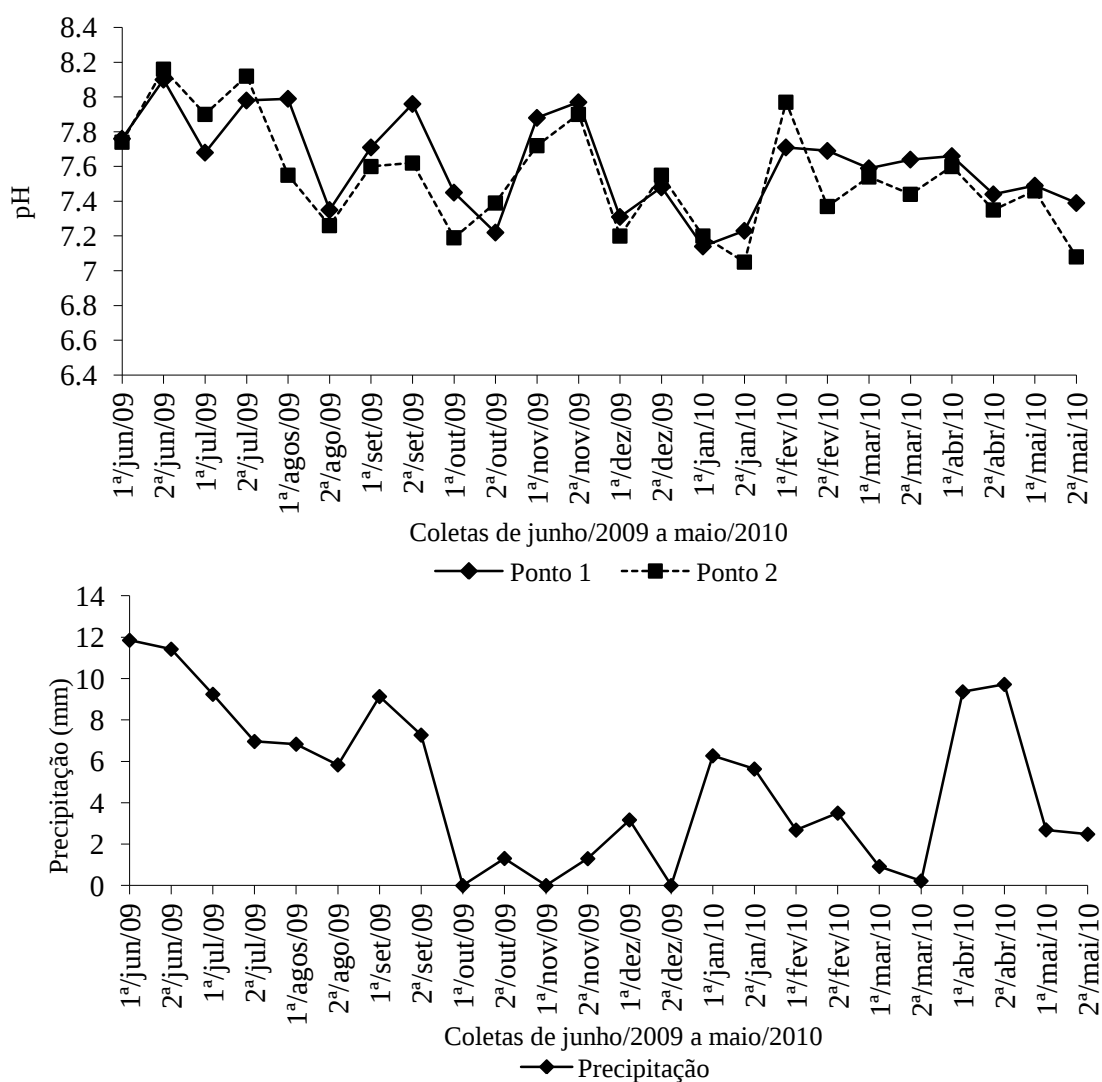


Fig. 4 – Variação mensal do pH e da precipitação pluviométrica durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil. (1ª e 2ª coletas mensais)

Dados bióticos

Os resultados das análises do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e termotolerantes (CT) nos bivalves, *A. brasiliiana* e *T. plebeius* da Bacia do Pina, em ambos os pontos de amostragem, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Nos meses de junho/2009 a agosto/2009 e maio/2010, *T. plebeius* e *A. brasiliiana*, respectivamente, estavam ausentes no ponto 2, motivo pelo qual não se tem dados de coliformes nestes meses.

Tabela 1. Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e termotolerantes (CT) na água e nos bivalves *Anomalocardia brasiliiana* e *Tagelus plebeius* no ponto 1, do estuário da Bacia do Pina – PE, no período de junho de 2009 a maio de 2010.

COLETA	C. TOTAL			C. TERMOTOLERANTE		
	<i>A. brasiliiana</i> (NMP g ⁻¹)	<i>T. plebeius</i> (NMP g ⁻¹)	Água (NMP ml ⁻¹)	<i>A. brasiliiana</i> (NMP g ⁻¹)	<i>T. plebeius</i> (NMP g ⁻¹)	Água (NMP ml ⁻¹)
08/jun	2,4x10 ³	≥2,4x10 ⁴	7,5x10	2,4x10 ³	≥2,4x10 ⁴	9x10 ⁻¹
25/jun	4,6x10 ³	1,1x10 ⁴	2,4x10 ²	4,6x10 ³	1,1x10 ⁴	2,3x10
06/jul	4,6x10 ³	≥2,4x10 ⁴	≥2,4x10 ³	4,6x10 ³	≥2,4x10 ⁴	≥2,4x10 ³
20/jul	1,5x10 ³	≥2,4x10 ⁴	≥2,4x10 ³	1,5x10 ³	≥2,4x10 ⁴	≥2,4x10 ³
04/ago	2,4x10 ³	≥2,4x10 ⁴	≥2,4x10 ³	2,4x10 ³	≥2,4x10 ⁴	≥2,4x10 ³
18/ago	9,3x10 ²	1,1x10 ⁴	≥2,4x10 ³	4,3x10 ²	1,1x10 ⁴	≥2,4x10 ³
01/set	2,4x10 ³	2,3x10 ²	4,6x10 ³	2,4x10 ³	2,3x10 ²	4,6x10 ³
17/set	2,4x10 ³	2,4x10 ³	2,4x10 ³	2,3x10 ²	7,0x10	9,3x10 ²
05/out	2,3x10 ²	7,5x10 ²	4,0x10	2,3x10 ²	4,3x10 ²	4,0x10
20/out	9,0x10	1,5x10 ³	9,0x10	9,0x10	1,5x10 ³	9,0x10
03/nov	2,3x10 ²	2,4x10 ³	9,0x10	9,0x10	2,4x10 ³	4,0x10
17/nov	7,0x10	9,3x10 ²	1,5x10 ²	7,0x10	9,3x10 ²	7,0x10
01/dez	2,3x10 ²	7,5x10 ²	1,5x10 ²	2,3x10 ²	7,5x10 ²	1,5x10 ²
15/dez	9,3x10 ²	9,3x10 ²	1,5x10 ²	4,3x10 ²	9,3x10 ²	1,5x10 ²
12/jan	7,5x10 ²	4,3x10 ²	4,6x10 ³	7,5x10 ²	4,3x10 ²	9,3x10 ²
29/jan	4,6x10 ³	2,4x10 ³	4,6x10 ³	4,6x10 ³	2,4x10 ³	4,6x10 ³
03/fev	<3,0x10	9,3x10 ²	9,0x10	<3,0x10	4,3x10 ²	4,0x10
18/fev	<3,0x10	2,3x10 ²	4,0x10	<3,0x10	2,3x10 ²	4,0x10
01/mar	4,3x10 ²	9,3x10 ²	1,5x10 ²	4,3x10 ²	9,3x10 ²	1,5x10 ²
15/mar	4,0x10	2,4x10 ³	2,3x10 ²	4,0x10	9,3x10 ²	9,0x10
12/abr	2,3x10 ²	4,6x10 ³	2,1x10 ³	2,3x10 ²	4,6x10 ³	2,1x10 ³
26/abr	2,1x10 ²	1,1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	2,1x10 ²	1,5x10 ³	1,1x10 ⁴
10/mai	2,3x10 ²	9,3x10 ²	9,3x10 ²	2,3x10 ²	9,3x10 ²	9,3x10 ²
25/mai	2,3x10 ²	2,4x10 ³	4,6x10 ³	2,3x10 ²	2,4x10 ³	9,3x10 ²

Tabela 2. Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (Ct) e termotolerantes (CT) na água e nos bivalves *Anomalocardia brasiliana* e *Tagelus plebeius* no ponto 2, do estuário da Bacia do Pina – PE, no período de junho de 2009 a maio de 2010.

COLETA	C. TOTAL			C. TERMOTOLERANTE		
	<i>A. brasiliana</i> (NMP g ⁻¹)	<i>T. plebeius</i> (NMP g ⁻¹)	Água (NMP ml ⁻¹)	<i>A. brasiliana</i> (NMP g ⁻¹)	<i>T. plebeius</i> (NMP g ⁻¹)	Água (NMP ml ⁻¹)
08/jun	$\geq 2,4 \times 10^4$	*	$2,4 \times 10^2$	$\geq 2,4 \times 10^4$	*	$2,4 \times 10^2$
25/jun	$2,4 \times 10^3$	*	$9,0 \times 10$	$9,3 \times 10^2$	*	$9,0 \times 10$
06/jul	$4,6 \times 10^3$	*	$1,1 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	*	$1,1 \times 10^3$
20/jul	$3,6 \times 10^2$	*	$\geq 2,4 \times 10^3$	$3,6 \times 10^2$	*	$\geq 2,4 \times 10^3$
04/ago	$\geq 2,4 \times 10^4$	*	$\geq 2,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$	*	$\geq 2,4 \times 10^3$
18/ago	$2,4 \times 10^3$	*	$\geq 2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	*	$\geq 2,4 \times 10^3$
01/set	$4,6 \times 10^3$	*	$2,4 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	*	$2,4 \times 10^3$
17/set	$2,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^2$	$4,6 \times 10^3$	$2,8 \times 10^2$
05/out	$1,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$4,0 \times 10$	$1,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$4,0 \times 10$
20/out	$9,3 \times 10^2$	$4,6 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$
03/nov	$7,5 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
17/nov	$9,0 \times 10$	$4,3 \times 10^2$	$9,0 \times 10$	$9,0 \times 10$	$4,3 \times 10^2$	$9,0 \times 10$
01/dez	$2,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$
15/dez	$4,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$9,0 \times 10$	$4,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$9,0 \times 10$
12/jan	$7,5 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$7,5 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$
29/jan	$9,0 \times 10$	$2,4 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	$9,0 \times 10$	$2,4 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$
03/fev	$9,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$4,6 \times 10^3$	$9,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$4,6 \times 10^3$
18/fev	$4,0 \times 10$	$9,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10$	$9,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$
01/mar	$4,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
15/mar	$4,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
12/abr	$4,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
26/abr	$9,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$\geq 2,4 \times 10^4$	$9,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$\geq 2,4 \times 10^4$
10/mai	$3,0 \times 10$	$9,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$3,0 \times 10$	$9,3 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2$
25/mai	*	$4,6 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	*	$9,3 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$

* ausência do animal nas coletas

As concentrações de Ct em *A. brasiliana* variaram de $< 3,0 \times 10$ NMP g⁻¹ a $4,6 \times 10^3$ NMP g⁻¹ no ponto 1. Os maiores índices foram encontrados nas amostras referentes aos meses de junho/2009, julho/2009 e janeiro/2010, respectivamente, enquanto o menor NMP de Ct por grama do bivalve foi encontrado em fevereiro/2010. A concentração de CT variou entre $< 3,0 \times 10$ e $4,6 \times 10^3$ NMP g⁻¹, sendo os maiores valores registrados nas coletas de junho/2009, julho/2009 e janeiro/2010 e os menores valores observados no mês de fevereiro/2010. No ponto 2, os níveis de Ct variaram entre $3,0 \times 10$ NMP g⁻¹ e $\geq 2,4 \times 10^4$ NMP g⁻¹ na *A. brasiliana*. A

menor concentração observada foi na coleta no mês de maio/2010 e maiores valores nas coletas, realizadas em junho e agosto/2009, respectivamente.

O *T. plebeius* apresentou concentrações mais elevadas de Ct e CT, com 100% e 62,5% das amostras apresentando índices maiores que 10^2 NMP g⁻¹ no ponto 1. Os menores NMP de Ct e CT encontrados foram nas amostras referentes a setembro/2009, enquanto que para CT, os maiores valores foram entre junho e agosto/2009. No ponto 2, os valores para Ct (83,33%) e CT (100%) variaram de $2,3 \times 10^2$ a $1,1 \times 10^4$ NMP g⁻¹, sendo o menor índice correspondendo aos meses de outubro/2009, março e abril/2010.

Com base na análise estatística, o período chuvoso apresentou influência significativa na concentração dos coliformes termotolerantes em *A. brasiliana* ($p < 0,05$) e *T. plebeius* ($p < 0,01$), bem como na concentração de coliformes totais em *T. plebeius* ($p < 0,01$).

A concentração dos coliformes termotolerantes em *A. brasiliana* ($p < 0,01$) e *T. plebeius* ($p < 0,0001$) apresentou correlação significativa direta com a precipitação, bem como houve correlação significativa direta entre os coliformes totais em *A. brasiliana* ($p < 0,01$) e *T. plebeius* ($p < 0,0001$) e esta mesma variável ambiental. Para *T. plebeius*, os coliformes totais ($p < 0,05$) e coliformes termotolerantes ($p < 0,01$) mostraram correlação significativa inversa com a temperatura da água.

Os valores de Ct das amostras de água nos pontos 1 e 2 variaram de $4,0 \times 10$ a $1,1 \times 10^4$ NMP ml⁻¹ e $4,0 \times 10$ a $\geq 2,4 \times 10^4$ NMP ml⁻¹, respectivamente, enquanto que, os CT variaram de 9,0 a $1,1 \times 10^4$ NMP ml⁻¹ e $4,0 \times 10$ a $\geq 2,4 \times 10^4$ NMP ml⁻¹, respectivamente.

A análise estatística demonstrou não haver influência significativa na concentração dos coliformes totais e termotolerantes na água entre os pontos amostrados, bem como nos dois períodos (seco e chuvoso) estudados.

Treze espécies de bactérias do grupo coliforme foram identificadas, sendo 10 no ponto 1 e 12 no ponto 2. Não houve diferença na composição qualitativa entre os dois pontos de coleta e nem entre os substratos estudados – água, *Tagelus plebeius* e *Anomalocardia brasiliiana*. Com exceção de *Citrobacter amalonaticus*, que ocorreu apenas no ponto 1 e de *Klebsiella ozaenae* que ocorreu apenas no ponto 2, os demais ocorreram em pelo menos um dos três substratos nos dois pontos (Tabelas 3 e 4).

Em relação à frequência de ocorrência por substrato, 11 espécies foram isoladas em *A. brasiliiana*, sendo a mais frequente a *Escherichia coli*, que foi isolada em 11 meses de coleta, seguindo-se *Enterobacter aerogenes* (10 meses) e da *Enterobacter gergoviae* (8 meses). Com relação à diversidade de bactérias por amostra, em *A. brasiliiana* variou de 0 a 8, com moda de três espécies de bactérias por amostra.

Onze espécies de bactérias do grupo coliformes foram isoladas em *T. plebeius*, sendo as mais frequentes a *Escherichia coli*, isolada em 12 meses de coleta, seguida de *Enterobacter aerogenes* (nove meses) e da *Enterobacter gergoviae* (sete meses). Com relação à diversidade de coliformes por amostra, o número de espécies em *T. plebeius* variou de 0 a 8, com moda de três espécies de bactérias/amostra.

O quantitativo de coliformes na água foi de 12 espécies, sendo as mais frequentes *Enterobacter gergoviae*, isolada em todas as coletas, seguida da *Escherichia coli* (11 meses) e da *Enterobacter aerogenes* (sete meses). Com relação à diversidade de bactérias por amostra, o número na água variou de 0 a 9, com moda de três espécies de bactérias/amostra.

As associações de bactérias do grupo coliforme não apresentaram uma estrutura distinta entre os três substratos: *A. brasiliiana*, *T. plebeius* e na água, como pode ser observada na Fig. 5. Não sendo observada diferença significativa entre os três substratos ($F_{(2,22)} = 1.10$; $p = 0,2871$).

Tabela 3. Espécies de bactérias do grupo coliformes isoladas na água, *Anomolacardia brasiliiana* e *Tagelus plebeius* no ponto 1 durante o período de junho de 2009 a maio de 2010, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

Microrganismos isolados	Água	Moluscos	
	N* (%)	<i>A. brasiliiana</i> N* (%)	<i>T. plebeius</i> N* (%)
<i>Buttiauxella agrestis</i>	02 (2,41)	01 (1,50)	03 (3,03)
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	01 (1,21)	-	03 (3,03)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	14 (16,87)	17 (25,00)	12 (12,10)
<i>Enterobacter gergoviae</i>	12 (14,46)	11 (16,18)	17 (17,20)
<i>Escherichia coli</i>	35 (42,17)	30 (44,00)	47 (47,47)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	07 (8,43)	03 (4,42)	04 (4,04)
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	-	02 (2,90)	01 (1,01)
<i>Kluyvera ascobarta</i>	06 (7,23)	04 (6,00)	05 (5,05)
<i>Pantoea agglomerans</i>	01 (1,20)	-	01 (1,01)
<i>Providencia alcalifaciens</i>	01 (1,20)	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	02 (2,02)
<i>Serratia liquefaciens</i>	04 (4,82)	-	04 (4,04)
	83	68	99

*N = número de isolados

Tabela 4. Espécies de bactérias do grupo coliformes isoladas da água e em *Anomolacardia brasiliiana* e *Tagelus plebeius* no ponto 2 durante o período de junho de 2009 a maio de 2010, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

Microrganismos isolados	Água	Moluscos	
	N* (%)	<i>A. brasiliiana</i> N* (%)	<i>T. plebeius</i> N* (%)
<i>Buttiauxella agrestis</i>	03 (3,89)	05 (7,04)	01 (2,27)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	04 (5,2)	14 (19,71)	06 (13,64)
<i>Enterobacter gergoviae</i>	18 (23,38)	12 (17,00)	03 (6,82)
<i>Escherichia coli</i>	36 (46,76)	29 (40,80)	21 (47,70)
<i>Klebsiella ozaenae</i>	01 (1,3)	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	04 (5,19)	02 (2,81)	05 (11,36)
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	03 (3,89)	01 (1,40)	-
<i>Kluyvera ascobarta</i>	03 (3,89)	05 (7,04)	05 (11,36)
<i>Pantoea agglomerans</i>	-	01 (1,40)	-
<i>Providencia alcalifaciens</i>	-	01 (1,40)	-
<i>Providencia rettgeri</i>	-	01 (1,3)	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	05 (6,5)	01 (1,40)	03 (6,82)
	78	71	44

*N = número de isolados

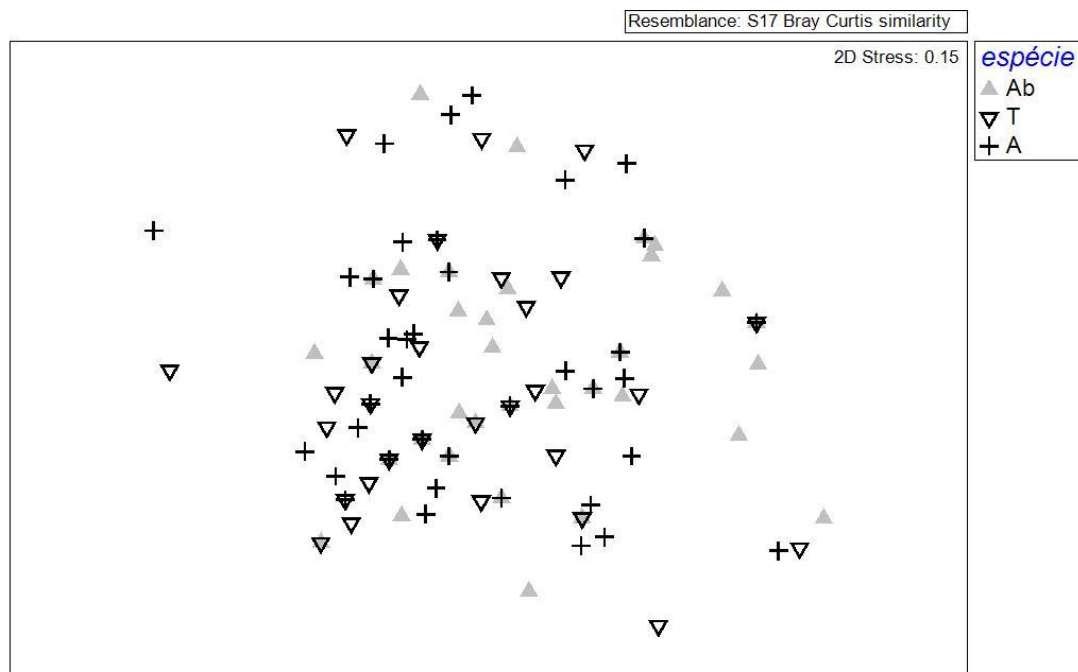


Fig. 5 – Escalonamento multidimensional das espécies de coliformes na água (A) e nos bivalves *Anomalocardia brasiliana* (Ab) e *Tagelus plebeius* (T) durante o período de junho de 2009 a maio de 2010 nos dois pontos de coletas, Bacia do Pina, Recife, Pernambuco, Brasil.

Com relação à pesquisa de *Salmonella* spp. nos dois bivalves, esta foi negativa em 25g de todas as amostras analisadas, nos dois pontos estudados.

Ainda que muito baixa, algumas bactérias apresentaram correlação com os parâmetros ambientais, sendo maior coeficiente de determinação obtido para *Escherichia coli* em relação a DBO, que foi de 11,38%, seguida de *Enterobacter aerogenes* ($r = -0,360$; $p = 0,017$) em *A. brasiliana*. A correlação do OD com a *Escherichia coli* isolada na água, também foi baixa ($r = -0,332$; $p = 0,022$). Bem como a correlação da salinidade com a *Klebsiella pneumoniae* ($r = 0,300$; $p = 0,040$) e *K. rhinoscleromatis* ($r = 0,281$; $p = 0,054$) isolados da água. Correlação da precipitação pluviométrica com a *Escherichia coli* ($r = -0,337$; $p = 0,020$) isolada da água e *Providencia rettgeri* ($r = 0,333$; $p = 0,043$) de *T. plebeius* e o pH com a *Escherichia coli* ($r = -0,326$; $p = 0,025$) isolada da água.

DISCUSSÃO

A contaminação de águas costeiras estuarinas é um sério problema ambiental. A Bacia do Pina, é utilizada como meio de subsistência de muitos pescadores artesanais que se dedicam à captura de moluscos bivalves para consumo familiar e para comercialização. Porém, as condições sanitárias da área são muito comprometidas, devido às descargas de efluentes domésticos e águas residuais não tratadas ou tratadas inadequadamente.

A contaminação microbiológica dos moluscos bivalves compromete a qualidade do pescado e a saúde humana. De acordo com Wood (1976), os exames microbiológicos periódicos da água e dos moluscos bivalves compõem excelente parâmetro indicador da contaminação por microrganismos patogênicos. Portanto, os bivalves são utilizados como organismos sentinelas da qualidade do ecossistema marinho, ou seja, através do monitoramento da concentração de poluentes em seus tecidos. Os bivalves estudados, *T. plebeius* e *A. brasiliana*, devido aos seus hábitos filtradores, têm sido apontados como potenciais indicadores de contaminação microbiológica, não só por bactérias ambientais, como aquelas consideradas patogênicas cujos resultados podem ser úteis tanto para vigilância ambiental e sanitária quanto epidemiológica.

No Brasil as concentrações de CT para águas são regulamentadas pela Resolução nº 357 de 2005 do CONAMA, onde os bivalves poderão ser extraídos e/ou cultivados. A densidade de CT, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 NMP 100 ml⁻¹ e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 CT por 100 ml. Estes índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de cinco amostras. A água da Bacia do Pina, de acordo com a densidade de CT pode ser classificada como água de Classe 1 (aquicultura, atividades de pesca e contato primário) e/ou de Classe 2 (pesca amadora e recreação de contato secundário), o que demonstra que a qualidade está em desacordo com a legislação vigente, devido a elevados números de coliformes NMP ml⁻¹.

Em estudo envolvendo ostras *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) de um estuário da costa do Golfo do México, Burkhardt III & Calci (2000) encontraram concentrações de

coliformes quatro vezes maiores nos moluscos do que na água adjacente. Pereira et al. (2006) estudando ostras da região costeira de Florianópolis (Santa Catarina, Brasil), encontraram concentrações variando de < 3 a $> 1,1 \times 10^3$ NMP g⁻¹ para CT. Kolm & Absher (2008) obtiveram valores entre $6,4 \times 10^2$ e $4,8 \times 10^3$ NMP g⁻¹ em *C. rhizophorae* (Guilding, 1828) e *C. brasiliiana* Lamarck no complexo estuarino de Paranaguá (Paraná, Brasil). Neste estudo, as concentrações de coliformes totais e termotolerantes nos bivalves em relação à água, seguiram este padrão, existindo, em algumas amostras, uma relação inversa, o que pode ter sido devido à descarga recente de fontes poluidoras.

Sanchez et al. (1991) em estudo com ostras coletadas no litoral do estado de São Paulo obtiveram níveis de CT que variaram de 7,0 a $3,0 \times 10^5$ g⁻¹, maiores que os encontrados neste trabalho. Na análise de bactérias de origem fecal contaminantes de ostra *Crassostrea rhizophorae* no estuário do Rio Cocó (Ceará, Brasil) encontraram valores para Ct e CT nos tecidos variando entre $< 1,8$ g⁻¹ a > 1600 g⁻¹ e $< 1,8$ g⁻¹ a 920 g⁻¹, respectivamente (Silva et al. 2003), índices inferiores aos observados neste estudo, enquanto Vieira et al. (2008) em pesquisa sobre a contaminação fecal em *Crassostrea rhizophorae* do estuário do Rio Pacoti (Ceará, Brasil), obtiveram NMP de coliformes totais nas amostras das ostras variando de $< 1,8$ a $3,5 \times 10^3$ g⁻¹ e coliformes termotolerantes variando de $< 1,8$ a $2,8 \times 10^3$ g⁻¹, ou seja, próximos aos encontrados no presente estudo. Vieira et al (2007) encontraram níveis de NMP de Ct variando de $< 1,8$ a 9200 g⁻¹ e CT variando de $< 1,8$ a 430 g⁻¹ em *Crassostrea rhizophorae* no estuário do Rio Jaguaribe (Ceará, Brasil), níveis abaixo dos observados neste estudo. Ramos et al. (2010) encontraram valores de $< 3,0$ a $8,0 \times 10$ NMP g⁻¹ em *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), sendo que 77% das amostras foram inferiores a $< 3,0$ NMP g⁻¹ da Baía Sul (Santa Catarina, Brasil). Lucena et al. (1994) também observaram que as concentrações nos níveis de bactérias em *Mytilus edulis* d'Orbigny, 1846 foram maiores que na água, indicando ocorrência de bioacumulação, com aumento dos índices relacionado ao aumento da poluição.

Entre os grupos de indicadores bacterianos, de maior importância sanitária na determinação da qualidade microbiológica da água, se encontram os coliformes totais e termotolerantes. De acordo com Apha (2000), o grupo coliforme é heterogêneo e constituído de bactérias fermentadoras de lactose, pertencente à Família Enterobacteriaceae, cujos principais gêneros são *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia*.

Os membros do grupo coliformes podem ter sua origem fecal, sendo a *Escherichia coli*, bactéria presente na microbiota intestinal de homens e animais de sangue quente, a espécie do grupo coliforme de maior importância em estudos de qualidade de água (Chiroles Rubacalba et al. 2007). Caplenas & Kanarek (1984) sugeriram que o termo coliformes fecais deveria ser substituído por coliformes termotolerantes, devido a algumas espécies não terem, necessariamente, origem fecal, como, por exemplo, as espécies dos gêneros *Klebsiella* e *Citrobacter*.

As 13 espécies de coliformes isoladas na Bacia do Pina são bactérias comuns em ambientes estuarinos de regiões tropicais impactadas. A área estudada é influenciada pelos grandes aportes de efluentes domésticos e águas não tratadas provenientes das comunidades ribeirinhas desprovidas de saneamento básico e com pouca ou nenhuma segurança sanitária. No presente estudo nove gêneros bacterianos foram identificados, com destaque para *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*. Outros autores também identificaram coliformes na água, como Hazen & Toranzos (1990) que encontraram os gêneros *Klebsiella* e *Citrobacter* com alta frequência em águas tropicais; Chiroles-Rubacalba et al. (2007) isolaram seis espécies do grupo coliformes em águas tropicais de Cuba, dentre estas, *Escherichia coli* (69,7%), *Klebsiella pneumoniae* (9,7%), *Enterobacter aerogenes* (9%) e *Citrobacter amalonaticus* (0.6%), coincidindo com os resultados do presente estudo. Estas bactérias foram as mais frequentes e mais abundantes no estuário da Bacia do Pina.

Sousa et al. (2004) analisando amostras de *Crassostrea rhizophorae* do estuário do Rio Cocó (Ceará, Brasil), encontraram *Providencia* spp. (41%), *Klebsiella* spp. (8,3%), *Proteus* spp.

(16,6%) e *Morganella morganii*. Barros et al. (2005) avaliando as condições microbiológicas de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em dois pontos da Praia do Futuro (Ceará, Brasil) identificaram *E. coli* (86,6%), *Enterobacter* spp. (37,3%), *Citrobacter freundii* (9,2%), *Enterobacter* spp. (28,5%) e *Klebsiella* spp. (3%). Alguns dos gêneros encontrados por estes autores coincidem com os identificados neste estudo.

Com exceção de *Providência rettgeri*, todas as espécies de coliformes foram isoladas da água. A referida espécie ocorreu em *A. brasiliensis* e *T. plebeius* simultaneamente e apenas no mês de junho/2009 – período chuvoso. A ausência desta espécie na água sugere que a filtração ocorreu em eventos anteriores à coleta dos moluscos e, provavelmente, houve renovação no ambiente pelo movimento da maré.

No mês de junho, na água, dos 13 microrganismos do grupo coliformes identificados, seis espécies foram isoladas. O regime de chuvas influenciou na composição qualitativa das espécies; nesse mês a média dos dez dias que antecederam a coleta foi de 11,85mm, a maior em todo o período estudado. Outra explicação pode ser dada, pela especificidade ecológica das espécies, os coliformes têm pouca tolerância à salinidade das águas do mar, sendo o sal tóxico para estas bactérias, existe a eliminação de 90% da população de *E. coli* em poucas horas ou minutos (Hagler & Hagler 1988).

As variações espaço-temporal das comunidades bacterianas que indicam a contaminação fecal nas áreas costeiras não são homogêneas em toda a sua extensão e as flutuações encontradas estão associadas, principalmente, as condições locais e temporais tais como a localização das fontes de contaminação (rios, deságues, esgotos, etc.), a ocorrência de precipitação e regime hidrodinâmico imperante (Delgado Gomez et al. 2008). Este fato foi observado por Sande et al. (2010) e Gayathri et al. (2011) que estudando a qualidade ambiental através das análises de *Crassostrea rhizophorae* e *T. plebeius* e do mexilhão *Perna viridis* concluíram que, não houve variação na composição qualitativa, e a distribuição das bactérias dependem das condições da temperatura da água, salinidade e outros parâmetros físico-químicos. Neste estudo, também não

houve correlação entre as espécies e os períodos chuvoso e seco, nem entre as espécies e os pontos de coletas.

Um dos organismos patógenos de maior importância, quando se deseja constatar contaminação por esgotos é *Escherichia coli*. Neste estudo a presença desta bactéria foi constante nos três substratos e nos dois pontos amostrados. O isolamento de *E. coli* em todos os meses e principalmente nos dois bivalves, torna-se preocupante devido o risco à saúde humana. Ela é um microrganismo da microbiota normal do intestino dos humanos e animais homeotérmicos, que pode provocar infecções urinárias, septicemia e doença diarreica. A presença de bactérias do grupo coliforme em moluscos filtradores é uma ocorrência mundial, pois áreas costeiras são locais para reprodução e crescimento de bivalves, e geralmente há escoamento de esgoto e desembocadura de rios que carregam contaminantes, cuja concentração interfere na qualidade microbiológica dos moluscos. Na área estudada ocorre uma descarga constante de efluentes oriundos dos rios que deságuam na Bacia do Pina, além da precariedade de saneamento básico das residências do local. Portanto, justifica a ocorrência desta bactéria durante todo o período estudado.

O gênero *Salmonella* é outro patógeno muito estudado nos alimentos marinhos, dada a sua virulência e habilidade para sobreviver em grande variedade de estresse por grande período de tempo (Baggesen et al. 2000). Segundo Martínez et al. (2003), a presença de *Salmonella* em sistemas aquáticos se atribui as descargas de águas residuais urbanas, agrícolas e resíduos da zona costeira, os quais representam um foco de contaminação permanente.

González et al. (2009) estudando as condições sanitárias de *C. rhizophorae* e da água da Laguna Grande de Obispo (Venezuela), encontraram *E. coli*, *Serratia rubidaea* e outras seis espécies, isolando *Salmonella* em amostras pontuais nos locais estudados, enquanto que Pereira et al. (2006), Henriques et al. (2007) e Muñoz et al. (2008) não detectaram *Salmonella* spp. em suas amostras. Estes resultados corroboram com os dados observados nesse trabalho. Na Bacia do Pina não foram isolados de *Salmonella* spp. nos bivalves, o que indica que, para esta bactéria

patogênica, o estuário apresentou condições apropriadas, de acordo com o que preconiza a legislação para a detecção desta bactéria em alimentos (Brasil 2001).

Embora o isolamento de outras espécies de Enterobacteriaceae seja em menor percentual, os resultados encontrados neste estudo, são úteis para se reconhecer a importância de patógenos bacterianos presentes na Bacia do Pina. Os membros do gênero *Providencia* não são considerados como fortes patógenos e são usualmente isolados de casos clínicos. Como outros patógenos oportunistas eles podem provocar doenças infecciosas e levar a morte. *Providencia rettgeri* é uma espécie que ocasiona infecções no trato urinário, diarreia dos viajantes e outras doenças. Outra espécie a *P. alcalifaciens* está relacionada com casos de diarreias, principalmente em crianças (O'Hara et al. 2000).

A *Citrobacter amalonaticus* é uma espécie considerada patogênica oportunista e já foi isolada da água, peixes, outros animais e em alimentos. É uma espécie habitante da microbiota intestinal do ser humano e provocam várias doenças que incluem bacteremia/sepsis, infecção urinária, infecções do trato respiratório e outras doenças (Suwansrinon et al. 2005).

O gênero *Serratia* é reconhecido como um patógeno importante, com propriedades invasivas e alta resistência a muitos antibióticos utilizados na atualidade. A *Serratia liquefaciens* é um patógeno oportunista e que pode provocar infecções no trato urinário e no trato respiratório (Menezes et al. 2004).

Outra espécie isolada neste estudo, *Pantoea agglomerans* é relatada como habitante de plantas, água, solo e também como comensal em animais e ser humano. A infecção mais comum causada por esta bactéria é artrite séptica, mas também em infecções respiratórias e alergia na pele (Liberto et al. 2009).

No estuário da Bacia do Pina, a salinidade foi maior no período seco e no ponto 1, no período chuvoso, maiores índices pluviométricos causaram redução da salinidade. As análises indicaram, porém, que não houve diferença significativa detectável entre os dois pontos e os dois períodos climáticos. De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama 2005), os

valores encontrados neste estudo para as amostras de água enquadram estas como salobras (0,5 a 30), típicas de estuários tropicais.

O pH da Bacia do Pina foi caracteristicamente alcalino observado durante o período estudado e corrobora com os estudos de Feitosa et al. (1999) e Nascimento et al. (2003) realizados no mesmo estuário. Os valores de pH observados na água da Bacia do Pina são favoráveis ao desenvolvimento de coliformes, porém, não houve correlação entre a densidade desses e o pH.

Segundo Rozen & Belkin (2001), o pH da água do mar encontra-se entre 7,5 e 8,5 e é influenciado pela temperatura, pressão e atividades fotossintéticas e respiratórias dos microrganismos. O pH em torno de 8,0 contribui para um efeito deletério na sobrevivência de *E. coli*, enquanto que um pH mais ácido, de aproximadamente 5,0, favorece o desenvolvimento da bactéria. Nesta pesquisa os valores encontrados de pH, estão todos de acordo com a legislação vigente (Conama 2005), e se encontraram dentro do padrão para o desenvolvimento das bactérias e *Escherichia coli* mostrou correlação significativa inversa com o pH.

Os valores de OD estiveram abaixo do preconizado na Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama 2005) na qual é citada que, águas salobras, onde haja pesca ou cultivos de organismos para fins de consumo intensivo, devem apresentar uma medida de OD não inferior a 4 mg l⁻¹. Valores mais elevados da DBO coincidiram com as maiores taxas de saturação do OD, exceto para o mês de abril/2010. O percentual de saturação variou de 0% a 253% em decorrência da variação de aporte de matéria orgânica, trazida pelos efluentes domésticos oriundos dos rios que deságuam na Bacia do Pina. Os dados de DBO e OD estiveram correlacionados com as treze espécies de coliformes, porém, com baixo poder explicativo.

A utilização de índice de coliformes na avaliação da balneabilidade e de qualidade microbiológica de água tem sido discutida. Segundo Hagler et al. (1986) a especificidade de um indicador depende da elevada temperatura de incubação como fator seletivo para a sua enumeração.

Segundo Vieira (2000) há possibilidade de interferência nos resultados, microrganismos autóctones adaptados a altas temperaturas de ambiente como é o caso das espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, podem ser isoladas também nos testes para coliformes termotolerantes.

Ressalta-se que, a contaminação bacteriológica do ambiente estuarino, principalmente em regiões de alta densidade demográfica, além de colocar em risco a saúde humana, pode causar danos às espécies presentes no habitat, interferindo na resistência dos bivalves a fatores abióticos (exposição ao ar e variação da temperatura e salinidade), ou a fatores bióticos (predisposição ao parasitismo) (Henriques et al. 2003, Henriques et al. 2007).

A contaminação de moluscos bivalves por bactérias ocorre exclusivamente por via hídrica, uma vez que a alimentação e respiração dos moluscos são realizadas através da corrente ventilatória e filtração da água na cavidade do manto. Dessa forma, a bactéria encontrada no molusco e não detectada nas amostras de água, indica que a contaminação bacteriana ocorreu antes da captura do molusco. A microbiota isolada dos bivalves reflete as condições de qualidade da água anteriores à sua coleta, e a isolada da água pode refletir os microrganismos de fontes exógenas e/ou oriundas do próprio bivalve. Uma vez que o molusco pode funcionar como um meio de cultura vivo para proliferação da bactéria e, inclusive, atuar como um hospedeiro temporário. Dessa forma, os bivalves são potenciais exportadores das bactérias presentes na água.

Romalde & Barja (2010) reportam-se que espécies de moluscos servem como hospedeiros para bactérias patogênicas, pois as bactérias se proliferam nas brânquias, hemolinfa, manto, velum e tecidos internos. Cerutti & Barbosa (1991) afirmaram que além da adaptação da bactéria ao ambiente marinho, fatores como a resistência bacteriana à degradação enzimática e utilização do conteúdo digestivo como fonte de nutrientes são provavelmente decisivos na seleção das bactérias pelos bivalves.

A ausência de padrão de distribuição espacial e temporal das densidades de bactérias e a falta de correlação entre as densidades e as variáveis dos parâmetros ambientais, afirmam que a Bacia do Pina comporta uma grande diversidade de bactérias ambientais e patogênicas na água, porém a ocorrência é aleatória e influenciada por aportes de efluentes de diversas origens.

O bivalve *A. brasiliiana* é considerado uma espécie bastante resistente, tanto à deficiência do oxigênio dissolvido quanto à variação de salinidade, condições observadas neste estudo. Por possuir boa adaptação a condições de hipoxia e até de anoxia, a presença desta espécie pode ser favorecida em locais com essas condições. *A. brasiliiana* esteve presente durante todo o período de estudo, apresentou capacidade de acumular bactérias em seus tecidos, e demonstrou tolerância à poluição ambiental, características que favorecem sua utilização como indicadora dos níveis de coliformes na área estudada, quando comparada com *T. plebeius*.

LITERATURA CITADA

- Apha (1985) Standard Methods for the Examination of water waste-water. New York: 1268 p.
- Almeida MA, Cunha MA, Alcantara F (2001) Factors influencing bacterial production in a shallow estuarine system. FEMS Microbiol Ecol 42:416-426
- American Public Health Association (2000) Standards methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC: APHA
- Anderson MJ (2005) PERMANOVA: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance. Departament of Statistics, University of Auckland, New Zealand.
- Baggesen D, Sandvang D, Aarestrup F. (2000) Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. J Clin Microbiol 38:1581-1586

Barros LMO, Theophilo GND, Costa RG, Rodrigues DP, Vieira, RHSF. 2005. Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará. Rev Ciên Agron 36:285-289

Brasil (2003) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, seção I, 18 de set, 2003. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/legislacao/sislegis>. Acesso em: 18 de setembro de 2009.

Brasil (2001) Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, Brasília, DF, nº7, seção I, 10 jan. 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 18 de setembro de 2009

Buller, NB (2004) Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. Cabi Publishing:Cambridge. 361 p

Burkhardt III W, Calci KR (2000) Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. Appl Environ Microbiol 66:1375-1378.

Caplenas NR, Kanarek MS (1984) Thermotolerant non-fecal source *Klebsiella pneumoniae*: validity of the fecal coliform test in recreational waters. Am. J. Publ. Health 74:1273–1275

Cerutti RL, Barbosa TCP (1991) Flora bacteriana heterotrófica em ostras (*Crassostrea rhizophorea*) e águas da Baía Norte, Ilha de Santa Catarina, Brasil. Rev. Microb. 22, 330-334.

Chiroles Rubalcaba S, González MI, Torres Rojas T, Valdés Águila M, Domínguez Martínez I (2007) Bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba). Hig Sanid Ambient 7:222-227

Conselho Nacional do Meio Ambiente. (CONAMA) Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a qualidade dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes e dá outras

providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em 18 de setembro de 2009

Cook DW (1984) Fate of enteric bacteria in estuarine sediments and oyster feces. J Mississipp Acad Sci 29:71–76

Delgado Gomez Y, Miravet Regalado ME, Nunez Graell R (2008) Indicadores microbiológicos de calidad del agua en la costa oeste de Ciudad de la Habana, Cuba. Hig Sanid Ambient 8:387-391

Feitosa FAN, Nascimento FCR, Costa KMP (1999) Distribuição espacial e temporal da biomassa fitoplanctônica relacionada com parâmetros hidrológicos na Baía do Pina (Recife–PE). Trab Oceanogr Univ Fed PE 27:1-13

Gayathri V, Baheerathi CG, Revathi K, Sethi S (2011) Identification of gut microflora from green mussel (*Perna viridis*). Proceedings of International Conference on Implications of Biotechnology on Biodiversity and its Conservation, January 27 e 28

González M, Graü C, Villalobos LB, Gil H, Vásquez-Suárez A (2009) Calidad microbiológica de la ostra *Crassostrea rhizophorae* y aguas de extracción, Estado Sucre, Venezuela. Rev Científ FCV-LUZ XIX, 659 – 666.

Hagler AN, Hagler LCM, Santos EA, Farage S, Silv-Filho JB, Schrank A, Oliveira RB (1986) Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. Sci Total Environ 58:151-160

Hagler AN, Hagler LCSM (1988) Indicadores Microbiológicos de qualidade sanitária. In: Roitman I, Travassos LR, Azevedo JL (ed.). Tratado de microbiologia. São Paulo, v. 1, p. 88-96.

Hazen T, Toranzos, G (1990) Tropical source water. In: McFeters GA, (eds). Drinking Water Microbiology. Progress and Recent Developments. New York, p.33-53.

Henriques MB, Marques HLA, Lombardi JV, Pereira OM, Garcia ALB (2003) Influência da contaminação bacteriológica sobre a resistência do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) à exposição ao ar. Arq Ciên Mar 36:95-99

- Henriques MB, Pereira OM, Marques HLA (2007) Resistência do mexilhão *Perna perna* a altas temperaturas e sua relação com a contaminação bacteriológica. *Arq Ciên Mar* 40:52–57
- Holt JG, Kreig NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST (1994) *Bergy's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 787 p.
- Kolm HE, Absher TM (2008) Bacterial density and coliform organisms in waters and oysters of Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil. *B Inst Pesca* 34:49-59.
- Lapointe BE, Clark MW (1992) Nutrient inputs from the watershed and coastal eutrophication in the Florida keys. *Estuaries* 15:465-476
- Leal DAG, Franco RMB (2008) Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: metodologias de detecção e normas de controle. *Rev Panam Infectol* 10:48-57
- Liberto MC, Matera G, Puccio R, Russo TL, Colosimo E, Foca E (2009) Six cases of sepsis caused by *Pantoea agglomerans* in a teaching hospital. *N Microbiol* 32:119-123
- Lucena F, Lasobras J, McIntosh D, Forcadell M, Jofre J (1994) Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of bacteroides fragilis phages and coliphages in mussels. *Appl Environ Microbiol* 60:2272-2277.
- Machado IC, Koga SM, Woioechovsky E, Gelli DS (2000) Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário da Cananéia - SP, Brasil, como subsídio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliana*). 1 – Avaliação da qualidade da água. *Hig Aliment* 14:66-75
- Martínez J, Saco M, Hernández G, Lozano A, García O, Espinosa J (2003) Identification of *Salmonella serovars* isolated from live molluscan shellfish and their significance in the marine environment. *J Food Protect* 66:226-232
- Menezes EA, Cefazar FC, Andrade MSS, Rocha MVAP, Cunha FA (2004) Frequência de *Serratia* sp em infecções urinárias de pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia em Fortaleza. *Rev Soc Bras Med Trop* 37:70-71

- Miesciner JJ, Hunt DA, Redman J, Salinger A, Lucas JP (1992) Molluscan shellfish: oysters, mussels, and clams. In: American public health association; technical committee on microbiological methods for foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3 ed., c. 48, p. 897- 918. Washington: APHA
- Muñoz D, Graü MC, Villalobos BLB, Martínez C, Zerpa A (2008) Indicadores bacterianos em los mejillones *Perna perna* (Linné, 1758) y *P. viridis* (Linné, 1758) y en aguas de extracción de bivalvos procedentes de la costa norte y sur del estado Sucre, Venezuela. Rev Científ FCV-LUZ XVIII:595-606
- Nascimento FCR, Muniz K, Feitosa FAN, Araújo JP, Silva RMS, Silva GS, Flores-Montes MJ (2003) Disponibilidade nutricional da Bacia do Pina e Rio Tejió (Recife- PE- Brasil) em relação aos nutrientes e biomassa primária. Tropical Oceanography 31:149-169
- Neill M (2004) Microbiological indices for total coliform and *E. coli* bacteria in estuarine waters. Mar Pollut Bull 49:752-760
- O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM (2000) Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. Clin. Microbiol. Rev 13:534-546
- Pereira MA, Nunes MM, Nuernber L, Schulz D, Batista CRV (2006) Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. Braz J Microbiol 37:159-163
- Pruzzo C, Gallo G, Canesi L (2005) Persistence of *Vibrios* in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. Environ Microbiol 7:761-772
- Ramos RJ, Pereira MA, Miotto LA, Faria LFB, Silveira-Junior N, Vieira CRW (2010) Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. Rev Inst Adolfo Lutz 69:32-39.
- Regan PM, Margolin AB, Watkins WD (1993) Evaluation of microbial indicators for the determination of the sanitary quality and safety of shellfish. J Shellfish Res 12:95-100

- Romalde JL, Barja JL (2010) Bacteria in molluscs: good and bad guys. In: Méndez-Vilas, A. (ed.). Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. p.136-147
- Rozen Y, Belkin S (2001) Survival of enteric bacteria in seawater. FEMS Microbiol Rev 725:1-17
- Sanchez OS, Stoppe NC, Zanoni MI, Martinez SCGL, Ostini S, Segamarchi AL, Almeida GL. (1991) Caracterização da qualidade microbiológica de águas marinhas e moluscos bivalves do litoral norte do estado de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1, Anais..., São Paulo: p. 430-445.
- Sande D, Melo T, Oliveira GSA, Barreto L, Talbot T, Boehs AJL (2010) Prospecção de moluscos bivalves no estudo da poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus, Bahia, Brasil. Braz. J. Vet. Res Anim Sci 47:190-196
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR (2007) Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3. ed. São Paulo: Varela, 536 p.
- Silva AIM, Vieira RHSM, Menezes FGR, Fonteles-Filho A A, Torres RCO, Sant'Anna ES (2003) Bacteria of fecal origin in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Coco river estuary, Ceara State, Brazil. Braz J Microbiol 34:126-130
- Sousa OV, Vieira RHF, Menezes FGR, Reis CMF, Hofer E (2004) Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó River Estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. Rev Inst Med Trop S. Paulo 46:59-62
- Strickland JDH, Parsons TR (1972) A practical handbook of seawater analysis. Bull Canada 167:207-211
- Suwansrinon K, Wilde H, Sitprija V, Hanvesakul R (2005) Enteric fever-like illness caused by infection with *Citrobacter amalonaticus*. J Med Assoc Thai 88:837-840

- Troussellier M, Got P, Bouvy M, Arfi R, M'Boup, M, Lebihan F, Monfort P, Corbin D, Bernard C (2004) Water quality health status of the Senegal river estuary. *Mar Pollut Bull* 48:852-862
- Vieira RHSF (2000) Poluição microbiológica de algumas praias brasileiras. *Arq Ciên Mar* 33:77-84
- Vieira RHSF, Vasconcelos RF, Carvalho EMR (2007) Quantificação de vîbrios, de coliformes totais e termotolerantes em ostra nativa *Crassostrea rhizophorae*, e na água do estuário do Rio Jaguaribe, Fortim-CE. *Rev Bras Hig Sanid Anim* 1:1-13
- Vieira RHSF, Atayde MA, Carvalho EMR, Carvalho FCT, Fonteles Filho AA (2008) Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. *Braz J Vet Res Anim Sci* 45:180-189.
- Unesco (1986) International Oceanographic Tables, v. 4. UNESCO, Technical Papers in Marine Science 40:1-193
- Wait D, Hacney CR, Carrick RJ, Lovelace G, Sobsey MD (1983) Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams. *J Food Protect* 46:193-496
- Wang CW (1997). Microbial water quality criterion for fish and shellfish culture in coastal waters. ASEAN marine environmental management quality criteria for aquatic life and human health protection. ASEAN-Canada Technical Conference on Marine Science., Penang, Malaysia
- Wood PC (1976) Manual de Hygiene de los mariscos. Zaragoza: Acribia. 83p

MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES

Guidelines for MEPS Authors

Inter-Research (IR) considers for publication: Research Articles (preferably not more than 14 printed pages); Reviews, state-of-the-art evaluations of important current research areas (up to 25 printed pages); Invited Reviews, authored by prominent experts; Notes, brief reports of important new information deserving priority publication (up to 4 printed pages); Comments, critical, fair assessments of published works and Reply Comments, replies to comments (normally 2 to 3 printed pages; for details on Comments/Reply Comments click [here](#)); Theme Sections, integrated multiauthor analyses and syntheses initiated and coordinated by acknowledged experts; they highlight cutting-edge research areas or problems (as brief as possible); online Discussion Forums, focussing on current top issues; As I See It, important, *personal* perspectives (brief and fair). Articles of exceptional significance may be selected as Feature Articles and made available to the scientific community by open access on our website.

Authors will be offered the option of publishing their article as Open Access. For further details see [Open Access Initiative](#).

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscripts (mss) must (1) not be submitted simultaneously to any other publication outlet; (2) be original, i.e. not published before; (3) have been approved by all immediately involved, e.g. authors, institutional authorities; (4) meet ethics guidelines (see below). If the ms has previously been submitted to any publication outlet, this must be disclosed and a rationale for its submission to MEPS provided. Submission of a ms implies agreement to Inter-Research terms of publication, including transfer of copyright to Inter-Research and the online posting of a prepress abstract.

Submissions should consist of: (1) a cover letter with a brief description of the main goals and findings contained in the ms, and the response to reviews if the submission is a revision, (2) the ms itself. Acceptable electronic formats are Adobe pdf and MS-Word. Pages and lines should be numbered. All fonts must be embedded in the file, which must not contain any security settings. MSs should be submitted in a single file that contains all text, tables, and figures. Total file size should be no more than 5 MB. High quality figure files needed for production will be requested if necessary later when the ms are accepted.

All ms must be submitted via the MEPS editorial office, either online, by email, or by post. Mss will be handled by one of the Editors-in-Chief or one of the Contributing Editors. Authors are invited to specify their preference, and (in their cover letter) to identify 3-5 suitable referees.

1. Online manuscript submission system: click here ► **AUTHOR GATEWAY**.

2. Email submission: to the MEPS editorial office (meps-submissions@int-res.com). Attach two files (1: the cover letter, which may include a list of potential reviewers, and which must include the response to reviews if the submission is a revision; and 2: the ms). Hard copies are NOT required unless electronic submission is impossible. In that case, mss may be submitted - one hard copy and an electronic file on disc - by post.

3. By post: to Inter-Research, Nordbunte 23, 21385 Oldendorf/Luhe, Germany.

MANUSCRIPT PROCESSING

Mss are critically evaluated by at least 3 reviewers. The Editor decides on acceptance, revision, or rejection. Mss returned to authors for revision should be revised and resubmitted within 3 months, otherwise they may be considered as withdrawn.

Titles of accepted manuscripts are added to 'Forthcoming publications' on the IR Web site, together with a prepress abstract. Articles are published within a few days after corrected proofs have been returned by the corresponding author. Orders for offprint must be made when returning the proof (use the form provided). A copy of the journal volume or number, and offprints ordered will be mailed to the corresponding author after an issue is printed.

MANUSCRIPT PREPARATION

Please consider the following when preparing your ms. Consult recent IR publications as a general guide.

Once a ms has been accepted, upload or send it as a word-processing file (e.g. MS Word, not pdf or TeX), with separate figure files. Large files (>1 MB) can be uploaded to our ftp site (<ftp.int-res.com>), which can be freely accessed (please inform us if you upload anything).

Manuscript length

The target length of Research Articles is approximately 10 printed pages (about 6000 words).

Cover page

Title: Avoid 'A', 'An', 'The', 'On', etc. at the beginning; the title should have not more than 100 characters (ca. 15 words, 2 lines in print), and 150 characters at most. Compare:

'A novel method for the production of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28kDa) of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp and detection of WSSV by MAb-based antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay'

(236 characters, 37 words)

vs.

'Detection of white spot syndrome virus of shrimp by means of monoclonal antibodies specific to an envelope protein'

(114 characters, 19 words).

Provide a running head with 3 to 6 words; e.g. 'Detection of shrimp WSSV'.

Authors and addresses: If a ms has several authors from different institutions:

- use superscript numerals for identification;
- provide the address of each author's institution, including present address(es) if applicable. Include zip or postal code but not street address or box number
- use * to refer to a footnote that identifies the corresponding author and provide her/his e-mail.

Abstract: Limit length to 250 words. Provide concise information on your work and its principal results. Avoid literature cites, series of data, or meaningless clauses such as *'the results are discussed'*.

Key words: Supply 3 to 8 key words, listed in order of importance.

Text

Please use numbered pages and lines, 12 point font, and double spacing. Do your very best to use correct English grammar, spelling and punctuation; if you are not a native English speaker, you should have the text edited by someone who is, before sending the ms to IR. You may also wish to consult a 'How to' book such as Day & Gastel (2006) *How to write and publish a scientific paper, 6th edn* (Greenwood Press, Westport, CT).

Verbosity: Please eliminate verbiage; example:

'This speed was chosen because past studies by Miller (1995) and Smith (1998) have shown this to be slightly greater than the maximum sustained swimming speed.'

vs.

'This is slightly greater than the maximum sustained swimming speed (Miller 1995, Smith 1998).'

Genus and species names must be in italics; write the genus name in full at first mention in each paragraph and abbreviate whenever mentioned again in the same paragraph. When referring to a species, do not use the genus name alone, unless you have previously defined it that way; be precise when using 'sp.' (singular) and 'spp.' (plural).

Abbreviations: Define abbreviations and acronyms in the 'Abstract' and at first mention in the main text, and thereafter use only the abbreviation / acronym.

Equations and units: Use standard SI units. Relations or concentrations (e.g. mg per l) must be given as 'mg l⁻¹' (not mg/l). Variables are usually italicised (except for Greek letters). Italicisation should be consistent in normal, superscript and subscripted text. Leave one blank space on either side of '=', '>', ± etc. where these denote equalities or inequalities.

Example: 'p < 0.05, r²= 0.879' (*not* 'p<0.05, r²=0.879'); but: 'we studied organisms of size <0.5 µm'

Figures and tables

Figures: Please consult [Guidelines to Authors on Figure Preparation](#).

Figures, tables, and their captions should be self-explanatory; e.g. abbreviations and acronyms must be defined again here. If a figure or table provides data on biological species, its legend should begin with the full Latin name of that species. For table footnotes, use superscripted lower case letters; asterisks can be used to indicate statistical significance.

Literature cited

All quoted literature must be listed, and all listed literature must be quoted.

Periodicals: Use standard abbreviations according to 'BIOSIS Serial Sources'. You can download a list of journal abbreviations from www.int-res.com/misc/journallist.txt or use the bibliographic database software 'EndNote'. You can obtain styles for IR journals at www.endnote.com/support/enstyles.asp or [download here](#).

How to cite from MEPS (example):

- Blowden DA, Clarke A, Peck LS, Barnes DKA (2006) Antarctic sessile marine benthos: colonisation and growth on artificial substrata over three years. Mar Ecol Prog Ser 316:1-6

Books: Write the title of the book in lower case, and give the publisher and place of publication. In the case of book series, give the series editor as well. Example:

- Hanski I (2005) The shrinking world: ecological consequences of habitat loss. In: Kinne O (ed) Excellence in ecology, Book 14. International Ecology Institute, Oldendorf/Luhe

Papers from books, conference reports, symposium proceedings, etc.: Give the title of the chapter, the editor(s) and title of the volume, the publisher and place of the publisher (not the location where the conference was held), and the pages of the chapter. The date of the cite must be the year of publication (not the year in which the conference was held). Example:

- West TL, Amrose WG (1992) Abiotic and biotic effects on population dynamics of oligohaline benthic invertebrates. In: Colombo G, Ferrari I, Ceccherelli VU, Rossi R (eds) Marine eutrophication and population dynamics. Proc 25th Eur Mar Biol Symp. Olsen & Olsen, Fredensburg.

Dissertations: Write the title in lower case, 'MS / PhD thesis / dissertation', and give the university and its location. Example:

- Eve TM (2001) Chemistry and chemical ecology of Indo-Pacific gorgonians. PhD dissertation, University of California, San Diego, CA

Websites: Permanent databases such as FishBase, GenBank, or climatological sources may be included in the Literature Cited list; the date accessed must be given. URLs for printed publications also available online may be included with their citations. Other website references should only be cited in the body text. Example:

- Froese F, Pauly D (2009) FishBase. Accessed 13 Jan. www.fishbase.org

Electronic supplements

Material in a format unsuitable for inclusion within the article (overlong tables, video clips, mathematical derivations, etc.) may be published on the Inter-Research web-site as an electronic supplement, with a direct link from the online article. Supplementary Material must be closely integrated with the article itself and should not be misused as a convenient way of disseminating large amounts of extra information that would be better presented in a separate article or in an online repository. It must be carefully prepared, as it will not go through the full prepublication process of checking and copyediting. Inclusion of material in the electronic supplement is at the discretion of the Editors.

ETHICS

Research published in IR journals must have been conducted in accordance with institutional, national and international guidelines concerning the use of animals in research and/or the sampling of endangered species.

AUTHORSHIP

Individuals listed as authors must: (1) agree to be listed; (2) have contributed to the research reported; (3) approve the submitted version of the ms.

COPYRIGHT

Scientific information appearing in IR journals has been rigorously refereed, carefully quality-improved, and professionally selected by our editorial staff. These publications, and all parts thereof, are therefore protected by copyright. This covers the exclusive rights of the publisher to sell, reproduce (by any means, including photographic or electronic), distribute (including via photocopies, reprints, or electronic means), and store (on microfilm, in electronic data bases, on video disks, etc.) this material.

The acceptance regulations of a ms for publication automatically include the consent of the author(s) to transfer the copyright to the publisher. Permission for exceptions to these rules must be obtained in writing from the publisher at the time of ms submission. In the USA, photocopies may be made for personal or in-house use beyond the limitations stipulated under Section 107 or 108 of U.S. Copyright Law.

DISCLAIMER

Publisher, editors, reviewers and authors do not accept any legal responsibility for errors, omissions or claims, nor do they provide any warranty, express or implied, with respect to information published in IR journals.

Inter-Research:

Nordbunte 23 (+3, 5, 28, 30)

21385 Oldendorf/Luhe

Germany

Inter-Research levies no page charge.

The last issue of each set of 10 volumes features a combined author/title index

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Bacia do Pina é um estuário produtivo e muito importante do ponto de vista econômico para os pescadores artesanais de moluscos infaunais, porém não existe segurança sanitária devido a alta presença de bactérias nos bivalves e na água em toda a extensão do Coroa do Passarinho e em todos os meses estudados;

A espécie *Escherichia coli* esteve presente durante todo o período estudado em *Anomalocardia brasiliiana*, *Tagelus plebeius* e na água, confirmando a alta contaminação bacteriológica provenientes de impactos causados por efluentes não tratados;

Apesar de *Salmonella* spp. ser bastante comum em ambientes impactados por efluentes domésticos e esgotos, nesta investigação a sua presença não foi detectada;

A alta frequência de bactérias identificadas nos dois bivalves ratifica a recomendação de evitar o consumo desses moluscos mal cozidos e sem depuração, visto que a presença de algumas espécies consideradas patogênicas pode ocasionar risco à saúde humana;

A ausência de diferença significativa na composição qualitativa das bactérias em *Tagelus plebeius* e *Anomalocardia brasiliiana* indica que ambas as espécies possuem capacidade de bioacumular, exibindo excelente característica como indicadoras de contaminação bacteriana e de poluição orgânica na água;

Devido à maior abundância, a maior amplitude de distribuição espacial, a alta frequência de ocorrência, ao menor de esforço de captura e maior resistência, *Anomalocardia brasiliiana* demonstra ser a espécie melhor indicada como instrumento de aferição de qualidade microbiológica da água, quando comparada com *Tagelus plebeius*;

As espécies *T. plebeius* e *A. brasiliiana* são contaminadas por via hídrica, bioacumulam, funcionam como hospedeiro intermediário de bactérias e as exportam para o ambiente.

Recomenda-se promover projetos de educação sanitária e ambiental à população que se alimenta ou vivem da pesca de bivalves conscientizando-a dos riscos decorrentes do consumo das espécies oriundas de águas com percentual de microorganismos indicadores de poluição, como também reforçar a fiscalização da vigilância sanitária quanto aos procedimentos de acondicionamento, transporte, estocagem, conservação e processamento desses moluscos.