



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



Programa de
Pós-graduação
em Ecologia e
Conservação da
Biodiversidade

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE

GREICIENE DOS SANTOS DE JESUS

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA E PEIXES DE ÁREA
QUILOMBOLA DO MUNICÍPIO DE ANAJATUBA, MARANHÃO:** indicadores
higiênico-sanitários, estirpes diarreio gênicas de *Escherichia coli* e genes enterotoxigênicos de
Estafilococos coagulase positiva

São Luís - MA

2023

GREICIENE DOS SANTOS DE JESUS

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA E PEIXES DE ÁREA
QUILOMBOLA DO MUNICÍPIO DE ANAJATUBA, MARANHÃO:** indicadores
higiênico-sanitários, estirpes diarreio gênicas de *Escherichia coli* e genes enterotoxigênicos de
Estafilococos coagulase positiva

Dissertação de Mestrado apresentada em
cumprimento às exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da
Biodiversidade da Universidade Estadual do
Maranhão (UEMA)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nancyleni Pinto
Chaves Bezerra

São Luís - MA

2023

De Jesus, Greiciene Santos.

Caracterização microbiológica de água e peixes de área quilombola do município de Anajatuba, Maranhão: indicadores higiênico-sanitários, estirpes diarreogênicas de *Escherichia coli* e genes enterotoxigênicos de estafilococos coagulase positiva/ Greiciene dos Santos de Jesus. – São Luís, 2023.

148 f

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Estadual do Maranhão, 2023.

Orientador: Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra.

1.Comunidades tradicionais. 2. Pescado. 3. Microbiologia. 4. Enteropatógenos. 5. Cocos gram positivos. I.Título

CDU: 579.6:639.3(812.1)

GREICIENE DOS SANTOS DE JESUS

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA E PEIXES DE ÁREA QUILOMBOLA DO MUNICÍPIO DE ANAJATUBA, MARANHÃO: indicadores higiênico-sanitários, estirpes diarreio gênicas de *Escherichia coli* e genes enterotoxigênicos de *Estafilococos coagulase positiva*

Dissertação de Mestrado apresentada em cumprimento às exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

Aprovada em: 30/01/2023

Banca Examinadora



Prof^a. Dr^a. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra

Orientadora

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)



Prof^a. Dr^a. Adriana Cristina Bordignon

Avaliador Externo

Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Prof^a. Dr^a. Ilka Márcia Ribeiro de Souza Serra

Avaliador Interno

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

AGRADECIMENTO

A Deus, por me guiar em todos os caminhos e por me dar a estrutura necessária para vencer todos os obstáculos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra, pelos valiosos ensinamentos e amizade nesses anos de convívio.

Aos meus pais, José Santana de Jesus e Maria de Jesus dos Santos, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas.

Aos meus irmãos pela torcida, pelo companheirismo e amizade. A vocês, muito obrigada pelo carinho e amor incondicional sempre!

Aos professores Danilo Cutrim Bezerra, Hamilton Pereira Santos, Larissa Sarmiento dos Santos, Januaria Ruth, Célia Fonseca por todas as contribuições prestadas para desenvolvimento desta pesquisa e por toda a amizade construída.

Aos integrantes do Laboratório de Controle de Qualidade do Pescado, Joyce Caroline Campos Mendes Braga, Vanielly Viana Rodrigues Vieira, Izabela Alves Paiva, Juliany Silva Mendes, Ladilson Rodrigues Silva, Vytoria Mendes da Silva Monteiro e Marcelo Victor Silva, por toda a dedicação na execução das atividades desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes pela concessão de bolsa de mestrado, importante como subsídio econômico para permanência na pós-graduação.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água e ao Laboratório Multiusuários da Pós-Graduação (LAMP) por toda a infraestrutura laboratorial disponibilizada para a realização da pesquisa, pelos ensinamentos repassados, amizades construídas em que cito Luciana Bastos, Sr. Carlos, Rayara, Gisely, Fabiana, Elaine e a todos que de alguma forma contribuíram.

A todos os professores e equipe administrativa do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade – PPGECB pelos ensinamentos e informações repassadas.

E a Universidade Estadual do Maranhão – UEMA por viabilizar a realização desta pós-graduação.

Muito Obrigada!

*“Quando nos aquietamos somos o que somos,
quando nos movemos somos o que queremos”.*

Autor desconhecido.

RESUMO

Objetivou-se caracterizar a qualidade microbiológica de peixes e da água de área quilombola do município de Anajatuba - MA, por meio do diagnóstico de micro-organismos indicadores higiênico-sanitários e detecção de estirpes diarreio gênicas de *Escherichia coli* e genes enterotoxigênicos de estafilococos coagulase positiva. Para isso, foram coletadas amostras de água e peixe em ambiente alagável, em dois períodos sazonais (seco e chuvoso), da comunidade quilombola de Ponta Bonita. Parâmetros abióticos (pH, oxigênio dissolvido, condutividade, temperatura) foram aferidos *in situ* e coletadas quatro amostras de água do ambiente alagável. Os exemplares de peixes capturados, 21 *Hoplerythrinus unitaeniatus* (jeju) e 21 *Cichlasoma bimaculatum* (acará preto) foram transportados vivos em caixas isotérmicas em oxigenação até a Universidade Estadual do Maranhão. Em ambiente laboratório, foi realizada a quantificação de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de água e análises físico-químicas complementares (alcalinidade, cloretos, sólidos totais dissolvidos, nitrato, nitrito, ferro e turbidez). Após a eutanásia dos peixes, foi procedida à coleta de fragmentos musculares e realização das análises microbiológicas para caracterização da qualidade microbiológica dos peixes coletados: enumeração de bolores e leveduras, micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e de Estafilococos coagulase positiva (ECoP), quantificação de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *E. coli* e *Salmonella* sp. Das amostras positivas para *E. coli* e ECoP procedeu-se o isolamento e identificação bioquímica dos isolados, seguido da extração do DNA das culturas puras e caracterização dos isolados por análise molecular. Os resultados do estudo evidenciam que as amostras de água estavam alteradas nos parâmetros físico (turbidez), químico (OD, STD e ferro) e microbiológico (coliformes totais e *E. coli*). Quanto à caracterização microbiológica dos peixes, 9,52% (n= 04/42) foram considerados inaceitáveis para consumo humano para *Salmonella*. A enumeração de ECoP variou de <10 a $3,9 \times 10^4$ ECoP/g, sendo 9,52% (n= 04/42) considerados com padrão intermediário e 4,76% (n= 02/42) inaceitáveis para consumo. Do total de isolados, 33,34% (n= 6/18) eram estafilococos coagulase positiva (ECoP) e 66,67% coagulase negativa. Dos seis isolados de ECoP, três continham genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas SEC e SEE e um isolado de estafilococos coagulase negativa foi detectado o gen *see* produtor de enterotoxina estafilocócica (SE). A quantificação de *E. coli* variou de 3,6 a $>1.100 E. coli/g$, sendo 4,76% (n= 02/42) considerados com padrão intermediário e 4,76% (n= 02/42) considerados inaceitáveis para consumo. Foram obtidos 40 isolados bacterianos em peixes e 20 das amostras de água que se comportaram conforme o esperado para o padrão da espécie *E. coli* nos testes bioquímicos. Com as análises

moleculares, foram identificados em 10 isolados de água, genes de virulência característicos dos patótipos diarreiogênicos EPECa, EPECt e ETEC e em 30 isolados de peixes, os patótipos ETEC, EPECt e STEC. A quantificação de coliformes totais e termotolerantes e enumeração de micro-organismos aeróbios estritos e facultativos viáveis e bolores e leveduras revelou elevadas populações bacterianas o que sugere más condições higiênicas do local de captura, matéria-prima contaminada, além risco da presença de patógenos fecais. Com base nos resultados obtidos conclui-se que a caracterização microbiológica de *H. untaeniatus* e *C. bimaclatum* evidenciou micro-organismos indicadores higiênico-sanitários da legislação brasileira, micro-organismos indicadores do tempo útil de conservação e micro-organismos indicadores de condições higiênicas insatisfatórias. A presença desses agentes demonstra desequilíbrio do ambiente estudado. Do ponto de vista da saúde pública, torna-se importante e necessária uma campanha educacional dirigida aos quilombolas para conscientização sobre as boas práticas de biossegurança, principalmente relacionada à existência de outros animais próximos, como aqueles criados com finalidade pecuária (suínos, bovinos e bubalinos) e a necessidade do monitoramento microbiológico e físico-químicos periódico do ambiente alagável.

PALAVRAS-CHAVE: Comunidades tradicionais. Pescado. Microbiologia. Enteropatógenos. Cocos gram positivos.

ABSTRACT

The objective was to characterize the microbiological quality of fish and water in the quilombola area of the municipality of Anajatuba - MA, through the diagnosis of microorganisms that are hygienic-sanitary indicators and detection of diarrheagenic strains of *Escherichia coli* and enterotoxigenic genes of coagulase-positive staphylococci. For this, samples of water and fish were collected in a floodable environment, in two seasonal periods (dry and rainy), from the quilombola community of Ponta Bonita. Abiotic parameters (pH, dissolved oxygen, conductivity, temperature) were measured in situ and four samples of water from the flooded environment were collected. The captured fish specimens, 21 *Hoplerythrinus unitaeniatus* (jeju) and 21 *Cichlasoma bimaculatum* (black sugarfish) were transported alive in isothermal boxes in oxygenation to the State University of Maranhão. In a laboratory environment, the quantification of total coliforms and *E. coli* in water samples and complementary physical-chemical analyzes (alkalinity, chlorides, total dissolved solids, nitrate, nitrite, iron and turbidity) were carried out. After euthanasia of the fish, muscle fragments were collected and microbiological analyzes were carried out to characterize the microbiological quality of the collected fish: enumeration of molds and yeasts, strict and facultative aerobic mesophilic viable microorganisms and coagulase-positive Staphylococci (ECoP), quantification of total and thermotolerant coliforms, *E. coli* and *Salmonella* sp. From the positive samples for *E. coli* and ECoP, the isolation and biochemical identification of the isolates were performed, followed by the extraction of DNA from the pure cultures and the characterization of the isolates by molecular analysis. The results of the study show that the water samples were altered in terms of physical (turbidity), chemical (OD, STD and iron) and microbiological (total coliforms and *E. coli*) parameters. As for the microbiological characterization of fish, 9.52% (n= 04/42) were considered unacceptable for human consumption for *Salmonella*. The enumeration of ECoP ranged from <10 to 3.9×10^4 ECoP/g, with 9.52% (n= 04/42) considered as an intermediate standard and 4.76% (n= 02/42) unacceptable for consumption. Of the total isolates, 33.34% (n=6/18) were coagulase positive staphylococci (ECoP) and 66.67% coagulase negative. Of the six ECoP isolates, three contained genes coding for the staphylococcal enterotoxins SEC and SEE, and a coagulase-negative staphylococcal isolate detected the gene SE that produces staphylococcal enterotoxin (SE). The quantification of *E. coli* ranged from 3.6 to >1,100 *E. coli*/g, with 4.76% (n= 02/42) considered an intermediate standard and 4.76% (n= 02/42) considered unacceptable for consumption. Forty bacterial isolates were obtained from fish and 20 from water samples that behaved as expected

for the standard *E. coli* species in the biochemical tests. With molecular analyses, virulence genes characteristic of the diarrheagenic pathotypes EPECa, EPECt and ETEC were identified in 10 isolates from water and in 30 isolates from fish, the pathotypes ETEC, EPECt and STEC. The quantification of total and thermotolerant coliforms and the enumeration of viable strict and facultative aerobic microorganisms and molds and yeasts revealed high bacterial populations, which suggests poor hygienic conditions at the capture site, contaminated raw material, in addition to the risk of the presence of fecal pathogens. Based on the results obtained, it is concluded that the microbiological characterization of *H. unitaeniatus* and *C. bimaeculatum* showed microorganisms that are hygienic-sanitary indicators of Brazilian legislation, microorganisms that indicate useful storage time and microorganisms that indicate unsatisfactory hygienic conditions. The presence of these agents demonstrates imbalance in the studied environment. From the point of view of public health, an educational campaign aimed at quilombolas is important and necessary to raise awareness about good biosecurity practices, mainly related to the existence of other animals nearby, such as those raised for livestock purposes (pigs, cattle and buffaloes) and the need for periodic microbiological and physical-chemical monitoring of the flooding environment.

Key words: Traditional communities. Fish. Microbiology. Enteropathogens, Gram positive coconut.

LISTA DE TABELAS

METODOLOGIA GERAL

Tabela 1.	Sequência de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores na reação em cadeia da polimerase (PCR) e condições de amplificação para genes enterotoxigênicos de estafilococos coagulase positiva.....	56
Tabela 2.	Sequência de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores na reação em cadeia da polimerase (PCR) e condições de amplificação para as estirpes de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica.....	57

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Resultados físico-químicos e microbiológicos de amostras de água provenientes de ambiente alagável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão.....	64
-----------------	--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Investigating the incidence of <i>Salmonella</i> sp. in 21 <i>Cichlasoma bimaculatum</i> and 21 <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> individuals from wetland environment in Ponta Bonita Quilombola Community, Anajatuba County, Maranhão State.....	80
Tabela 2	Coagulase-Positive Staphylococci enumeration in 21 <i>Cichlasoma bimaculatum</i> and 21 <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> individuals from wetland environment in Ponta Bonita Quilombola Community, Anajatuba County, Maranhão State.....	82
Tabela 3	Counting <i>Escherichia coli</i> in 21 <i>Cichlasoma bimaculatum</i> and 21 <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> individuals from flooded environment in Ponta Bonita Quilombola Community, Anajatuba County, Maranhão State.....	84

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Sequência de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores na reação em cadeia da polimerase (PCR) e condições de amplificação para as estirpes de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica.....	97
Tabela 2	Patótipos de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica detectados em exemplares de peixes neotropicais provenientes de ambiente alagável de comunidade quilombola maranhense, Brasil.....	99
Tabela 3	Patótipos de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica detectados em amostras de água provenientes de ambiente alagável de comunidade quilombola maranhense, utilizada para fins de pesca artesanal.....	100

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Sequência de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores na reação em cadeia da polimerase (PCR) e condições de amplificação para genes enterotoxigênicos de estafilococos coagulase positiva....	113
Tabela 2	Enumeração de Estafilococos Coagulase Positiva (ECoP) em 21 <i>Cichlasoma bimaculatum</i> e 21 <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> provenientes de ambiente alagável de comunidade quilombola maranhense.....	114
Tabela 3	Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em <i>Cichlasoma bimaculatum</i> e <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> provenientes de ambiente alagável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão.....	117

LISTA DE FIGURAS

METODOLOGIA GERAL

Figura 1	Localização geográfica da comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, Maranhão, Brasil.....	48
Figura 2	Campo natural inundável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão.....	49
Figura 3	Exemplares de peixes capturados em ambiente alagável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão: (A) <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> (jeju); (B) <i>Cichlasoma bimaculatum</i> (acará preto).....	50
Figura 4	Extração do DNA das culturas puras de Estafilococos coagulase positiva (ECoP): (A) - culturas puras de ECoP e resina InstaGene Matrix® (BioRA); (B) - resina e enzima lisozima (20 ng/mL); (C) - centrífuga; (D) – termobloco.....	55

CAPÍTULO 1

Figura 1.	Localização geográfica da Comunidade de Ponta Bonita, município de Anajatuba – MA.....	61
Figura 2.	Ambiente alagável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão.....	62
Figura 3.	Coleta de amostra de água em ambiente alagável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aderência agregativa
Aa	Atividade de água
ACONERUQ	Associação das Comunidades Negras Rurais Quilombolas do Maranhão
APA	Área de Proteção Ambiental
ATCC	American Type Culture Collection
AVC	Acidente vascular cerebral
BDA	Batata Dextrose
BFP	Fimbrias formadoras de feixes
BHI	Caldo infusão cérebro coração
BP	Baird Parker
BPF	Boas práticas de fabricação
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CCN	Centro de Cultura Negra
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEPENE	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Marinha do Nordeste
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
Cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CT	Coliformes Totais
DAEC	<i>E. coli</i> difusante aderente
DCNTs	Doenças crônicas não transmissíveis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTHA	Doença de transmissão hídrica e alimentar
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EC	<i>E. coli</i>
ECoN	Estafilococos coagulase negativa
ECoP	Estafilococos coagulase positiva
EE	Enterotoxinas estafilocócicas

EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
EPECa	<i>E. coli</i> enteropatogênica atípica
EPECt	<i>E. coli</i> enteropatogênica típica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FCP	Fundação Cultural Palmares
G	Gramma
GEMS	Global Enteric Multi-Center Study
HE	Entérico de Hektoen
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IN	Instrução Normativa
Km	Quilômetro
LAMP	Laboratório Multiusuários da Pós-Graduação
LARAQUA	Laboratório de Reprodução de Recursos Aquáticos
LIA	Lisina Ferro
Lp	Comprimento padrão
LST	Lauril Sulfato Triptose
Lt	Comprimento total
LT	Termolábel
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCK	MacConkey
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
NC	Não Consta
Ng	Nanograma
NMP	Número Mais Provável
OD	Oxigênio Dissolvido
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas

PCA	Ágar Padrão para Contagem
PCR	Reação de cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
POA	Produtos de Origem Animal
Pt	Peso Total
RDC	Resolução De Diretoria Colegiada
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal
Rpm	Rotações por minuto
Sars-Cov-2	Síndrome respiratória aguda severa
SE	Enterotoxina estafilocócica
SEIR	Secretaria Estadual Extraordinária de Igualdade Racial
SHU	Síndrome hemolítico-urêmica
ST	Enterotoxinas termoestáveis
STD	Sólidos Totais Dissolvidos
STEAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa produtora de Shiga toxina
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TSA	Ágar Trypticase de Soja
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
TSST	Síndrome do choque tóxico
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USP	Universidade de São Paulo
VB	Verde Brilhante
VE-DTHA	Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar.
VM	Vermelho de Metila
VMP	Valor Máximo Permitido
VP	Voges Proskauer
WHO	Organização Mundial de Saúde
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato
ZEE	Zona Econômica Exclusiva
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	IMPORTÂNCIA E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	20
3	HIPÓTESE CIENTÍFICA DO TRABALHO	22
4	OBJETIVOS	22
4.1	Geral	22
4.2	Específicos	22
5	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
5.1	Panorama da Pesca no Mundo e no Brasil	23
5.2	Atividade Pesqueira no Estado do Maranhão	25
5.3	Campos Inundáveis	27
5.4	Comunidades Remanescentes de Quilombos	28
5.5	Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHAs)	29
5.6	Pescado e as Doenças de Origem Alimentar	30
5.7	Legislação Brasileira Referentes aos Padrões Microbiológicos para Peixes Fresco	32
5.8	Agentes Etiológicos	33
5.8.1	<i>Escherichia coli</i>	33
5.8.1.1	<i>Escherichia coli</i> comensal	34
5.8.1.2	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica	34
5.8.2	<i>Salmonella</i> sp.....	39
5.8.3	Gênero <i>Staphylococcus</i>	40
5.8.3.1	<i>Fatores de virulência de Staphylococcus aureus</i>	41
5.8.3.2	<i>Intoxicação alimentar estafilocócica</i>	42
5.8.3.3	<i>Enterotoxinas estafilocócicas</i>	43
5.8.3.4	<i>Fatores que afetam a multiplicação e a sobrevivência de estafilococos coagulase positiva e destruição de enterotoxinas estafilocócicas</i>	45
5.8.3.5	<i>Métodos de detecção de enterotoxinas</i>	46
5.8.4	Micro-organismos Indicadores de Conservação	47
5.8.4.1	<i>Micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos</i>	47
5.8.4.2	<i>Bolores e leveduras</i>	47
6	METODOLOGIA GERAL	48
6.1	Ética na Pesquisa	48
6.2	Área de Estudo	48
6.3	Variáveis Ambientais e Coletas de Amostras de Água e Peixe	49
6.4	Processamento do Material Biológico: eutanásia e coleta de fragmentos musculares	50
6.5	Procedimentos Laboratoriais	50
6.5.1	Físico-química da água	50
6.5.2	Microbiológicos	51
6.5.2.1	<i>Água</i>	51
6.5.2.2	<i>Peixes</i>	51
6.5.3	Moleculares	54
6.5.3.1	<i>Estafilococos coagulase positiva (ECoP)</i>	54

6.5.3.2	<i>Escherichia coli</i>	56
6.6	Análise dos Resultados	58
7	RESULTADOS	58
7.1	Capítulo 1 - QUALIDADE AMBIENTAL DE ÁGUA ORIUNDA DE LAGOAS MARGINAIS UTILIZADAS PARA FINS DE PESCA ARTESANAL EM COMUNIDADE QUILOMBOLA MARANHENSE	59
7.2	Capítulo 2 -MICROBIOLOGICAL FEATURING OF TWO NEOTROPICAL FISH SPECIES FROM THE QUILOMBOLA AREA OF MARANHÃO STATE, BRAZIL	72
7.3	Capítulo 3 - PATÓTIPOS DIARREIOGÊNICOS DE <i>Escherichia coli</i> EM DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS E ÁGUA ORIUNDOS DE ÁREA QUILOMBOLA MARANHENSE, BRASIL	91
7.4	Capítulo 4 - PRIMEIRA DETECÇÃO DE GENES ENTEROTOXIGÊNICOS EM DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS ORIUNDOS DE ÁREA QUILOMBOLA MARANHENSE, BRASIL	108
8	CONCLUSÃO GERAL	124
	REFERÊNCIAS	126
	ANEXO	145

1. INTRODUÇÃO

A produção pesqueira e aquícola mundial, no ano de 2020, foi de aproximadamente 180 milhões de toneladas de peixes, sendo que 98 milhões foram oriundas da pesca extrativa e 82 milhões da aquicultura. Do total dessa produção, 160 milhões de toneladas de peixe foram destinadas ao consumo humano e os 20 milhões restantes para o uso não alimentar, principalmente produção de farinha e óleo de peixe (FAO, 2021).

O aumento da produção aquícola mundial pode estar relacionado a diferentes fatores, entre eles, ao acréscimo do consumo de peixes na alimentação humana, seja como uma alternativa, ou em substituição, a outras fontes proteicas (SILVA, 2007; FORNARI *et al.*, 2017). A busca por melhor qualidade de vida, com a implementação de práticas alimentares mais saudáveis e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis, também contribuíram para que o consumo de peixes aumentasse nos últimos anos. Alto nível protéico, fácil digestibilidade, baixa taxa de gordura e, ainda a benéfica presença dos ácidos graxos poli-insaturados são apenas algumas das qualidades que constroem a boa imagem nutricional da carne de peixe (SILVA, 2007; MACEDO *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2015).

Relativamente ao consumo mundial de pescado¹, os dados oficiais apontam para um aumento de 9 kg (*per capita*) para 20,5 kg de 1961 a 2020, com registros de taxa de crescimento anual de 3,1 % nos últimos 59 anos, representando a maior taxa quando comparada a outras fontes de proteína animal, como as carnes de origem suína, de aves, bovina e de leite e derivados láteos (FAO, 2021).

O consumo de peixe também tem forte influência sociocultural em várias partes do mundo, a exemplo do Brasil, sobretudo em grupos tradicionais como, quilombolas e indígenas, grupos que têm sua subsistência alicerçada na agricultura, extrativismo e, principalmente na pesca artesanal (ALMEIDA, 2006; ARRUDA *et al.*, 2018).

Apesar dos inquestionáveis benefícios à saúde humana e deste integrar a cultura alimentar de diversos povos tradicionais (SARTORI; AMANCIO, 2012), o peixe é muito suscetível à deterioração microbiana devido à elevada atividade de água nos tecidos, ao teor de gorduras facilmente oxidáveis e ao pH próximo da neutralidade (pH= 6,6 - 6,8). Esses fatores intrínsecos favorecem o desenvolvimento bacteriano (FRANCO; LANDGRAF, 2002) que

¹**Pescado:** Por definição oficial, o termo “pescado”, segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA), por meio do Decreto nº 9.013, de 2017 inclui os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, répteis, equinodermos e outros animais aquáticos usados na alimentação humana (BRASIL, 2017).

podem colocar em risco a sanidade animal e a saúde pública, já que muitos desses agentes são potencialmente zoonóticos² (OLIVEIRA, 2005).

Às condições inerentes ao peixe, podem juntar-se outros fatores como condições ambientais (alterações físico-química e toxicológicas da água), atividades antrópicas, falta de higiene do manipulador e dos apetrechos de pesca dentre outras variáveis críticas que podem estar presentes em toda a cadeia produtiva, perpassando pela captura ou despesca até a mesa do consumidor. Todos esses fatores podem incrementar a proporção de patógenos presentes nos peixes e resultar em doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHAs).

Referente às DTHAs, segundo série histórica da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS), no período de 2007 a 2016, no Brasil, foram registradas 469.482 pessoas expostas, 118.104 doentes e 109 óbitos (BRASIL, 2018). Mas, há de se ponderar que os dados nacionais são subestimados, já que nem todos os comensais expostos são localizados para os estudos epidemiológicos. Além disso, há uma clara subnotificação dos eventos de DTHAs que ocorrem no País (FAÚLA; SOARES; DIAS, 2015). Quando o assunto é subnotificação, este se torna mais preocupante em grupos e subgrupos sociais específicos que ocupam ambientes em condições sanitárias inapropriadas e que, ocasionalmente, concentram-se em populações de pluralidade étnica, sustentados pela falta de serviços públicos, a exemplo dos quilombolas.

A série histórica supracitada evidencia, ainda que dos agentes etiológicos envolvidos nos surtos, 90,5% são bacterianos. Destes, 70,3% são bactérias de espécies não identificadas, 7,5% *Salmonella* spp., 7,2% *Escherichia coli* e 5,8% *Staphylococcus aureus*. E, quanto aos alimentos incriminados, pescado, frutos do mar e processados a base de pescado foram responsáveis por 0,8% dos surtos, apesar, de 66,8% se configurarem como alimentos de origem não identificados e 9% alimentos de natureza mista (BRASIL, 2018).

A *E. coli* é uma bactéria que integra a microbiota intestinal dos seres humanos e animais de sangue quente, sendo, constantemente, eliminada no ambiente, contaminando o solo, água e alimentos (SILVA *et al.*, 2010). Pertence à família Enterobacteriaceae trata-se da espécie mais pesquisada mundialmente, devido à sua importância para a saúde pública e à sua recorrência em doenças entéricas e extra intestinais (trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central. A gravidade da *E. coli* patogênica justifica a existência de programas de vigilância

²**Agentes zoonóticos:** agentes transmitidas de animais vertebrados para o homem e, também do homem para os animais, principalmente quando seu ciclo ecológico é alterado, seja por intervenção natural ou pela intervenção humana (POVILL; LAZAR; BONVICINO, 2017).

internacionais e nacionais que monitoram e rastreiam surtos ocasionados por esse micro-organismo. Embora nem todas as estirpes de *E. coli* apresentem o mesmo perfil epidemiológico, todos têm um enorme potencial para causar doenças e, portanto, configuram desafios prementes à saúde pública (CROXEN *et al.*, 2013).

Os *Staphylococcus* são micro-organismos ubíquos no ambiente e podem ser encontrados no ar, poeira, esgoto, água, superfícies ambientais, seres humanos e animais. De acordo com Hennekinne *et al.* (2010), 50 espécies e subespécies de *Staphylococcus* foram descritas com potencial para a produção de coagulase, designados como estafilococos coagulase positiva (ECoP). A atividade dessa enzima é considerada um fator de virulência por dificultar o acesso das células do sistema imune do hospedeiro às bactérias. Estirpes ECoP são claramente implicadas em casos de intoxicação alimentar, embora já tenham sido descritos alguns surtos de intoxicação estafilocócica associados a espécies coagulase negativa (BORGES *et al.*, 2008).

Os dados supracitados reforçam a necessidade de monitoramento e controle de indicadores higiênico-sanitários microbianos em peixes.

2. IMPORTÂNCIA E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Pesquisas têm sido realizadas no Brasil sobre a alimentação da população brasileira, entretanto poucas são direcionadas para as comunidades tradicionais (indígenas, ribeirinhos e quilombolas). Talvez em função do acesso geográfico, as populações tradicionais são negligenciadas, ficando escondidas na “genérica” denominação de trabalhadores rurais, desassistidos de ações públicas. Planos governamentais, “têm ignorado” a diversidade dos ecossistemas e a diversidade dos grupos humanos tradicionais. A invisibilidade dos quilombolas, por exemplo, é um fato e, pouca ou quase nenhuma referência lhes fazem nos planos estaduais maranhenses, apesar da representatividade numérica desses no estado do Maranhão. São problemas de toda ordem que perpassam pela questão da terra, da ocupação, as dificuldades de escoamento da produção e da exploração dos recursos naturais.

A Baixada Ocidental Maranhense é constituída por 21 municípios em que a maioria desses tem na atividade pesqueira uma importante fonte geradora de alimentos e renda para milhares de famílias (ALMEIDA, 2008). A região possui características que permitiram ao longo do tempo a instalação de diversas comunidades, compostas, principalmente por povos tradicionais. De acordo com Almeida (2013), essa região detém o maior número de comunidades remanescente de quilombos, embora nem todas estejam certificadas pela

Fundação Cultural Palmares (FCP) ou pela Associação das Comunidades Negras Rurais Quilombolas do Maranhão (ACONERUQ).

As comunidades tradicionais quilombolas que habitam a Baixada Ocidental Maranhense tem, na pesca artesanal, um importante modo de vida, obtendo uma relevante fonte de proteína ao longo do ano, sendo, a atividade realizada de acordo com os conhecimentos tradicionais empíricos (BERNARDES *et al.*, 2011; ARRUDA *et al.*, 2018). Nesse interim, é importante mencionar que o estado do Maranhão apresenta problemas de cunho ambiental e sanitário³ que isoladamente ou combinados podem ser responsáveis por danos irreparáveis à biodiversidade aquática e, ainda, predispor à disseminação e à endemicidade de enfermidades bacterianas.

Nessa perspectiva, além da identificação de micro-organismos e sua relação com o hospedeiro, estudos sobre agentes bacterianos em peixes são de grande importância para o ecossistema como um todo, visto que os micro-organismos em peixe, desempenham papel-chave, regulando a abundância e a densidade das populações hospedeiras. Logo, a presença de micro-organismos na ictiofauna, pode implicar em perdas econômicas e desequilíbrio social em comunidades tradicionais que tem no extrativismo pesqueiro, importante fonte de subsistência. Além disso, considera-se que há potencial risco zoonótico para a população consumidora, que ao ingerir o alimento contaminado, pode colocar em risco sua saúde.

Outro enfoque da pesquisa proposta é o seu alinhamento direto ou indireto com os seguintes Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), o que destaca a importância do estudo: (i) ODS 2 - acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; (ii) ODS 3 - assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades; (iii) ODS 6 - assegurar a disponibilidade e gestão sustentável da água e saneamento para todos; (iv) ODS 12 - assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis; e, (v) ODS 14 – assegurar a vida na água.

Finalmente outro enfoque a ser abordado nessa pesquisa é a incorporação de genes que codificam fatores de virulência característicos de estirpes enterotoxigênicas de ECoP e de *E. coli* diarreio gênica em peixes, metodologia molecular, a parâmetros tradicionais de avaliação de qualidade de peixes. Esta é uma abordagem inédita no estado do Maranhão. Nesse sentido, é que se justifica a realização da pesquisa.

³**Problemas de cunho ambiental e sanitário:** desmatamento e poluição devido ao lançamento dos esgotos domésticos e industriais, criação de animais domésticos de interesse pecuário em condições sanitárias precárias.

3. HIPÓTESE CIENTÍFICA DO TRABALHO

O crescimento desordenado das cidades localizadas na Baixada Ocidental Maranhense, aliado à falta de sistemas de tratamento de esgoto, desmatamento, criação precária e animais de interesse pecuário - suínos, bubalinos e bovinos – e domésticos, presença de espécies silvestres bioinvasoras e as mudanças climáticas globais, fundamentam a hipótese de que espécies de peixes neotropicais capturados de comunidade quilombola maranhense apresentam a qualidade microbiológica comprometida pela presença de micro-organismos indicadores de condições higiênico-sanitárias.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

- Caracterizar a qualidade microbiológica de peixes de área quilombola do município de Anajatuba – MA, por meio de micro-organismos indicadores higiênico-sanitários, estirpes diarreiogênicas de *Escherichia coli* e genes enterotoxigênicos estafilococos coagulase positiva (ECoP).

4.2 Específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica e físico-química de amostras de água do local de captura de peixes.
- Determinar indicadores higiênico-sanitários em peixes de área quilombola do município de Anajatuba-MA, por enumeração de bolores e leveduras, micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis, estafilococos coagulase positiva (ECoP), quantificação de coliformes totais e termotolerantes e pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.
- Determinar as variáveis biométricas (comprimento total e padrão e peso total) dos peixes capturados.
- Realizar isolamento e identificação bioquímica de *E. coli* dos peixes capturados.

- Pesquisar por biologia molecular os genes *Stx1*, *Stx2*, *eae*, *bfpA*, *elt* e *est* que codificam fatores de virulência característicos dos patótipos diarreiogênicos de *E. coli* dentre os isolados bacterianos nos peixes capturados.
- Avaliar a capacidade de produção da enzima coagulase pelos isolados de ECoP nos peixes capturados.
- Pesquisar por biologia molecular os genes enterotoxigênicos *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* femA em isolados de ECoP nos peixes capturados.
- Contribuir para a formação de um banco de dados que poderá ser utilizado posteriormente ou complementado por outras pesquisas para avaliar a qualidade microbiológica nos peixes capturados.

5. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

5.1 Panorama da Pesca no Mundo e no Brasil

De todas as modalidades de produção de pescado (pesca marinha e continental, aquicultura marinha e continental), a pesca marinha é a que possui maior produção mundial (84,4 milhões de toneladas), seguida da aquicultura continental e marinha (ambas totalizam 82,1 milhões de toneladas de pescado) e por último, a pesca continental (12 milhões de toneladas) (FAO, 2020).

No Brasil, o comportamento da produção de pescado é semelhante ao observado mundialmente, com a estagnação das capturas e crescimento da aquicultura a partir da década de 2000 (XIMENES, 2021). Ao considerar apenas os dados de 2010 a 2018 da Organização da Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, que correspondem a dados recentes, a aquicultura cresceu 4,94% ao ano (a.a), enquanto a pesca se retraiu em -1,18% a.a.

Apesar do enorme potencial⁴, o Brasil ainda contribui pouco para a produção mundial de pescado, a pesca marinha está estagnada e a pesca continental é artesanal e de baixo

⁴**Potencial do Brasil para a aquicultura e pesca:** vasta extensão de Zona Econômica Exclusiva (ZEE) e de costa marítima com 8.500 km de extensão; 12% da água doce disponível do planeta; grande volume d'água represado em reservatórios e de água subterrânea; condições climáticas favoráveis; disponibilidade de mão de obra; características de ambiente propícias à produção intensiva em mar aberto ou na região costeira (maricultura); localização estratégica para escoamento da produção para o Cone Sul, Europa e EUA, e grande mercado doméstico de diferentes classes econômicas (VIDAL; XIMENES, 2019).

rendimento, voltada para a subsistência das famílias, e concentrada em rios perenes, barragens etc. (FAO, 2020).

Quanto ao consumo de pescado, esse aumentou a uma taxa de 3,1% ao ano desde 1961 até 2017 e pode estar relacionado a fatores que perpassam pelo aumento da produção, incluindo desenvolvimentos tecnológicos no processamento e armazenamento; remessas de distribuição mais sofisticadas; elevação da renda que se relaciona com o aumento da demanda por produtos pesqueiros, redução dos desperdícios e da mudança na consciência dos consumidores pelos benefícios para a saúde, provenientes do consumo da carne de peixe (BONFA NETO, 2020; FAO, 2020).

Estima-se que mundialmente o consumo de pescado represente aproximadamente 17% da ingestão de proteína animal pela população, sendo que 87% da produção total de peixes é direcionada para o consumo humano. Dos 13% restantes, 80% são destinados para produzir farinha e/ou óleo de peixe, e os 20% restantes tratam-se de peixes ornamentais, iscas, ração para animais, produtos farmacêuticos etc. Mundialmente, os peixes fornecem mais de 20% da proteína animal consumida *per capita* para mais de 3,3 bilhões de pessoas (BONFA NETO, 2020; FAO, 2020).

Entre os principais benefícios do consumo de pescado tem-se, redução da desnutrição e subnutrição, diminuição do consumo desregulado de calorias, supressão na deficiência de vitaminas e minerais, também auxiliando na saúde mental e na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) (BONFA NETO, 2020).

Segundo estimativas da Organização das Nações Unidas (ONU, 2020), a população mundial chegará a 9,7 bilhões de pessoas no ano de 2050, o que representa dois bilhões a mais que a população de 2020. Alimentar este contingente populacional representará um desafio em um cenário de transformações climáticas, imprecisão econômica e financeira e crescente a competição por recursos naturais (FARIAS; FARIAS, 2018).

Frente ao cenário acima mencionado, as pescarias são fundamentais para a segurança alimentar e nutricional⁵ global, principalmente para as comunidades pesqueiras rurais e mais pobres em que a pesca é a principal fonte de subsistência e geração de emprego e renda (BONFA NETO, 2020).

⁵**Segurança alimentar e nutricional:** direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras da saúde que respeitem a diversidade cultural e que sejam ambiental, cultural, econômica e socialmente sustentáveis (BRASIL, 2006).

Mas, é importante mencionar que não basta apenas aumentar a produtividade no campo, a sustentabilidade das atividades é crucial para atendimento da necessidade futura por alimento, e esta conjuntura requer organização e investimentos. Não obstante, a pandemia do novo coronavírus (Sars-Cov-2) intensificou a exigência do consumidor por produtos mais saudáveis e nutritivos para fortalecimento do organismo, assim, as proteínas de origem animal se destacam, sendo o peixe uma opção de alto valor nutricional. Entretanto, as práticas predatórias de pesca vêm continuamente reduzindo os estoques naturais, o que levou ao crescimento linear da produção aquícola no mundo (XIMENES, 2021).

5.2 Atividade Pesqueira no Estado do Maranhão

O estado do Maranhão é o segundo maior da federação brasileira em extensão litorânea com 640 km de linha de costa, sendo considerado tradicionalmente o principal produtor de pescado na região Nordeste o que lhe confere importante representatividade no cenário nacional (ISAAC *et al.*, 2006).

Em termos de dados produtivos aquícolas, o Maranhão é o quarto maior produtor de peixes nativos do Brasil, com produção de 23.850 toneladas, segundo relatório da Associação Brasileira de Piscicultura do ano de 2018. Estratégias bem construídas e medidas de apoio à atividade convergiram para a consolidação do Estado como um dos principais produtores de peixes cultivados da região Nordeste (MARANHÃO, 2019).

Quatro polos destacam-se na produção de peixes cultivados no Maranhão: Baixada Ocidental, Baixada Oriental, Região Sul (ou Gerais de Balsas) e Região Tocantina. E, os municípios de Matinha, Arari, Vitória do Mearim, Pindaré-Mirim, Igarapé do Meio, Santa Rita, Estreito, Balsas, Imperatriz e Grajaú estão entre os maiores produtores de peixes em cativeiro do estado. As principais espécies cultivadas são *Colossoma macropomum* (tambaqui); *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus* (tambatinga); *Prochilodus* sp. (curimatá); *Leporinus* sp. (piauí); e, *Myloplus asterias* (pacu), todos peixes nativos, além da *Oreochromis niloticus* (tilápia). Esta última representa 51,7% da produção nacional (MARANHÃO, 2019).

Porém, a maior parte da produção de peixes no estado do Maranhão é proveniente da pesca artesanal, realizada por métodos e apetrechos simples, adaptados à realidade socioeconômica local e responsável pelo fornecimento de alimento e geração de emprego para milhares de famílias maranhenses, com incremento da economia regional (PEREIRA *et al.*, 2018). Ademais, constata-se uma estreita relação dessa atividade com o modo de vida das

comunidades pesqueiras, não apenas, por se tratar da principal fonte de recursos alimentares para muitas famílias (ABDALLAH; BACHA, 1999), mas, por ser um modo de vida tradicional, transmitido de geração a geração.

A atividade pesqueira no Maranhão é claramente mais destacada na Zona Costeira, onde se sobressaem, por exemplo, os municípios de Raposa, Humberto de Campos e Primeira Cruz (MONTELES *et al.*, 2010). Apesar da importância, o setor de pesca no Maranhão é muito disperso e desorganizado, envolvendo desde comunidades isoladas em ilhas, sem qualquer assistência social, até os pescadores que vivem na capital. A maioria dos pescadores não participa de nenhuma associação de classe, pescam no sistema de partilha e em sua maioria almeja adquirir seu próprio equipamento de pesca. Portanto, ao se pensar na adoção de medidas de manejo, não é suficiente considerar unicamente as características biológicas e ecológicas dos recursos pesqueiros, é importante considerar também os atores sociais envolvidos na exploração dos mesmos (ALMEIDA, 2008).

Devido à dimensão continental do Maranhão, a exploração pesqueira artesanal possui muitas particularidades que, por sua vez, são influenciadas por fatores similares aos citados por Silva (2014) para o restante Brasil, são eles: (i) ocorrência endêmica de vários recursos pesqueiros explorados de valor comercial; (ii) heterogeneidade e influência de grandes bacias hidrográficas, abrangendo muito afluentes; e, (v) diferenças culturais. Essas características, aliadas aos desafios enfrentados pelo setor, contribuíram de forma significativa para o atual estado de crise pesqueira que não é exclusiva desse Estado.

Alguns fatores responsáveis pela crise também foram pontuados por Silva (2014), como: (i) crescimento desordenado da atividade ao longo da história, (ii) falta de planejamento do setor, (iii) uso de métodos inadequados de captura, sendo muitas vezes predatórios, (iv) desconhecimento do potencial produtivo e das características biológicas básicas de muitos recursos pesqueiros, (v) poluição costeira por ação antrópica; (vi) setor produtivo com baixo nível de conscientização dos limites naturais de exploração sustentável; e, (vii) política pesqueira e incentivos econômicos centralizados na pesca industrial.

As pesquisas são claras quando se reportam aos impactos negativos à pesca no Brasil e que são extensivos ao estado do Maranhão. Referente a pesca artesanal continental, o cenário de degradação generalizada dos ecossistemas por ação antrópica, contribuiu significativamente para profundas modificações nos estoques e, conseqüentemente, da atividade pesqueira em que cita-se: (i) erosão dos solos, assoreamento e alteração dos rios (BORGES *et al.*, 1997; RESENDE, 2005); (ii) barramento dos rios pela construção de hidrelétricas (CALHEIROS; OLIVEIRA, 2010); (iii) desenvolvimento urbano com aumento da descarga de dejetos e

efluentes domésticos e industriais e remoção de matas ciliares (MATEUS; VAZ; CATELLA, 2011; SANTOS; SANTOS, 2005); (iv) contaminações dos principais rios por herbicidas e inseticidas (MIRANDA *et al.*, 2008); (v) introdução de espécies exóticas de peixes e moluscos (FERRAZ DE LIMA, 1993; CALHEIROS; OLIVEIRA, 2010); e, (vi) mineração, transformação da paisagem e contaminação ambiental por metais pesados (AZEVEDO; AGUIAR; COVEZZI, 1998). Para a pesca artesanal marinha, os desafios são semelhantes (SILVA, 2014).

Portanto, a sustentabilidade da pesca artesanal no Maranhão é uma necessidade urgente e os desafios de acordo com Almeida (2008) e Silva (2014) exigem uma ação multidisciplinar, interinstitucional e integrada no sentido de proporcionar uma abordagem ecossistêmica e agir conforme as peculiaridades e necessidades da pesca no estado.

A Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (UN, 2015) traz em seu Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 14, a conservação e o uso sustentável dos ecossistemas marinhos, incluindo as atividades humanas envolvidas, como por exemplo a pesca artesanal, o que demonstra a importância social, econômica e ambiental desses ecossistemas.

Durante a 72ª Sessão da Assembleia Geral da ONU foi proclamado que 2022 foi o ano internacional da pesca artesanal e aquicultura, com o intuito de conscientizar os países a respeito da contribuição de ambas as atividades de pequena escala para o cumprimento do ODS 14, e com isso desenvolver um diálogo e colaboração entre os diversos setores envolvidos, fortalecendo o associativismo, sua capacidade de melhorar a sustentabilidade na atividade, o desenvolvimento social e o bem-estar (UN, 2021).

Para o fortalecimento do cooperativismo na utilização do bem comum, conforme citado por Ostrom (1990), e alcançar a metas do ODS 14, pesquisadores como Maldonado e Santos (2006) e Campos *et al.* (2018) apresentam que a economia solidária entre pescadores artesanais tem o potencial de funcionar como importante ferramenta de inclusão social e econômica desses sujeitos e de seus familiares, influenciando nos aspectos econômicos, organização social, política, técnica e gerencial.

5.3 Campos Inundáveis

Os campos inundáveis são faixas fluviais com baixa declividade, que sazonalmente são alagadas por cheias, a depender da magnitude e frequência. A alternância entre inundações e

imersão é o aspecto fundamental que controla a erosão e a deposição nas planícies definindo comunidades bióticas, processos biológicos e ambientes característicos em ecossistemas fluviais. Durante a estação seca, as áreas inundadas se tornam isoladas a partir do canal principal do rio, formando inúmeros lagos e lagoas marginais (CHRISTOFOLETTI, 1981).

Esses ambientes caracterizam-se pelas inundações periódicas, que ocorrem normalmente nos meses de fevereiro a julho, como consequência das elevadas precipitações e pelo transbordamento de importantes sistemas lacustres permanentes, com lâmina d'água de aproximadamente 50 cm, durante as fortes chuvas (MOCHEL; CASTRO, 2003). O ciclo das águas proporciona o desenvolvimento de um ecossistema típico e único na Baixada Maranhense cuja produtividade biológica atinge altos níveis (NOGUEIRA, 2003).

As áreas alagadas são considerados importantes ecossistemas que servem de berçário, proteção e abrigo para peixes, além de, constituírem áreas de crescimento e recuperação de peixes adultos (VAZZOLER *et al.*, 1997).

Nos períodos de estiagem (agosto a janeiro), desenvolve-se grande produção de gramíneas e ciperáceas, de porte herbáceo (capim de marreca, capim andráquice, canarana, aturiá, guarimã, junco, dentre outras), propícias ao pastoreio bovinos e bubalinos (BERNARDI, 2005)

5.4 Comunidades Remanescentes de Quilombos

O Maranhão é o estado do Nordeste que concentra o maior número de comunidades quilombolas e comunidades remanescentes de quilombos reconhecidos pela Fundação Cultural Palmares, com 734 comunidades (SEIR, 2018).

No município de Anajatuba - MA, estima-se que existam aproximadamente 21 comunidades remanescentes de quilombos que herdaram seus traços culturais, materiais, sociais e religiosos e que permanecem vivos até hoje, são elas: São João da Mata, Monge Belo, Pedrinhas, Queluz, Cupaúba, Ponta Bonita, Carro Quebrado, Cumbi, Côco, Assutinga, Centro do Isidório, Bacabal, São Pedro, Flecheira, São Roque, Quebra, Bom Jardim, São José do Sipaú, Ilhas do Teso, Bairro São Benedito e Ponta Bonita (PAIVA, 2018).

Essas comunidades negras rurais maranhenses viveram e vivem ao longo dos tempos, marcando a sua trajetória, como forma de preservar os costumes e tradições. Elas recorrem à memória e à oralidade, utilizando-as como metodologia de ensino com os seus descendentes, tendo o seu território como um lugar onde estabelecem os vínculos culturais da história

(SANTOS *et al.*, 2020), com ensinamentos empíricos correlacionados ao modo de plantar, sobre elaboração de artes de pesca, técnicas de captura e conhecimento sobre a biologia das espécies (COSTA, 2006; ARRUDA *et al.*, 2018).

A pesca artesanal dentro das comunidades tem dependência direta com os recursos naturais para a sua existência. Desse modo, os ambientes naturais representam o meio que viabiliza a sobrevivência social, econômica e cultural das comunidades tradicionais pesqueiras (DIEGUES, 1999; RAMALHO, 2019)

5.5 Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHAs)

As doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHAs) são uma ameaça constante à saúde pública, além de gerar implicações negativas significativas a área da produtividade, comércio, serviços de saúde e ao monitoramento da segurança alimentar em todo o mundo. Surtos de DTHAs são comuns sendo responsáveis por considerável morbidade e mortalidade (DRAEGER *et al.*, 2018).

De acordo com os dados epidemiológicos disponibilizados por órgãos de controle sanitário sobre a carga global de DTHAs, 600 milhões de pessoas adoecem e 420.000 morrem pela ingestão de alimentos contaminados, uma em cada 10 pessoas são afetadas, especialmente crianças (WHO *et al.*, 2020).

A emergência das DTHAs está fortemente associada a diferentes fatores, como: (i) existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; (ii) urbanização desordenada; (iii) produção de alimentos em larga escala; (iv) deficiências no controle da qualidade dos alimentos; (v) maior contato da população com “*fast-foods*”; (vi) consumo de alimentos em vias públicas; (vii) aumento no uso de aditivos alimentares; e, (viii) mudanças ambientais, globalização e a facilidade de deslocamento da população (BRASIL, 2010).

Apesar das redes internacionais, como a Rede Internacional de Autoridades de Segurança Alimentar da FAO/OMS (INFOSAN) fornecerem uma plataforma para o compartilhamento de informações sobre surtos de DTHAs em todo o mundo, há disparidades entre países desenvolvidos e em desenvolvimento em termos desses requisitos, tornando desafiadora a implementação global de tecnologias emergentes para vigilância de surtos.

No Brasil essa situação não é diferente, mesmo com a criação do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (VE-DTHA),

implantado com a finalidade de reduzir a incidência⁶ e subsidiar medidas de prevenção e controle para as DTHAs (MALACRIDA; DIAS; LIMA 2017) o desempenho dos Estados brasileiros ainda é heterogêneo, há uma clara subnotificação dos eventos dessas doenças sendo que há estados em que nunca notificaram surtos alimentares (FÁULA; SOARES; DIAS, 2015).

A VE-DTHA é composta pela vigilância específica de algumas doenças de notificação compulsória, como é o caso do botulismo, cólera, febre tifoide e toxoplasmose gestacional e congênita e, também por doenças de notificação em unidades sentinelas como doenças diarreicas agudas, rotavírus, SHU (síndrome hemolítico-urêmica), e outras doenças atreladas a contaminação bacteriana, viral, além da notificação compulsória de surtos químicos, zoonóticos dentre outros de qualquer DTHAs (BRASIL, 2018).

Em uma análise mais recente sobre dados oficiais nacionais, segundo série histórica da Secretária de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da saúde, no período de 2007 a 2019, no Brasil, foram notificados 9.030 surtos de DTAs, 160.702 doentes e 146 óbitos. Cabe destacar que dos 9.030 surtos notificados, apenas 3.275 (36,27%) tiveram a identificação de agente etiológico, sendo os cinco mais encontrados, *Salmonella spp.* (24,8%), *Escherichia coli* (23,5%), *Staphylococcus spp.* (17,9%), *Bacillus cereus* (9,9%) e *Clostridium spp.* (7,63%) (BRASIL, 2018).

Cabe ressaltar que os dados referentes aos surtos alimentares podem ser usados para identificar questões emergentes de segurança alimentar e para avaliação de programas afim de prevenir doenças de determinados alimentos.

Diante do exposto esses dados se tornam preocupantes, sobretudo para grupos e subgrupos sociais específicos que ocupam ambientes em condições sanitárias inapropriadas e que muitas vezes estão desassistidas pelo poder público, ocasionalmente, concentrados em populações de pluralidade étnica, sustentados pela falta de serviços públicos, a exemplo dos quilombolas.

5.6 Pescado e as Doenças de Origem Alimentar

O pescado destaca-se nutricionalmente por conter grandes quantidades de vitaminas lipossolúveis (A e D), minerais (cálcio, fósforo, ferro, cobre, selênio), elevada proporção de

⁶**Incidência:** frequência de casos novos de uma determinada doença, ou problema de saúde, oriundos de uma população sob risco de adoecimento, ao longo de um determinado período de tempo.

ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (mais de 40%) e aminoácidos essenciais (SARTORI; AMANCIO, 2012).

O valor nutricional do pescado e a publicação de estudos que o associam como um alimento funcional, nos últimos anos, gerou aumento do interesse por esse produto de origem animal (POA). Dentre os possíveis benefícios da ingestão de uma ou duas porções de peixe por semana de origem marinha, que contêm cerca de 2 gramas de ácidos graxos polinsaturados ômega-3, estão a redução do risco de acidente vascular cerebral (AVC), depressão, mal de alzheimer e de morte por doença cardíaca (HARVARD, 2012).

A série histórica da SVS do MS mostra que peixes, frutos do mar e processados a base de pescado foram responsáveis por 0,8% dos surtos, apesar, de 66,8% se configurarem como alimentos de origem não identificados e 9% alimentos de natureza mista (BRASIL, 2018). Para Assis (2014), de forma geral, as DTHAs estão frequentemente associadas à deficiência no manejo produtivo como a adoção de boas práticas agropecuárias⁷ e no processamento dos alimentos com a implementação de boas práticas de fabricação (BPF)⁸.

As DTHAs veiculadas pelo pescado podem ser causadas por agentes biológicos (bactérias, vírus e parasitas), químicos e físicos (SANTOS, 2010), sendo que os primeiros agentes lideram a casuística das doenças de origem alimentar (VAN AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006).

As bactérias causadoras de DTHAs veiculadas por pescado, integram dois grupos: (i) bactérias associadas ao ambiente aquático, como os vîbrios (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*), *Listeria*, *Clostridium botulinum* entre outros; e, (ii) bactérias indicadoras de contaminação higiênico-sanitária como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, entre outros. Quanto aos vírus, os principais são o da hepatite tipo A (VHA) e o de Norwalk ou norovírus. Já os helmintos pertencentes às famílias Opisthorchiidae, Heterophyidae, Paragonimidae (trematódeos), Anisakidae, Gnathostomidae e Diphylobothridae (cestóides) são os principais agentes parasitários patogênicos para o homem pelo consumo de pescado (HUSS; ABABOUC; GRAM, 2003).

⁷**Boas práticas agropecuárias:** práticas que devem ser desenvolvidas respeitando o meio ambiente, com vistas a melhorarem as condições de trabalho e produtividade, levando em consideração os cuidados com a higiene e a sanidade.

⁸**Boas práticas de fabricação (BPF):** ferramenta da qualidade para o alcance de níveis adequados de segurança dos alimentos (inocuidade). A adoção das BPF é um requisito da legislação brasileira e integra os programas de garantia da qualidade do produto final.

A investigação de bactérias isoladas de alimentos contaminados, o local onde estes alimentos foram produzidos e as pessoas que foram expostas ao patógeno só é possível quando há uma rede de diagnóstico e de vigilância epidemiológica ativa e bem estruturada em um país. Quando isso ocorre, os agentes de saúde pública podem de forma efetiva identificar a fonte, alertar o público, iniciar procedimentos de *recall* e identificar as brechas no sistema de segurança alimentar que de outra forma não seriam reconhecidas (CDC, 2018).

5.7 Legislação Brasileira Referentes aos Padrões Microbiológicos para Peixes Fresco

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 331 de 23 de dezembro de 2019 da ANVISA, dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Essa RDC abrange todos os setores envolvidos nas etapas de produção, industrialização, armazenamento, fracionamento, transporte, distribuição, importação e comercialização dos alimentos (BRASIL, 2019a). Para complementar o disposto na RDC 331/2019, também foi publicada a Instrução Normativa (IN) 60 de 23 de dezembro de 2019, que define a lista de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor (BRASIL, 2019b).

Dos requisitos gerais dispostos na RDC 331/2019 tem-se “os alimentos não podem conter micro-organismos patogênicos, toxinas ou metabólitos em quantidades que causem danos à saúde” (BRASIL, 2019a). Os indicadores e critérios estabelecidos na IN 60/2019 quando comparada a RDC n°. 12/2001 (legislação que anteriormente disciplinava os padrões microbiológicos de alimentos) são mais rígida e apresentam algumas importantes mudanças para pescado, como: (i) pesquisa de histamina para peixes⁹, crustáceos, moluscos e miúdos (ovas, moela, bexiga natatória) crus, temperados ou não, frescos, resfriados ou congelados; e, (ii) pesquisa de *Escherichia coli*.

Quanto aos estafilococos coagulase positiva (ECop) e *Salmonella*, pela importância para a saúde pública, estes são parâmetros presentes em ambas as legislações. Assim, com padrões microbiológicos mais rígidos, o controle e garantia de qualidade, deve ser mais imperativo para garantir os critérios estabelecidos.

⁹ **Peixes produtores de histamina:** peixes da família Carangidae, Gempylidae, Istiophoridae, Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae, Scombrosidae (BRASIL, 2019b).

5.8 Agentes Etiológicos

5.8.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria que integra a microbiota intestinal dos seres humanos e animais de sangue quente, sendo, constantemente, eliminada no ambiente, contaminando o solo, água e alimentos (SILVA *et al.*, 2010). O significado da sua presença nos alimentos deve ser avaliado sob dois ângulos: (i) indica contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, condições sanitárias insatisfatórias; e, (ii) diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas aos seres humanos e animais. Assim, a pesquisa dessa bactéria auxilia na detecção do real risco de uma toxinfecção alimentar por meio da água e dos alimentos destinados ao consumo (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Pertencente à família Enterobacteriaceae, a *E. coli* constitui uma das espécies bacterianas mais pesquisada mundialmente, devido à sua importância para a saúde pública e à sua recorrência em doenças entéricas e extra intestinais (trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central). A gravidade da *E. coli* patogênica justifica a existência de programas de vigilância internacionais e nacionais que monitoram e rastreiam surtos ocasionados por esse micro-organismo. Embora nem todas as estirpes de *E. coli* apresentem o mesmo perfil epidemiológico, todas têm um enorme potencial para causar doenças e, portanto, configuram desafios prementes à saúde pública (CROXEN *et al.*, 2013).

Apenas uma pequena parte das estirpes de *E. coli* apresenta patogenicidade e causa enfermidades, sendo seis os patótipos de *E. coli* diarreiogênica (grupos que apresentam diferentes mecanismos de virulência) (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000). Estes diferem entre si em relação aos locais preferenciais de colonização no hospedeiro, mecanismos de virulência, aspectos clínicos e epidemiológicos e são classificados em: *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (NATARO; KAPER, 1998; LIENEMANN *et al.*, 2011; CROXEN *et al.*, 2013) e a *E. coli* difusante aderente (DAEC) (CROXEN *et al.*, 2013).

5.8.1.1 *Escherichia coli* comensal

Dentre as relações que a *E. coli* pode estabelecer com seu hospedeiro, tem-se o comensalismo. Nessa relação, a *E. coli* não causa dano ou benefício ao seu hospedeiro, entretanto recebe dele nutrientes, ambiente estável, proteção contra estresse, transporte e disseminação (CONWAY; KROGFELT; COHEN, 2004). A *E. coli* é um organismo que apresenta grande plasticidade, o que lhe confere importância para o estudo das estreitas relações entre a bactéria e seu hospedeiro e o entendimento das flutuações entre comensalismo, mutualismo e patogenicidade (PINHEIRO *et al.*, 2007). As pressões seletivas que o ambiente pode exercer sobre as linhagens comensais, podem propiciar o aparecimento de virulência e fatores de resistência. Dessa forma as linhagens comensais de *E. coli* são vistas como um reservatório de linhagens virulentas e resistentes (FALKOW, 1996).

Infecções intestinais ou extraintestinais são causadas por linhagens de *E. coli* que abrigam fatores de virulência nos plasmídeos, bacteriófagos ou cromossomo bacteriano (MUHLDOERFER; HACKER, 1994). As linhagens patogênicas de *E. coli* podem ser derivadas de linhagens comensais, que sofreram aquisição cromossomal ou extracromossomal tornando-se patogênicas (FINLAY; FALKOW, 1997; OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000).

5.8.1.2 *Escherichia coli* diarreio gênica

E. coli diarreio gênica é considerada um dos principais patógenos causadores de diarreia no mundo. Dados obtidos em um amplo estudo pelo *Global Enteric Multi-Center Study* (GEMS), realizado na África e Ásia, citados por Croxen *et al.* (2013) apontam que ETEC e *Shigella* estão entre as quatro principais causas de diarreia moderada a grave naquelas regiões. Segundo Blanco *et al.* (2004), aproximadamente 630 milhões de casos de diarreia no mundo e, aproximadamente, 775.000 mortes por ano, são ocasionados por *E. coli* diarreio gênica. Scallan *et al.* (2011) constataram em seu estudo que, nos EUA, entre os anos de 2000 à 2008, *E. coli* diarreio gênica acometeu aproximadamente 191.000 pessoas por ano, sendo considerada o sexto agente mais isolado em surtos de DTA.

5.8.1.2.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

E. coli enteropatogênica (EPEC) foi a primeira associada à doença diarreica e permanece como causa importante da doença em recém-nascidos, sobretudo em países em desenvolvimento. A doença não é comum em crianças mais velhas e em adultos, provavelmente associada à sua imunidade protetora. A prevalência de EPEC está relacionada a diferenças na população em estudo como a faixa etária e a critérios e métodos utilizados no diagnóstico (ANGELES, 2002).

As EPECs produzem fimbrias formadoras de feixes (Bfp), intimina e uma proteína translocada denominada Tir (receptor). Estes fatores de virulência permitem a ligação da bactéria às células epiteliais do intestino delgado, levando a destruição das microvilosidades, que desencadeia a má absorção resultando em quadros de diarreia aquosa (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; VIDAL *et al.*, 2005; RASKO *et al.*, 2008).

Muitas linhagens de EPEC apresentam capacidade de aderência nas células do epitélio intestinal, formando micro colônias compactadas que podem ser visualizadas depois da bactéria ter entrado em contato com a célula, este fenômeno está associado com a presença do fator de aderência (EAF). O plasmídeo EAF também carrega os genes *bfpA* que codificam para fimbrias formadoras de feixes (BFP), promovendo a estabilização das bactérias ao epitélio intestinal (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; VIDAL *et al.*, 2005; RASKO *et al.*, 2008). O plasmídeo EAF não é essencial para lesão A/E. De acordo com a presença ou ausência do plasmídeo EAF e conseqüentemente expressão do gene *bfpA*, as linhagens de EPEC podem ser caracterizadas como típicas ou atípicas, respectivamente (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

5.8.1.2.2 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

A doença causada por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é mais comum em países em desenvolvimento (aproximadamente 650 milhões de casos por ano). São observadas infecções em crianças pequenas em países em desenvolvimento ou em pessoas que viajam para estas áreas. O inóculo microbiano necessário para o desenvolvimento da doença é alto, portanto, as infecções são adquiridas por meio do consumo de alimentos e água contaminados, não ocorrendo disseminação pessoa-pessoa (VIDAL *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 2009).

A aderência da ETEC às células do intestino é mediada por proteínas e fatores de colonização espécie-específicos, que se ligam aos receptores na membrana plasmática das células do intestino delgado, induzindo a perda de água e eletrólitos através da atividade de enterotoxinas. Estes micro-organismos produzem duas classes de enterotoxinas, termolábeis (LT-I e LT-II) que são codificadas pelo operon *elt* e termoestáveis (ST-A e ST-B) codificadas por genes localizados no operon *est* (NATARO *et al.*, 1998; NAGY; FEKETE, 2005).

A diarreia secretória causada por ETEC se desenvolve após um período de incubação de um a dois dias e persiste por três a quatro dias em média. Os sintomas são semelhantes aos da cólera, porém mais leves (CHENG *et al.*, 2006). Não são observadas alterações histológicas e nem inflamação da mucosa intestinal. Não é possível distinguir se a doença é causada pela toxina termolábil ou termoestável (ARANDA; FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2004;).

5.8.1.2.3 *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

As linhagens de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) representam um grupo de *E. coli* diarreiogênica caracterizado pela expressão de *Stx*, que codifica para *stx1* e *stx2*, englobam uma variedade de micro-organismos que inicialmente eram destacados pela produção de toxina Shiga. Mais recentemente, outros marcadores de virulência têm sido associados a estas bactérias (OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Dependendo do seu padrão de virulência, foi sugerido um subgrupo destes micro-organismos também chamado de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que são conhecidas pela frequente associação com formas mais graves de manifestações clínicas (ARANDA; FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2004). As linhagens de EHEC são caracterizadas pela expressão do gene *eae* que caracteriza a lesão A/E e pela presença do gene *stx* (NATARO *et al.*, 1998; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

A STEC representa um importante patógeno emergente que pode ser transmitido por alimentos, principalmente por carne bovina. Animais domésticos, bovinos e outros mamíferos têm sido reportados como reservatórios naturais de STEC em todo mundo (CONEDERA *et al.*, 2004). Estudo desenvolvido em Minas Gerais, com amostras fecais de búfalos, demonstrou alta prevalência de STEC nas fezes destes animais (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O quadro infeccioso causado por STEC envolve diarreia não sanguinolenta com dor abdominal podendo apresentar vômito. Algumas pessoas, entretanto, apresentam sintomas que podem evoluir para diarreia sanguinolenta com dor abdominal intensa. A regressão dos sintomas ocorre tipicamente após quatro a dez dias, porém, a síndrome hemolítico-urêmica é

uma complicação particularmente em crianças pequenas e está associada à produção da toxina stx-2 (VIDAL *et al.*, 2005). Essa síndrome (transtorno caracterizado por insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática) é uma complicação que pode ocorrer em 5 a 10% de crianças infectadas com menos de dez anos de idade. A doença é adquirida por meio do consumo de alimentos (principalmente carnes mal-passadas, leite ou sucos não pasteurizados, vegetais e frutas) e água contaminados (SONG *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2005; DUMKE *et al.*, 2006).

5.8.1.2.4 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Linhagens de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) são menos comuns. Estas linhagens apresentam similaridades à *Shigella* devido a propriedades fenotípicas e patogênicas que estão associadas a alguns poucos sorotipos. Utilizando genes associados aos plasmídeos (genes pInv), como a sequência de ipaH, as linhagens de EIEC invadem as células do intestino grosso, por endocitose, no interior das células, provocam lise do vacúolo endocítico, multiplicam-se e disseminam-se para outras células adjacentes (NATARO *et al.*, 1998; ARANDA; FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2004; VIDAL *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2007). Um pequeno número de pacientes pode apresentar sintomas clínicos que progridem para a forma disentérica da doença associada à febre, cólicas abdominais e leucócitos nas fezes. Esse processo de destruição de células epiteliais com infiltração inflamatória pode, por sua vez, progredir para ulceração no cólon (SONG *et al.*, 2005).

5.8.1.2.5 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Linhagens de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) têm sido identificadas como patógeno emergente causador de diarreia aquosa persistente em crianças, com desidratação de recém-nascidos em países em desenvolvimento e pessoas que viajam para estas áreas. A persistência destas bactérias está associada à diarreia crônica e atraso no desenvolvimento infantil, e são caracterizadas por aderência agregativa (AA) auto-aglutinação em uma disposição semelhante a pilhas de tijolos (VIDAL *et al.*, 2005; MOHAMED *et al.*, 2007). Este processo é mediado por fímbrias formadoras de feixes (AAF I e AAF II), que são codificadas por genes plasmídeos (aggR).

Estes micro-organismos depois de aderidos à superfície do epitélio estimulam a secreção de muco e agregam-se a um biofilme que recobre o epitélio do intestino delgado (SCHEMBRI; KJAERGARRD; KLEM, 2003; ARANDA; FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2004; MENDEZ-ARACIBIA *et al.*, 2008). Fatores de virulência carregados pelos genes *aggR*, *aap*, *aatA* (genes que transportam a proteína CVD432) são importantes para aderência da bactéria à mucosa intestinal e formação do biofilme. Após adesão ao epitélio intestinal linhagens de EAEC podem secretar enterotoxinas e citotoxina codicadas pelos genes que incluem *pet*, *irp2*, *shf*, além de outros que também estão envolvidos na patogênese de EAEC (MOHAMED *et al.*, 2007).

5.8.1.2.6 *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC)

Apesar de incluída entre as *E. coli* diarreio gênicas, DAEC, ainda é uma categoria bastante controvertida. Essas bactérias são implicadas, em alguns estudos, como agente etiológico de diarreia em crianças (BAQUI *et al.*, 1992; GUION *et al.*, 2008; OPINTAN *et al.*, 2010), enquanto em outros são encontradas em frequências similares em casos de diarreia e controles assintomáticos (SCALETISKY *et al.*, 1999; RAJENDRAN *et al.*, 2010).

Suscetibilidade dependente da idade tem sido proposta como fatores de risco para as infecções por DAEC. Alguns estudos epidemiológicos têm mostrado que DAEC são associadas a casos de diarreia apenas em crianças, com pelo menos seis meses de idade (SCALETISKY *et al.*, 2002; OCHOA *et al.*, 2009). Essas bactérias são também encontradas como agentes de diarreia em adultos (MERAZ *et al.*, 2008).

5.8.1.2.7 Outros patotipos de *Escherichia coli* diarreio gênica

Foi proposta a inclusão de duas novas categorias: AIEC (*E. coli* aderente e invasiva) e STEAEC (*E. coli* enteroagregativa produtora de Shiga toxina). Esta última foi proposta após o surto que teve início na Alemanha em 2011 e se espalhou por diversos países da Europa, além da América do Norte, tendo grande impacto sobre o comércio internacional de alimentos. Esse surto foi atribuído a uma cepa de *E. coli* O104:H4, com características mistas de EAEC e EHEC (CLEMENTS *et al.*, 2012). Outras categorias também têm sido, às vezes, propostas. Entretanto, até o momento não existe consenso sobre novas categorias.

5.8.2 *Salmonella* sp.

Bactérias do gênero *Salmonella* são anaeróbias facultativas, Gram-negativas não formadoras de esporos, sendo em sua maioria móveis (exceto *Salmonella pullorum* e *Salmonella gallinarum*) por meio de flagelos peritríquios. A temperatura ótima de crescimento é 37 °C (POPOFF; LE MINOR, 2005). Fundamentado em estudos moleculares, esse gênero está dividido em duas espécies: *Salmonella* (*S.*) *enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* é subdividida em seis subespécies designadas por números romanos: enterica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV) e indica (VI) (GRIMONT; WEILL, 2007).

O gênero *Salmonella* possui 2.579 diferentes sorotipos (sorovares) identificados pelo esquema de Kauffmann-White, com base na composição bacteriana dos seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsular (Vi). A espécie *S. bongori* (V) é composta por 22 sorotipos e *S. enterica* por 2557 sorotipos (*S. enterica* subespécie I = 1531, *S. enterica* subespécie II = 505, *S. enterica* subespécie IIIa = 99, *S. enterica* subespécie IIIb = 336, *S. enterica* subespécie IV = 73 e *S. enterica* subespécie VI = 13) (GRIMONT; WEILL, 2007).

S. enterica é a causa mais significativa de morbidade e mortalidade no mundo e seus sorovares são um grupo diversificado de patógenos que se adaptaram a uma grande variedade de ambientes e hospedeiros. Embora *Salmonella* seja bem estudada em aves e mamíferos, é possível isolar algumas cepas de animais de sangue ectotérmicos e do ambiente. Os sorotipos pertencentes a *S. enterica* II a VI e *S. bongori* estão associados a animais de sangue frio, enquanto os mais de 1500 sorovares de *S. enterica* subespécie I são frequentemente isolados de animais de sangue quente (mamíferos e aves) (FERNANDES *et al.*, 2018).

A patogenia de *Salmonella* em peixes é desconhecida (FERNANDES *et al.*, 2018), podendo permanecer no trato intestinal destes animais de forma transitória (SANTOS, 2015). Diversas são as formas de contaminação do pescado por *Salmonella* (AMAGLIANI; BRANDI; SCHIAVANO, 2012), entretanto não há relatos que esclareçam sua função como agente etiológico ou como pertencente à microbiota em peixes (SANTOS, 2015). A ocorrência deste patógeno em peixes está comumente relacionada à sua criação, bem como ao ambiente de sua industrialização, devido a práticas de higiene ineficientes, equipamentos e manuseio inadequado de alimentos (FERNANDES *et al.*, 2018).

Segundo Fernandes *et al.* (2018), a maioria dos casos de salmonelose em humanos relacionados ao consumo de peixes é causada pelos sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*

e a prevalência de *Salmonella* em peixes de água doce varia entre 3,4 a 64%, dependendo da qualidade da água e das boas práticas de produção.

No Brasil, poucos são os registros de pesquisa sobre *Salmonella* em sistemas de criação de peixes. Linder (2002) estudou a microbiota do conteúdo intestinal de 221 peixes de água doce dos sistemas extensivos e intensivos. Foram isoladas diferentes enterobactérias, entre elas *S. Typhimurium* em 2,28% dos peixes criados no sistema extensivo e em 2,11% do sistema intensivo, demonstrando que a contaminação de ambientes aquáticos por bactérias deste gênero pode ocorrer através de diferentes origens como ração, água de cultivo, alevinos, manejo inadequado, uso excessivo de antimicrobianos, como consorcio com animais de interesse pecuário e pássaros entre outros fatores.

5.8.3 Gênero *Staphylococcus*

Os *Staphylococcus* são bactérias ubíquas no ambiente e podem ser encontradas em seres humanos e animais, no ar, poeira, esgoto, água e superfícies ambientais (HENNEKINNE *et al.*, 2010). Pertencem à família Micrococcacea, são pequenos cocos gram-positivos que podem se apresentar isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados (com aspecto semelhante a cacho de uvas), possuem diâmetro que varia de 0,5 a 1,5 μm , são desprovidos de flagelos, não esporulados e normalmente não encapsulados. Formam colônias geralmente grandes (1 a 2 mm de diâmetro), com pigmentos que variam do branco a vários tons de amarelo textura cremosa, dependendo da espécie (CORDEIRO, 2011). São anaeróbios facultativos e produzem diferentes enzimas e hemolisinas, como a catalase (MARTINS, 2012), hemolisinas (α , β , γ e δ), nucleases, proteases, lipases, hialuronidases, colagenases, fibrolisina, coagulase e β -lactamase (NOVICK; SCHLIEVERT; RUZIN, 2001).

Com base no potencial para a produção de coagulase já foram descritas 50 espécies e subespécies de *Staphylococcus*, que são categorizados em estirpes produtoras de coagulase, designados como estafilococos coagulase positiva (ECoP), e estirpes não produtoras de coagulase, denominadas estafilococos coagulase negativa (ECoN) (HENNEKINNE *et al.*, 2010).

A atividade da coagulase é considerada um fator de virulência, já que o coágulo formado por ação dessa enzima consiste em um acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas que isola a área infectada, dificultando o acesso das células do sistema imunológico do hospedeiro às bactérias (MARTINS, 2012). Estirpes ECoP são claramente implicadas em casos de

intoxicação alimentar¹⁰, embora já tenham sido descritos alguns surtos de intoxicação estafilocócica atribuídos a espécies coagulase negativa (BORGES *et al.*, 2008a).

Entre as espécies pertencentes ao grupo ECoP¹¹, *Staphylococcus aureus* é o principal causador de casos de intoxicação alimentar estafilocócica. Durante o processamento e armazenamento de alimentos, temperaturas fora da zona crítica (7 à 48 °C) previnem a multiplicação de *S. aureus*. Uma característica importante dessas bactérias é a tolerância ao cloreto de sódio (NaCl) com boa capacidade de multiplicação em concentrações de até 10%. O crescimento é possível, embora retardado, mesmo em concentrações de até 20% de NaCl (HENNEKINNE *et al.*, 2010).

5.8.3.1 Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*

A capacidade de colonização e patogenicidade do *S. aureus* são consequência dos diferentes fatores de virulência produzidos, os quais têm papel relevante na adesão celular, captação de nutrientes e na evasão da resposta imunológica do hospedeiro (FERREIRA, 2014).

De acordo com Velázquez (2005), os fatores de virulência podem ser classificados em três categorias: (i) fatores relacionados com a aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, como a produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colagênio ou a enzima coagulase; (ii) fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como diversas enterotoxinas estafilocócicas (SEs A-E, G-J, K, L, M, O e P), a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), a proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares; e, (iii) fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de cateteres e próteses que incluem as hemolisinas α , β , δ e γ - toxinas de natureza proteica.

O *S. aureus* contém ainda, na estrutura da sua parede celular, possuem polissacarídeos e proteínas antigênicas, bem como outras moléculas importantes (ácido teicóico, glicanopeptídeo, proteína A e adesinas), as quais podem induzir resposta imunológica no hospedeiro (SANTOS *et al.*, 2007).

¹⁰ **Intoxicação alimentar:** doença produzida por ingestão de alimentos que contêm toxinas formadas naturalmente em tecidos de plantas ou animais, produtos metabólicos de micro-organismos, substâncias químicas ou contaminantes físicas que se incorporam a ele de modo acidental ou intencional em qualquer momento, desde a sua origem, produção até o consumo.

¹¹ **Espécies de ECoP:** *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. lutrae* (HENNEKINNE *et al.*, 2010).

O elevado potencial infeccioso de *S. aureus* não está restrito apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também à produção de moléculas com grande poder patogênico, que incluem enzimas e toxinas, como as β -lactamases, coagulases, hialuronidases e catalases. Além dessas enzimas, o *S. aureus* também produz DNAses, lipases, proteases e esterases (SANTOS *et al.*, 2007)

5.8.3.2 Intoxicação alimentar estafilocócica

Staphylococcus aureus é frequente em surtos de intoxicação alimentar que se manifesta logo após a ingestão do alimento contaminado com toxinas pré-formadas. A quantidade de enterotoxina necessária para causar a doença, ainda não está bem estabelecida, mas sabe-se que depende de diferentes variáveis, como a suscetibilidade individual, peso corporal e, sobretudo, estado de saúde do comensal. Para a formação de enterotoxinas em quantidade suficiente para provocar intoxicação é necessária 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* por grama de alimento (BORGES *et al.*, 2008a).

De acordo com Hennekinne *et al.* (2010), cinco condições são necessárias para induzir intoxicação estafilocócica por *S. aureus*, são elas: (i) substrato (matérias-primas) contendo enterotoxinas estafilocócicas; (ii) transferência de estafilococos da origem para os alimentos; (iii) composição química do alimento que favorecem a multiplicação da bactéria; (iv) temperatura favorável e tempo suficiente para a multiplicação de bactérias e produção de toxinas; e (v) ingestão de alimentos que contenham quantidade suficiente de toxina para provocar a intoxicação alimentar.

Para Pereira *et al.* (1996), a maioria dos casos e surtos de intoxicação estafilocócica por *S. aureus* advém de más práticas higiênicas durante o processamento da matéria-prima ao produto acabado e/ou na distribuição do produto alimentar. Quando à transferência de *S. aureus* para os alimentos, os mesmos pesquisadores relatam a existência de duas fontes principais: (i) fonte humana, durante o processamento de alimentos; e (ii) no caso dos laticínios, os animais com mastite (doença infecciosa da glândula mamária).

A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) e o Centro Europeu de Prevenção e Controle das Doenças analisaram dados apresentados por 27 países da União Europeia (EU) sobre a ocorrência de zoonoses e surtos transmitidos por alimentos no ano de 2012 em que foram registados 5.363 surtos de origem alimentar, afetando 55.453 humanos, causando 5.118 hospitalizações e 41 mortes. Quatorze estados membros relataram 346 surtos

causados por toxinas estafilocócicas, o que representa 6,4% de todos os surtos relatados na UE. Isto é semelhante ao que sucedeu no ano de 2011, quando 345 surtos foram relatados (EFSA, 2014).

A fonte mais provável de contaminação primária de alimentos por *S. aureus* é o próprio ser humano. Uma grande parte da população humana possui *S. aureus* como parte da flora microbiana do nariz, pescoço e mãos e, conseqüentemente, essas pessoas que manuseiam os alimentos podem contaminar o produto cru, os equipamentos, e/ou o produto final (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

5.8.3.3 Enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são proteínas extracelulares de baixo peso molecular (22 a 29 kDa), hidrosolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, tais como a pepsina, permanecendo ativas após a ingestão. Outra característica importante é a termoestabilidade que confere resistência às enterotoxinas quando os alimentos são submetidos a tratamentos térmicos, como a pasteurização e a ultrapasteurização (RAHIMI; FOROUGH, 2013).

Já foram descritas 18 enterotoxinas distintas: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEM, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (GENIGEORGIS, 1989; BALABAN; RASOOLY, 2000; JABLONSKI; BOHACH, 2001; JARRAUD *et al.*, 2001; ORWIN *et al.*, 2001; LETERTRE *et al.*, 2003; OMOE *et al.*, 2002). Além disso, para SEC, SEG, SEI e SEU foram reportadas algumas variantes (MARR *et al.*, 1993; OMOE *et al.*, 2002; LETERTRE *et al.*, 2003).

As enterotoxinas estafilocócicas são codificadas por genes presentes em bacteriófagos (SEA, SED, SEE e SEJ), plasmídios (SEH e SEP), cromossomas (SEH e SEP) e ilhas de patogenicidade cromossomal (SEB, SEC, SEG, SEGV, SEI, SEI, SEM, SEN, SEO, SEK, SEL e SEQ). Estas são similares em sua composição e atividade biológica, mas apresentam diferenças antigênicas. Várias SEs sorologicamente distintas têm sido reconhecidas e classificadas de A a U, e seus genes como *sea* a *seu* (SU; WONG, 1995).

As enterotoxinas são termorresistentes, o que é especialmente importante para a indústria de alimentos, porque a maioria dos alimentos processados sofre algum tratamento térmico durante o processamento. Por exemplo, a pasteurização do alimento destruirá o micro-organismo – *S. aureus* – mas não inativará a toxina, caso já esteja presente. Porém, elas podem

ser inativadas por tratamento térmico utilizado na esterilização de alimentos enlatados quando estão presentes em baixas concentrações (FRANCO; LANDGRAF, 2004). A inativação térmica de SEA, SEB e SEC varia de acordo com a matriz alimentar e o pH. Sendo assim, é muito difícil calcular o impacto de tratamento térmico na atividade das enterotoxinas, visto que, isto depende do tipo e da concentração de enterotoxina e da matriz alimentar. Além disso, em alguns casos, a inativação térmica é espontaneamente reversível pelo tratamento com pH alcalino ou com uréia (BENNET, 1992).

O isolamento e determinação da enterotoxigenicidade das estirpes de *Staphylococcus* isoladas em alimentos indicam o potencial para a produção de enterotoxinas. Além disso, a presença do micro-organismo em altos níveis pode indicar o uso inadequado do binômio tempo-temperatura no processamento e/ou armazenamento dos alimentos, condição em que *S. aureus* pode desenvolver-se até níveis suficientes para produzir enterotoxinas em concentração capaz de causar a intoxicação estafilocócica (ZOCCHÉ, 2008).

A determinação do tipo de SE é um fator importante na investigação epidemiológica de casos e surtos da doença e a sua identificação nos alimentos pode indicar a possível fonte de contaminação. Foi demonstrado que SEA e SEB estão associadas com a contaminação de origem humana, através de manipuladores de alimentos, e que SEC e SED estão associadas com contaminação a partir de animais (ZOCCHÉ, 2008). Já os genes *fem* ou *aux* estão presentes tanto em cepas estafilocócicas resistentes a metilina quanto naquelas que são susceptíveis a esta droga. Três desses genes, *femX* (ou *FmhB*), *femA* e *femB*, desempenham papel vital nos estágios posteriores à síntese de peptidoglicano da parede celular dos estafilococos e, por essa razão, podem servir como alvos apropriados para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos (BENSON *et al.*, 2002).

O gene *femA* tem sido explorado como marcador específico de *S. aureus* em testes pautados em pesquisa de DNA. Esse gene codifica um fator essencial para a resistência à metilina e está universalmente presente em todas as estirpes de *S. aureus*. A amplificação do gene *femA* ou parte dele por PCR constitui uma ferramenta útil na diferenciação de espécies de *Staphylococcus* podendo ser uma alternativa segura para a identificação desta bactéria (MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000).

5.8.3.4 Fatores que afetam a multiplicação e a sobrevivência de estafilococos coagulase positiva e destruição de enterotoxinas estafilocócicas

Inúmeros são as condições que podem afetar a multiplicação e a sobrevivência de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas estafilocócicas. Dentre elas pode-se destacar a temperatura, potencial hidrogeniônico (pH), atividade de água (Aa), radiações e atmosfera gasosa. Os estafilococos são micro-organismos mesófilos com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8 °C e podem produzir enterotoxinas termoresistentes a temperaturas entre 10 e 46 °C, com temperatura ótima entre 40 e 45 °C. O pH ideal para seu desenvolvimento varia entre 7 a 7,5, mas é possível a multiplicação em alimentos com pH variando entre 4,2 e 9,3 (SANTANA *et al.*, 2010).

Este grupo de micro-organismos tem a capacidade de sobreviver e se multiplicar em uma concentração de cloreto de sódio de até 15% e a produção de enterotoxina acontece em concentrações de sal de até 10%, o que faz com que os alimentos curados também sejam veículos potenciais de intoxicação (SANTANA *et al.*, 2010).

S. aureus é muito resistente à congelação e descongelação e sobrevive em alimentos conservados a temperaturas menores ou iguais a -20 °C, contudo, a temperaturas de -10 a 0 °C a viabilidade destas bactérias decresce notavelmente durante a conservação por congelamento. Assim, tal como as bactérias, as toxinas estafilocócicas demonstram ser bastante resistentes e estáveis à congelação (FONTE, 2012).

Quanto à Aa, os estafilococos têm capacidade de se multiplicar em alimentos com valores inferiores ao normalmente considerados mínimos para outras bactérias halófilas. O valor mínimo de Aa é 0,86, apesar de já ter sido relatada a multiplicação desses micro-organismos em alimentos com Aa de 0,83 (WONG; BERGDOLL, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2005). A presença de outros micro-organismos também é um ponto importante, pois os estafilococos são considerados mal competidores (LOIR *et al.*, 2003).

As radiações ionizantes e não ionizante (por exemplo, raios ultravioletas - UV) são eficazes na destruição de *S. aureus*, mas as enterotoxinas são resistentes aos tratamentos por irradiação aplicáveis a alimentos. Entretanto, apesar desses fatores serem os mais referenciados e estudados, não são os únicos que interferem na multiplicação bacteriana e na produção ou inibição da produção de enterotoxinas. A presença de certos aminoácidos e açúcares e a competição microbiana têm sido alvo de estudo. Aminoácidos como a valina, arginina e a cistina estão estritamente implicadas na multiplicação do micro-organismo e na produção de enterotoxinas em algumas estirpes de *S. aureus*, nomeadamente SEA, SEB e SEC. Já a glucose

demonstrou ter um efeito inibitório sobre a produção de SE, especialmente para SEB e SEC. Este efeito inibitório foi atribuído a queda de pH, como consequência do metabolismo da glucose (ONOUE; MORI, 1997).

5.8.3.5 Métodos de detecção de enterotoxinas

Muitos métodos foram desenvolvidos para a detecção de enterotoxinas, os quais se resumem a ensaios biológicos e imunológicos. Os ensaios biológicos implicam testes em animais, o que é oneroso, complexo e suscita muitas questões éticas. Já, os ensaios imunológicos são mais sensíveis (SANTILIANO *et al.*, 2011), estes baseiam-se na ligação do anticorpo com o antígeno (monoclonal, policlonal ou recombinante) com o antígeno (ZUNABOVIC; DOMIG; KNEIFEL, 2011).

A técnica de EnzymeLinked Immunosorbent Assay (ELISA), é o método imunológico mais empregado para detecção de enterotoxina estafilocócica e apresenta vantagens, como fácil manuseio, sensibilidade e aplicabilidade na triagem. Várias técnicas de ELISA foram desenvolvidas para a detecção de SEs em sobrenadantes de culturas e em amostras de alimentos, sendo o ELISA sanduíche o método mais comum, podendo detectar menos de 1 nanograma (ng) de SE/mL de sobrenadante (SANTANA *et al.*, 2010). Mas é importante mencionar que a técnica pode apresentar resultados falsos positivos por ocorrência de reações inespecíficas, principalmente com a proteína A e também falsos negativos em alimentos que passaram por tratamentos térmicos (SANTANA, 2006).

O desenvolvimento de técnicas moleculares também viabilizou a aplicação dessa ferramenta diagnóstica para detecção da sequência de nucleotídeos do gene, responsável pela produção de enterotoxina (SANTANA *et al.*, 2010). Os métodos moleculares incluem hibridação de ácidos nucleicos e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta última técnica pode ser utilizada para detecção de diversos tipos de estafilococos enterotoxigênicos em culturas e alimentos (WU *et al.*, 2016).

5.8.4 Micro-organismos Indicadores de Conservação

5.8.4.1 *Micro-organismos aeróbios mesófilos e psicotróficos*

Em alimentos refrigerados, populações de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicotróficos, têm sido utilizados como indicadores da qualidade higiênica, além de sinalizar para o tempo útil de conservação. Populações elevadas desse grupo de micro-organismos contribuem para a redução da vida de prateleira, podendo indicar matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos (BRUNO *et al.*, 2005).

Micro-organismos psicrófilos são aqueles cuja temperatura de crescimento encontra-se na faixa de 0°C a 20°C, com ótimo entre 10°C e 15°C e micro-organismos psicotróficos são os capazes de se desenvolver entre 0°C e 7°C, com produção de colônias ou turvação do meio de cultura em sete a dez dias. Alguns psicotróficos, no entanto, crescem em temperatura de até 43°C, sendo, de fato, mesófilos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Os mesófilos constituem o grupo que inclui micro-organismos que se desenvolvem em temperaturas entre 20 a 45°C, com temperatura ótima de crescimento entre 30 a 40°C (JAY, 2005). Estão incluídas no grupo dos mesófilos, bactérias patogênicas de origem alimentar, e elevada contagem de mesófilos é um indicativo de que houve condições favoráveis para multiplicação destes patógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

5.8.4.2 *Bolores e leveduras*

As leveduras, como os bolores, são fungos, se diferenciam por apresentarem, forma unicelular, esférica a ovóide e de elipsóide a filamentosa. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente do que os bolores (PELCZAR; REID; CHAN, 1996). Bolores são fungos filamentosos, multicelulares, podendo estar presentes no solo, no ar, na água e em matéria-orgânica em decomposição (SIQUEIRA, 1995).

A ocorrência de espécies de bolores e leveduras patogênicas em alimentos é praticamente desconhecida, sua importância reside muito mais no fato de serem eventuais agentes de deterioração. Condições seletivas para a intensa proliferação de levedura nos alimentos são dadas pelos pH ácido, com ótimo na faixa de 4,0 a 4,5, temperatura ao redor de 25 °C a 28 °C, embora muitas espécies se desenvolvam sob refrigeração a 4 °C e 5 °C, e

substrato rico em carboidratos, principalmente açúcares simples (PELCZAR; REID; CHAN, 1996).

Fungos e leveduras viáveis e em índice elevado nos alimentos pode fornecer várias informações, como, condições higiênicas deficientes de equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e/ou estocagem e matériaprima com contaminação excessiva (SIQUEIRA, 1995).

6 METODOLOGIA GERAL

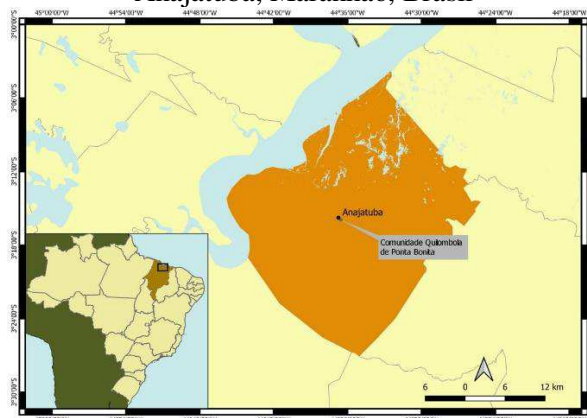
6.1 Ética na Pesquisa

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA sob o protocolo nº 08/2021 por atender as Resoluções do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº. 879/2008, 1000/2012 e a Lei Federal nº. 11794/2008, que tratam dos procedimentos Éticos na Experimentação Animal.

6.2 Área de Estudo

A área de estudo compreendeu a Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, situado na zona rural do município de Anajatuba, estado do Maranhão. O referido município pertence à região da Baixada Maranhense, localizado entre as coordenadas geográficas de Latitude $03^{\circ}15'50''$ S e Longitude de $44^{\circ}37'12''$ W (Figura 1).

Figura 1. Localização geográfica da comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, Maranhão, Brasil



Fonte: Arquivo dos autores.

6.3 Variáveis Ambientais e Coletas de Amostras de Água e Peixe

A aferição das variáveis ambientais e as coletas de amostras de água e peixes foram realizadas em campo natural inundável (Figura 2), em duas campanhas amostrais (setembro de 2021/período seco e fevereiro de 2022/período chuvoso).

Figura 2. Campo natural inundável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão



Fonte: Arquivo dos autores.

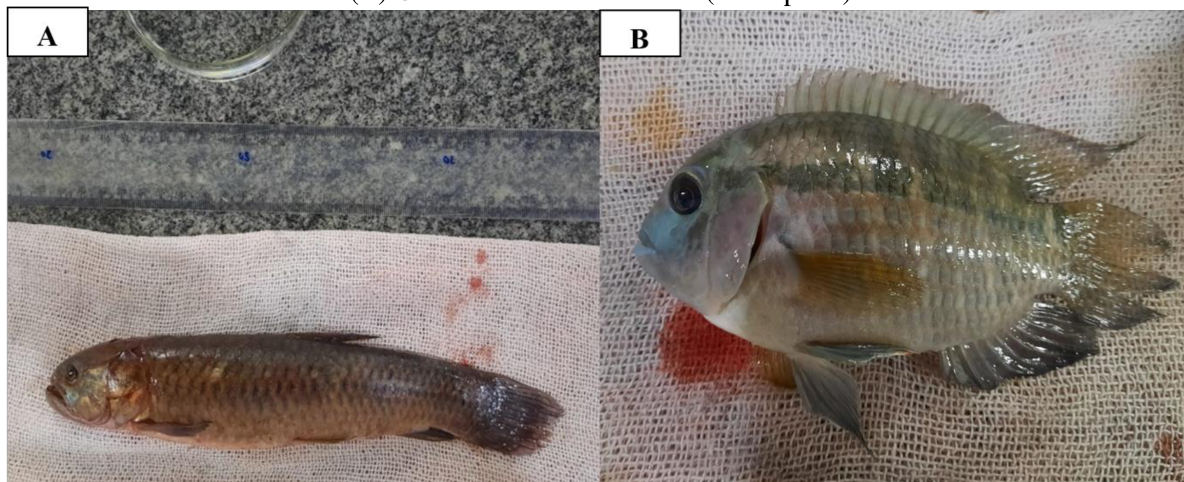
Inicialmente foram obtidas *in situ* as variáveis ambientais por meio de instrumento multiparâmetro: temperatura (°C), potencial hidrogeniônico (pH), oxigênio dissolvido (OD) em mg/L, condutividade em $\mu\text{S}/\text{cm}$ e salinidade em ppt. Na sequência, foram coletadas quatro amostras de água, da superfície, duas por campanha, em frascos de vidro borossilicato estéreis com capacidade de 500 mL, acondicionadas ao abrigo de luz solar em caixas isotérmicas.

Foram capturados 42 peixes, sendo 21 *Hoplerythrinus unitaeniatus* (jeju) e 21 *Cichlasoma bimaculatum* (acará preto) (Figura 3) com a utilização de rede de emalhe de malha 4 (20 mm), operada de forma ativa (arrastos/cercos) e uma tarrafa com malha 4 (20 mm). Foram coletadas 21 amostras de peixes (18 acarás e 3 jejus) no período seco e 21 amostras no período chuvoso (3 acarás e 18 jejus).

Em seguida, os peixes foram acondicionados e transportados vivos em caixa de isopor com capacidade de 100 litros provida com água do ambiente de captura, providas de oxigenação por um período de 2 a 3 horas e encaminhadas ao Laboratório de Reprodução de Recursos Aquáticos – LARAQUA da UEMA, onde foram colocados em um tanque com água e oxigenação constante por período de 12 horas até o processamento do material biológico para

análise microbiológica no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água do Centro de Ciências Agrárias – CCA/UEMA.

Figura 3. Exemplos de peixes capturados em ambiente alagável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão: (A) *Hoplerythrinus unitaeniatus* (jeju); (B) *Cichlasoma bimaculatum* (acará preto)



Fonte: Arquivo dos autores.

6.4 Processamento do Material Biológico: eutanásia e coleta de fragmentos de musculares

Os peixes foram eutanasiados por perfuração da parte superior da cabeça com instrumento pontiagudo (lâmina de bisturi). Para coleta de fragmentos musculares, os peixes foram dissecados de forma asséptica, com a utilização de pinças e tesouras estéreis e removida a musculatura estriada esquelética longitudinal (músculos dorsais e ventrais) dos 42 peixes. Os fragmentos removidos (25 ± 5 gramas) foram acondicionados em sacos plásticos estéreis para realização das análises microbiológicas.

6.5 Procedimentos Laboratoriais

6.5.1 Físico-química da água

As análises físico-químicas complementares foram executadas no Laboratório de Físico-química de Alimentos e Água da UEMA e corresponderam aos seguintes parâmetros: cálcio, magnésio, dureza total, alcalinidade total, cloretos, sólidos totais dissolvidos (STD) e turbidez. Os métodos analíticos utilizados pelo referido laboratório estão descritos no livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; PASCUET, 2005).

6.5.2 Microbiológicos

6.5.2.1 Água

Foi utilizado para a quantificação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e *Escherichia coli* o sistema cromogênico enzimático (Colilert, Idexx, USA), por meio da utilização de substratos definidos (AOAC, 2003). De cada amostra colhida, 10 mL da amostra foi diluído em 90 mL de água destilada esterilizada e vertido em frascos esterilizados contendo o substrato. Em seguida, a solução foi distribuída em cartelas Quanti-Tray que foram seladas e incubadas em estufa a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por 24 horas. As análises microbiológicas foram executadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da UEMA.

A confirmação da presença de coliformes totais se deu pela alteração de cor da amostra de água de incolor para amarela. Enquanto a confirmação de *E. coli*, pela emissão da fluorescência azul da amostra quando exposta à luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm (IDEX Laboratories Inc.). Os resultados foram expressos em NMP/100mL da amostra sob análise, após conversão pelo fator de diluição, seguida da interpretação em tabela de conversão própria.

6.5.2.2 Peixes

Para análise microbiológica dos peixes foram pesadas $25 \pm 0,2$ g de cada amostra colocados em sacos estéreis, sendo adicionada 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1%, correspondendo à primeira diluição (10^{-1}), homogeneizada por aproximadamente dois minutos em "stomacher" a uma rotação média de 250 rotações por minuto (rpm). Na sequência, mais duas diluições sucessivas (10^{-2} e 10^{-3}) foram preparadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada tamponada a 0,1%.

A caracterização microbiológica foi realizada pela enumeração de bolores e leveduras, micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e de Estafilococos coagulase positiva (ECoP), quantificação de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. Todas as análises seguiram os procedimentos e recomendações da *American Public Health Association* (DOWNES; ITO, 2001).

6.5.2.2.1 Enumeração de bolores e leveduras

A técnica utilizada foi o plaqueamento em profundidade, utilizando 1 mL das diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) com a utilização do Ágar Batata Dextrose (BDA) acidificado com solução de ácido tartárico a 10%. Após o procedimento, as placas foram incubadas em estufa a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por sete (07) dias. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama.

6.5.2.2.2 Enumeração de micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis

A técnica utilizada foi o plaqueamento em profundidade, utilizando 1 mL das diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) com a utilização do Ágar Padrão para Contagem (PCA). Seguido da incubação das placas em posição invertida em estufa bacteriológica a $35\text{°C} \pm 1\text{ °C}$ por $48 \pm 2\text{h}$. Foram consideradas para contagem, somente as placas que apresentaram de 30 a 300 colônias, multiplicada a sua média aritmética pelo respectivo fator de diluição e o resultado expresso em Unidades Formadoras de Colônias/g de amostra (UFC/g).

6.5.2.2.3 Enumeração de *Estafilococos coagulase positiva (ECoP)*

A análise de ECoP foi realizada com a inoculação de 0,1 mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em ágar Baird Parker (BP) acrescido de emulsão de gema de ovo e telurito de potássio, por meio método da técnica de espalhamento em superfície. Em seguida, as placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 24 - 48h. Foram selecionadas placas contendo de 30 a 300 colônias e coletadas cinco colônias típicas (cor negra ou cinza, lisas, convexas, com presença de zona opaca/clara em torno das colônias) e atípicas para estafilococos para realização dos testes de Gram, catalase e coagulase.

Para o teste de coagulase, as colônias selecionadas foram incubadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 2 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Seguido, da comprovação da capacidade de coagular o plasma pela ação da enzima coagulase.

6.5.2.2.4 Quantificação de coliformes totais e termotolerantes

Para a quantificação de coliformes totais e termotolerantes foi realizada a técnica dos tubos múltiplos. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram inoculadas em séries de três tubos, contendo 9 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) em concentração simples, com tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. Uma alçada de cada tubo positivo (turvação e formação de gás visível no tubo de Durham) foram transferidos para tubos contendo os caldos Verde Brilhante (VB) e do *Escherichia coli* (EC), que foram incubados a 35 °C e 45 °C, respectivamente, ambos por 24-48 horas. Foram anotados o número de tubos positivos e determinado o NMP em uma tabela adequada às diluições utilizadas e o resultado expresso em NMP de coliformes totais e termotolerantes/g.

a.1) Pesquisa de *Escherichia coli*

Para a pesquisa de *E. coli* foram realizados o isolamento e confirmação com a utilização de metodologia convencional, como descrito a seguir:

a.1.1) Primeira etapa: enriquecimento da amostra

Inóculos bacterianos de cada tubo EC positivo foram inoculados em Ágar MacConkey (MCK). A cultura foi incubada a 37 °C, por 24 horas. Das placas representativas foram transferidas todas as colônias com morfotipos diferentes e, no máximo, cinco colônias com o mesmo morfotipo. Cada uma delas foi inoculada em Ágar Tripticase de Soja (TSA) e em caldo cérebro-coração (BHI) e incubada a 37 °C, por 24 horas.

a.1.2) Segunda etapa: identificação das colônias isoladas

A identificação da espécie *E. coli*, em cada cultura pura, foi confirmada por provas bioquímico-fisiológicas: (i) produção de gás a partir da glicose; (ii) fermentação da lactose; (iii) descarboxilação da lisina; (iv) produção de indol a partir do triptofano; (v) não degradação da ureia; e, (vi) ausência de produção de sulfeto de hidrogênio a partir de aminoácidos sulfurados, utilizando o meio de Rugai modificado por Pessoa e Silva (1972). Além, dos testes bioquímicos de Vermelho de Metila (VM) e Voges Proskauer (VP).

6.5.2.2.5 Pesquisa de *Salmonella* sp.

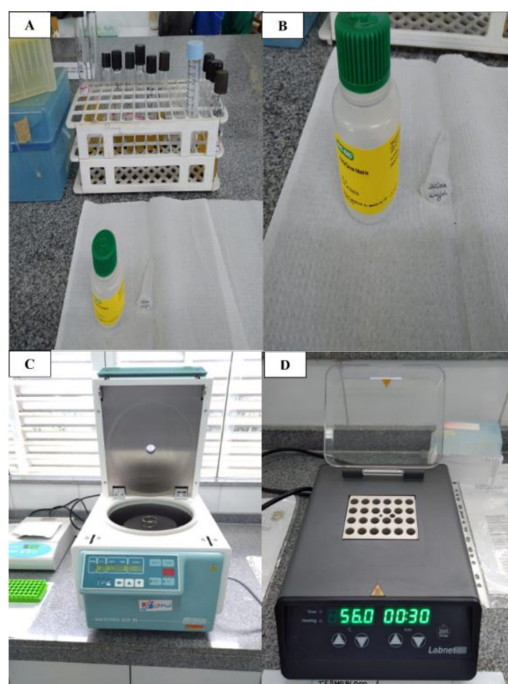
Na pesquisa de *Salmonella* sp. a amostra contida em 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1% foi incubada a 37 °C/24 horas. Estas amostras foram transferidas para dois diferentes caldos de enriquecimento seletivo, Rappaport-Vassiliadis e Selenito-Novobiocina, incubados a 37 e 42 °C/24 horas. Na sequência, cada amostra foi semeada em placas de Petri com Ágar Entérico de Hektoen (HE) e em Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) que foram incubadas por 24 horas a 37 °C. As colônias típicas obtidas nas placas foram confirmadas por meio de provas bioquímicas e sorológicas. Inicialmente as colônias foram submetidas aos testes de descarboxilação da lisina, fermentação da lactose e/ou sacarose e produção de H₂S, no Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI). Culturas características do gênero *Salmonella* nesses meios foram submetidas ao teste de aglutinação com soros polivalente anti *Salmonella*.

6.5.3 Moleculares

6.5.3.1 *Estafilococos coagulase positiva (ECoP)*

A extração do DNA das culturas puras de ECoP foi realizada com a resina InstaGene Matrix ® (BioRA) de acordo com as indicações do fabricante (Figura 4). Inicialmente 200 µL da cultura foi centrifugada por um minuto à 12.000 rotações por minuto (rpm). O *pellet* formado foi ressuspenso em 1 mL de água autoclavada seguida da centrifugação (12 rpm/1min). O sobrenadante foi descartado e adicionado 200 µL da resina e 120 µL da enzima lisozima com posterior incubação das amostras por 30 minutos a 56°C. Na sequência, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e incubadas por oito minutos a 100 °C. Então, as amostras foram homogeneizadas novamente em vórtex por 10 segundos e centrifugadas por mais 3 minutos a 12.000 rpm. Ao final dessa etapa foi retirado 50 µL do sobrenadante e descartado o precipitado.

Figura 4. Extração do DNA das culturas puras de *Estafilococcus coagulase positiva* (ECoP): (A) - culturas puras de ECoP e resina InstaGene Matrix® (BioRA); (B) - resina e enzima lisozima (20 ng/mL); (C) - centrifuga; (D) - termobloco



Fonte: Arquivo dos autores.

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro pela leitura de absorvância a 260 nm e a relação 260/280 nm foi utilizada para determinar a pureza das amostras (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Em seguida, a concentração das amostras foi ajustada com TE pH 8,0 para aproximadamente 200 ng/ μ L e o DNA armazenado a -20° C até a realização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de genes enterotoxigênicos de ECoP.

O DNA dos isolados de ECoP foi caracterizado por PCR utilizando o Kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante, obtendo-se um volume final de 25 μ L por reação. Os *primers* alvos e as condições para amplificação estão sumarizadas na Tabela 1. Os controles positivos e o controle negativo interno (água), serão incluídos em cada lote de reações.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores na reação em cadeia da polimerase (PCR) e condições de amplificação para genes enterotoxigênicos de *Estafilococcus coagulase positiva*

Designação do Gene	Primer	Iniciadores (5'-3')	Programa	Tamanho do Amplicon (bp)	Referência
Sea	GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG		102	Betley; Mekalanos (1985)
	GSEAR-2	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG			
Seb	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAACTGAGC		164	Jones; Khan (1986)
	GSEBR-2	CCAAATAGTTGACGAGTTAGG			
Sec	GSECR-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	94°C/5 min	451	Bohach; Schlievert (1987)
	GSECR-2	CACACTTTTAGAATCAACCG	94°C/2 min 54,6°C/2 min		
Sed	GSEDR-1	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG	72°C/1min	278	Bayles; Iandolo (1989)
	GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	35x 72°C/7 min		
See	GSEER-1	AGGTTTTTTTCACAGGTCCATCC		209	Couch; Soltis; Betley (1988)
	GSEER-2	CTTTTTTTTCTTCGGGTCAATC			
FemA	GFEMAR-1	AAAAAAGCACATAACAAGCG		132	Berger-Bachi <i>et al.</i> (1989)
	GFEMAR-2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG			

Onde: bp= pares de bases; s= segundo; min= minutos.

Fonte: Elaborado pelos autores

Os produtos de PCR foram visualizados mediante a aplicação de 5 µL do amplificado em gel de agarose 2%, corado com SYBR Safe®, submetido à eletroforese horizontal por 30 minutos a 90V em tampão TBE 1X. As bandas serão visualizadas sob luz ultravioleta e imagens digitais serão gravadas com o modelo L-PIX Image EX (Locus Biotecnologia, Brasil).

6.5.3.2 *Escherichia coli*

A extração do DNA das culturas puras de *E. coli* das amostras de água e peixes seguiu o mesmo procedimento utilizado para a ECoP, excetuando a utilização da enzima lisozima que não ocorreu neste protocolo. A quantificação do DNA extraído também foi realizado de igual forma à utilizada para ECoP. Em seguida, a concentração das amostras foi ajustada com TE pH 8,0 para aproximadamente 200 ng/µL e o DNA foi armazenado a -20° C até a realização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de patótipos diarreio-gênicos de *E. coli*.

O DNA dos isolados de *E. coli* foi caracterizado por PCR utilizando o Kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante, para a obtenção de um volume final de 25 µL por reação. Os *primers* alvos e as condições para amplificação estão sumarizadas na Tabela 2. Os controles positivos para *eae*, *Stx1* e *Stx2* (*E. coli* CDC EDL-933, INCQS 00171), *bfpA* (*E. coli* CDC O126, INCQS 000184), *elt* (*E. coli* 0761-2), *est* (*E. coli* 0122-4), bem como o controle negativo interno (água), serão incluídos em cada lote de reações.

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores na reação em cadeia da polimerase (PCR) e condições de amplificação para as estirpes de *Escherichia coli* diarréio-gênica

Designação do primer	Iniciadores (5'-3')	Programa	Tamanho do Amplicon (bp)	Referência
<i>eae1</i>	CTG AAC GGC GAT TAC GCG AA	94°C/5 min 94°C/1 min 53°C/2min 72°C/3min 30x 72°C/7 min	917	Reid <i>et al.</i> (1999)
<i>BfpA</i>	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC	94°C/5 min 94°C/30 s 56°C/1 min 72°C/2 min 29x 72°C/7 min	326	Gunzburg <i>et al.</i> (1995)
<i>Stx1</i>	CAG TTA ATG TGG TGG GGA AGG	95°C/5min 95°C/20 s 61°C/40 s 72°C/90 s 30x 72°C/7 min	348	Vidal <i>et al.</i> (2004)
<i>Stx2</i>	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	95°C/5 min 95°C/20 s 61°C/40 s 72°C/90 s 30x 72°C/7 min	584	Vidal <i>et al.</i> (2004)
Lt	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC	95°C/5 min 95°C/45 s 50°C/1 min 72°C/1 min 40x 72°C/7 min	450	Aranda; Fagundes-Neto; Scaletsky (2004)
St	ATT TTT MTTTCTGTATTRTCTT	95°C/5 min 95°C/45 s 50°C/1 min 72°C/1 min 40x 72°C/7 min	90	Aranda; Fagundes-Neto; Scaletsky (2004)

Onde: bp= pares de bases; s= segundo; min= minutos.

Fonte: Elaborado pelos autores

Os produtos de PCR foram visualizados seguindo o mesmo protocolo para ECoP.

6.6 Análise dos Resultados

Os resultados laboratoriais foram processados e interpretados, armazenados em um banco de dados, ordenados e apresentados em tabelas de maneira a permitir uma boa visão do conjunto das variáveis. Também foi realizada análise estatística descritiva para a obtenção de frequências absoluta e relativa. Para verificar se existiam diferenças significativas ao nível de 5% na contaminação microbiológica entre períodos avaliados e espécies amostradas foi realizado o teste de Fisher's com a utilização do *software* livre Instat.

7. RESULTADOS

Os resultados desta Dissertação estão organizados em quatro capítulos. Cada capítulo corresponde a um artigo, com os seguintes temas:

Capítulo 1: Qualidade ambiental de água oriunda de lagoas marginais utilizadas para fins de pesca artesanal em Comunidade Quilombola Maranhense, publicado no E-book “Meio Ambiente e a Outra Economia dos Povos e Comunidades Tradicionais” da Editora Científica Digital, ISBN 978-65-5360-096-6, DOI: 10.37885/220207927, páginas 61-72, 2022.

Capítulo 2: Microbiological featuring of two neotropical fish species from the quilombola area of Maranhão State, Brazil, artigo aceito para publicação na revista Acta Veterinaria Brasilica, ISSN 1981-5484, Qualis Capes B1 (quadriênio 2017-2020) (carta de aceite em anexo).

Capítulo 3: Patótipos diarreiogênicos em duas espécies de peixes neotropicais e água oriundos de área quilombola Maranhense, Brasil. O artigo será submetido ao periódico Boletim do Instituto de Pesca, ISSN 1678-2305, Qualis Capes A4 (quadriênio 2017-2020).

Capítulo 4: Primeira detecção de genes enterotoxigênicos em duas espécies de peixes neotropicais oriundos de área quilombola Maranhense, Brasil. O periódico para submissão desse artigo será escolhido posteriormente.

7.1 Capítulo 1

Qualidade ambiental de água oriunda de lagoas marginais utilizadas para fins de pesca artesanal em Comunidade Quilombola Maranhense¹²

Greiciene dos Santos de Jesus; Izabela Alves Paiva; Ladilson Rodrigues Silva; Juliany Silva Mendes; Vytoria Mendes da Silva Monteiro; Joyce Caroline Campos Mendes Braga; Vanielly Viana Rodrigues Vieira; Erivânia Gomes Teixeira; Danilo Cutrim Bezerra; Nancyleni Pinto Chaves Bezerra.

RESUMO

A pesca é uma das atividades extrativistas tradicionais mais importantes na Região Amazônica brasileira e o peixe representa uma das principais fontes de proteína para as comunidades tradicionais, a exemplo dos quilombolas, que vivem em áreas de rios, igarapés, lagos e demais cursos de água. **Objetivo:** Nesse contexto objetivou-se avaliar a qualidade ambiental de água oriunda de lagoas marginais utilizadas para fins de pesca artesanal em comunidade quilombola maranhense. **Método:** As amostras de água foram coletadas de ambiente alagável da comunidade quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão. Os parâmetros abióticos (temperatura, potencial hidrogeniônico, oxigênio dissolvido, condutividade e salinidade) foram aferidos *in situ* por meio de instrumento multiparâmetro e coletadas duas amostras de água por período (chuvoso e seco) em frascos de vidro borossilicato estéreis com capacidade de 500 mL. Em ambiente laboratorial, realizou-se a quantificação de coliformes totais e de *Escherichia coli* com a utilização de sistema cromogênico enzimático e análises físico-químicas complementares por determinação dos parâmetros alcalinidade, cloretos, sólidos totais dissolvidos, nitrato, nitrito, ferro e turbidez. **Resultados:** Os resultados evidenciam que as amostras de água avaliadas estavam alteradas nos parâmetros físico (turbidez), químico (oxigênio dissolvidos, sólidos totais dissolvidos, ferro e cloretos) e microbiológico (coliformes totais e *E. coli*). Os valores encontrados para os parâmetros temperatura, salinidade, nitrato e nitrito das amostras, em ambos os períodos, estão em consonância com aqueles da classe 2, determinados na Resolução do Conselho Nacional do

¹²Artigo publicado como capítulo de livro no E-Book “Meio Ambiente e a Outra Economia dos Povos e Comunidades Tradicionais” da Editora Científica Digital, ISBN 978-65-5360-096-6, DOI: 10.37885/220207927, páginas 61-72, 2022.

Meio Ambiente – CONAMA 357/2005. **Conclusão:** Conclui-se que os resultados do estudo demonstram que ocorre depreciação da qualidade da água no tocante aos parâmetros físico (turbidez), químicos (OD, STD, ferro e cloretos) e microbiológicos (coliformes totais e *E. coli*) do ambiente alagável. Infere-se que tais resultados em algum momento podem contribuir para o estresse de peixes, queda na imunidade e predisposição a ocorrência de doenças de diferentes etiologias, com comprometimento da base da alimentação dos quilombolas da comunidade de Ponta Bonita.

Palavras-chave: Monitoramento Ambiental, Lagoas Marginais, Recursos Pesqueiros, Pesca Artesanal.

INTRODUÇÃO

A pesca representa mais que uma atividade econômica, se revelando como um modo de vida singular, persistindo atualmente nas diversas comunidades tradicionais na região Nordeste brasileira que sobrevivem desta atividade, obtendo dela o acesso a sua principal fonte de renda e de proteína animal para a alimentação (DIEGUES, 1999; NOGUEIRA; PEREIRA SÁ, 2015). De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) citado por Ramires et al. (2012), a pesca artesanal, emprega aproximadamente 36 milhões de pessoas ao redor do mundo, em que 15 milhões praticam a pesca como atividade exclusiva, 13 milhões como atividade complementar e oito milhões de forma ocasional.

No Maranhão, a pesca (principalmente a artesanal) e a aquicultura são umas das principais atividades fornecedoras de proteína animal para alimentação humana (MONTELES; FUNO; CASTRO, 2010; NUNES, 2015). Dentre as áreas de maior produção de pescado nesse Estado, destaca-se a Baixada Ocidental Maranhense, região composta por um sistema hidrográfico integrado por um conjunto de rios, lagos e planícies fluviais inundáveis que possui extensão territorial de 1.775.035,9 hectares (ha), conferindo-lhe o status de maior bacia lacustre da Região Nordeste (PEREIRA; RODRIGUES; VIEGAS, 2016; SILVA JUNIOR et al., 2016).

A Baixada Maranhense é constituída por 21 municípios em que, a maioria tem na atividade pesqueira importante fonte geradora de alimentos e renda para milhares de famílias (ALMEIDA, 2008). A Região possui características que permitiram a instalação de diversos povos tradicionais ao longo do tempo. De acordo com Almeida (2013), essa região detém o maior número de comunidades remanescente de quilombos, embora nem todas estejam certificadas pela Fundação Cultural Palmares (FCP) ou pela Associação das Comunidades Negras Rurais Quilombolas do Maranhão (ACONERUQ).

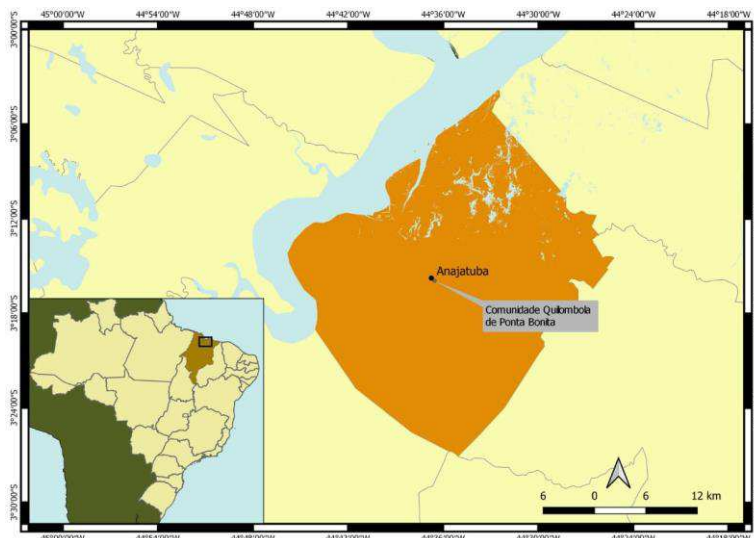
As comunidades tradicionais quilombolas que habitam a Amazônia maranhense tem na pesca artesanal, um importante modo de vida, com a obtenção de relevante fonte de proteínas ao longo do ano, sendo, a atividade realizada de acordo com conhecimentos tradicionais empíricos (BERNARDES *et al.*, 2011; ARRUDA *et al.*, 2018). Esta atividade foi elemento fundamental na formação de quilombos na Baixada Maranhense (BARROS *et al.*, 2019).

Para Barros *et al.* (2019), a pesca é um elemento fundamental na formação de quilombos na Baixa Ocidental Maranhense, entre elas, a comunidade quilombola de Ponta Bonita, localizada no município de Anajatuba. Esse quilombolo, também, lutou pelas terras onde vivem e tem como principal fonte de proteína animal da dieta, o peixe, capturado por pesca artesanal de rios, lagos e campos alagados da região. Nesse contexto, objetivou-se com o estudo avaliar a qualidade ambiental de água oriunda de lagoas marginais utilizadas para fins de pesca artesanal em comunidade quilombola maranhense.

MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo compreendeu a Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, situado na zona rural do Município de Anajatuba, estado do Maranhão. O referido município pertence à região da Baixada Maranhense, localizado entre as coordenadas geográficas de Latitude $03^{\circ}15'50''$ S e Longitude de $44^{\circ}37'12''$ W (Figura 1). De acordo com a Secretaria Estadual Extraordinária de Igualdade Racial (SEIR), Anajatuba possui 21 quilombos, sendo Ponta Bonita, oficialmente reconhecido pela Fundação Cultural Palmares (FCP) (SEIR, 2018).

Figura 1. Localização geográfica da Comunidade de Ponta Bonita, município de Anajatuba – MA.



Fonte: Elaborado pelos autores.

O clima dominante na região, onde está inserido o município de Anajatuba, é do tipo AW² (clima tropical úmido com estação seca de inverno), de acordo com a classificação climática de Koppen (1948). Na área de estudo, tem-se de modo geral, um período seco de seis meses (agosto a janeiro), dos quais, três a quatro meses são considerados muito secos, com menos de 8% da chuva total. No período chuvoso, de seis meses (fevereiro a julho), pelo menos dois meses podem ser considerados muito chuvosos, com mais de 30% do total da precipitação pluviométrica.

Amostras

As amostras foram coletadas de lagoas marginais (ambiente alagável)³ da comunidade de Ponta Bonita (Figura 2). Foram realizadas duas coletas, uma no período chuvoso e a outra no período seco, com intervalo semestral entre coletas.

Figura 2. Ambiente alagável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão



Fonte: Arquivo dos autores.

Os parâmetros abióticos, temperatura (°C), potencial hidrogeniônico (pH) e salinidade foram aferidos *in situ* por meio de instrumento multiparâmetro modelo AK88. Foram selecionados da lagoa marginal dois pontos diferentes equidistantes entre si em 500 metros (P1 e P2) e coletadas as amostras de água, duas por período (chuvoso e seco). Para as coletas foram utilizados frascos de vidro borossilicato estéreis com capacidade de 500 mL (Figura 3), seguindo os procedimentos de coleta de amostras de água contidos no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (BRASIL, 2011).

Figura 3. Coleta de amostra de água em ambiente alagável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão



Fonte: Arquivo dos autores.

Todas as amostras foram acondicionadas ao abrigo de luz solar em caixas isotérmicas com gelo reciclável, sendo os respectivos vasilhames de coleta identificados com os dados da amostra (data e horário da coleta, número do ponto avaliado).

Foi utilizado para a quantificação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e *Escherichia coli* o sistema cromogênico enzimático (Colilert, Idexx, USA), por meio da utilização de substratos definidos (AOAC, 2003). De cada amostra colhida, 10 mL de água foi diluído em 90 mL de água destilada esterilizada e vertido em frascos esterilizados contendo o substrato. Em seguida, a solução foi distribuída em cartelas Quanti-Tray que foram seladas e incubadas em estufa a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$, por 24 horas. As análises microbiológicas foram executadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da UEMA.

A confirmação da presença de coliformes totais se deu pela alteração de cor da amostra de água de incolor para amarela. Enquanto a confirmação de *E. coli*, pela emissão da fluorescência azul da amostra quando exposta à luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm (IDEX Laboratories Inc.). Os resultados foram expressos em NMP/100mL da amostra sob análise, após conversão pelo fator de diluição, seguida da interpretação em tabela de conversão própria.

As análises físico-químicas complementares realizadas no Laboratório de Físico-química de Alimentos e Água da UEMA corresponderam aos seguintes parâmetros: alcalinidade em HCO_3^- , alcalinidade total, cloretos totais, sólidos totais dissolvidos (STD), nitrato, nitrito ferro e turbidez. Os métodos utilizados pelo referido laboratório estão descritos no livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; PASCUET, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos referentes as amostras de água analisadas estão discriminadas na Tabela 1. Os valores encontrados para os parâmetros temperatura, salinidade, nitrato e nitrito das amostras, em ambos os períodos, estão em consonância com aqueles da classe 2, determinados na Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005).

A faixa de variação do pH foi de $6,78 \pm 0,37$ no período chuvoso e $5,97 \pm 0,47$ no período seco. As pequenas variações constatadas nesse parâmetro químico, entre os períodos avaliados, podem ter origem natural ou antropogênica. Gasparotto (2011) pontua que para a adequada manutenção da vida aquática, o pH deve situar-se na faixa de 6 a 9.

Tabela 1. Resultados físico-químicos e microbiológicos de amostras de água provenientes de ambiente alagável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão

Parâmetros	Físico-químicos				VMP*
	Período chuvoso		Período seco		
	P01	P02	P01	P02	
pH	7,31	6,25	5,30	5,97	6,0 a 9,0
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	2,7	2,1	3,8	3,3	≥5
Temperatura (°C)	28,3	28,1	27,4	28,9	≤40
Condutividade (uS/cm)	184,7	184,1	95,6	347	NC
Salinidade (ppt)	0,09	0,09	0,16	0,16	<0,5
Alcalinidade em HCO ³⁻ (mg/L CaCO ₃)	36	30	10	134	NC
Alcalinidade total (mg/L CaCO ₃)	36	30	10	134	NC
Cloretos Total (mg/L Cl)	63,98	47,98	9,99	237,92	250
Sólidos Totais Dissolvidos (ppm)	1.475	1.473	1.417	2.078	500
Nitrato (mg/L)	3,24	2,75	10,00	9,16	10,0
Nitrito (mg/L)	0,025	0,025	1,00	0,45	1,0
Ferro (mg/L)	5,01	4,77	4,85	3,04	0,3
Turbidez (N.T.U)	218,66	210	127	85,6	≤100
Parâmetros	Microbiológicos				VPM*
	Período chuvoso		Período seco		
	P01	P02	P01	P02	
Coliformes Totais (NMP/100 mL)	17.329	8.164	241.960	8.664	NC
<i>Escherichia coli</i> (NMP/100 mL)	1.607	909	370,3	336	1.000

Onde: P01= Ponto 01 de coleta; P02= Ponto 02 de coleta; VMP= Valor máximo permitido; NC= Não consta

Referência: Resolução CONAMA nº 357/2005.

Os valores de oxigênio dissolvido (OD) e sólidos totais dissolvidos (STD), em ambos os períodos para as amostras analisadas, divergiram dos estabelecidos na legislação ambiental brasileira para corpos de água doce classe 2. Atribui-se os resultados obtidos, possivelmente, ao acúmulo de matéria orgânica oriunda dos lançamentos de resíduos e efluentes nas lagoas marginais, que não são completamente neutralizados durante o processo de autodepuração e pela baixa velocidade das águas nos pontos amostrados. Em uma análise comparativa dos parâmetros STD e pH, verifica-se que a concentração de sólidos não influenciou no valor de pH das duas amostras analisadas no período seco.

De acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, para se enquadrar corpos de água na classe 2, a turbidez deve apresentar o valor limite de unidade nefelométrica de até 100 (uT), portanto, observa-se que a faixa de variação desse parâmetro para o período chuvoso ($214,33 \pm 6,12$) e seco ($106,30 \pm 29,27$) estão acima do limite estabelecido na Resolução. Associa-se estes resultados à presença de partículas em suspensão, coloides e organismos microscópicos.

A legislação ambiental vigente não especifica valores máximos para condutividade e alcalinidade. Para o primeiro parâmetro, Gasparotto (2011) infere que em amostras muito contaminadas por esgotos, a condutividade pode variar de 100 a 10.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Ao se considerar como limite máximo 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para uma água de boa qualidade, pode-se constatar que a faixa de variação para o período chuvoso ($184,4 \pm 0,42$) e seco ($221,3 \pm 177,76$) refletem depreciação da condição química das amostras analisadas para esse parâmetro.

Para valores de nitrito observou-se em uma única amostra o valor máximo permitido. Para Kubitzka (2017), a presença do nitrito nos peixes afeta a proteína responsável pelo transporte de oxigênio para as células, tecidos e órgãos do corpo. Os valores de alcalinidade identificados no estudo, a exceção da amostra coletada do P1 no período seco, estão próximos das recomendações sugeridas por pesquisadores (MILLAN, 2009; MURGAS et al., 2009; LEIRA et al., 2017) e, portanto, considerados adequados. Leira et al. (2017) relatam que ao se analisar a água foram encontrados valores entre 20 a 300 mg/L de alcalinidade, isso indica boas quantidades de sais minerais para a piscicultura, como os carbonatos (CaCO_3) e bicarbonatos (HCO_3). Millan (2009) sugere para alcalinidade valores de 25 a 100 mg/L. Murgas et al. (2009) relatam que para esse parâmetro, valores inferiores a 50 mg/L de CaCO_3 tem pouco poder de tamponamento, podendo apresentar diversas e significativas flutuações nos valores de pH, a exemplo do observado na amostra supracitada.

Os valores de ferro identificados nas amostras analisadas, em ambos os períodos, estão acima do estabelecido na legislação vigente. Pontua-se que elevados teores de íons reduzidos de ferro na água rapidamente se oxidam quando em contato com o ar e formam precipitados de

hidróxido de ferro que são prejudiciais por impedir trocas gasosas e de metabólitos. O consumo excessivo de ferro pode causar hemocromatose, doença caracterizada por depósito deste metal em órgãos como fígado e favorece, ainda, o desenvolvimento de ferro-bactérias que conferem cor e odor à água. Quanto ao parâmetro cloreto total, em ambos os períodos, os valores identificados estavam abaixo do estabelecido na resolução vigente o que pode resultar em efeitos laxativos nos peixes.

Em ambos os períodos foram quantificadas elevadas populações de coliformes totais (CT) nas amostras analisadas (Tabela 1). Ressalta-se que a legislação vigente não determina VMP para CT. Mas para Liuson (2003), a quantificação dos coliformes totais serve como indicativo da qualidade higiênica e informa, ainda, sobre o grau de poluição microbiana a que estão expostos os peixes ao longo da cadeia produtiva. Para Souza et al. (2011), a presença de coliformes totais na água é considerada uma indicação útil de falhas higiênicas ao longo da criação ou deficiência nos tratamentos que visam eliminar esses micro-organismos contaminantes.

Na Resolução CONAMA 357/2005 é estabelecido para *E. coli* que em 80% ou mais, de pelo menos seis amostras coletadas durante um ano, não deverá ser excedido o limite de 1.000 NMP/100 mL. Apesar de não ter sido realizado o plano de amostragem estabelecido nesse ato normativo, os resultados microbiológicos evidenciam valores médios de *E. coli* acima do limite estipulado para o período chuvoso ($1.258 \pm 493,56$). No período seco, foram quantificadas populações que variaram de 370,3 a 336 NMP/100 mL, abaixo do limite estabelecido na legislação brasileira. Contudo, ressalta-se que a sazonalidade é considerada a principal variável influenciadora na degradação da qualidade microbiológica das águas superficiais, devido à intensificação do escoamento superficial, acentuando o transporte de partículas contaminadas por material fecal para os corpos d'água.

Melo (2006), em estudo realizado nas lagoas do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, quantificou populações de *E. coli* com valores superiores nos meses de maior índice pluviométrico. Drumond et al. (2018) em estudo realizado na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó na região do Alto Rio Doce para identificação molecular de *Escherichia coli* diarreiogênica em duas épocas do ano identificaram o gene de virulência Stx1 apenas na época de maior índice pluviométrico em dois dos 13 pontos amostrais.

Em uma análise comparativa entre o parâmetro físico turbidez e o microbiológico (coliformes totais e *E. coli*), verifica-se que a quantificação desses grupos de micro-organismos pode ter influenciado no valor de turbidez no período chuvoso. Scorsafava et al. (2010) destacam que a turbidez, medida pela transparência da água, é comumente utilizada para indicar

a presença de sólidos dissolvidos em suspensão ou material em estado coloidal, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, indica também risco de contaminação microbiológica, efetividade do tratamento e, podem estar relacionados com a elevada concentração de ferro. No presente estudo, os parâmetros STD, turbidez, ferro e *E. coli* estavam alterados e podem estar associados entre si, o que corrobora com as inferências dos referidos pesquisadores.

As lagoas marginais (campos inundáveis) de acordo com Agostinho et al. (2000), a exemplo da avaliada no estudo, apresentam grande importância na manutenção e integridade da biodiversidade regional, seja como criadouros naturais das espécies de importância comercial, na sua maioria migradores de longa distância, ou como habitat preferencial das espécies sedentárias e de pequeno porte, como as capturadas nesse estudo.

Na comunidade quilombola de Ponta Bonita, a economia se baseia na agricultura de subsistência, pecuária extensiva, extrativismo vegetal e na pesca artesanal. Esta última tem se mostrado fortemente impactada por mudanças sociais e ecológicas, pois, constata-se perda de espécies de peixes e de cardumes ano após ano, mesma situação citada por Amaral et al. (2015). Em grande parte do estado do Maranhão, além da existência de inúmeros impactos ambientais (desmatamento e poluição devido ao lançamento dos esgotos domésticos entre outros), cita-se, ainda, a criação e animais domésticos de interesse pecuário em condições sanitárias precárias, a exemplo de suínos, bubalinos e bovinos. Esses fatores, combinados ou não, podem ser responsáveis por danos irreparáveis à biodiversidade aquática.

CONCLUSÃO

Os resultados do estudo demonstram que ocorre depreciação ambiental da qualidade da água no tocante aos parâmetros físico (turbidez), químicos (Oxigênio Dissolvido, Sólidos Totais Dissolvidos, ferro e cloretos) e microbiológicos (coliformes totais e *E. coli*) das lagoas marginais. Pontua-se que tais impactos em algum momento podem contribuir para o estresse animal e, promover, queda na imunidade e predisposição a ocorrência de doenças de diferentes etiologias, com comprometimento da base da alimentação dos quilombolas da comunidade de Ponta Bonita.

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. A. et al. Biodiversity in the high Paraná River floodplain. In: GOPAL, B.; JUNK, W. J.; DAVIS, J. A. **Biodiversity in wetlands: assessment, function and conservation**, Backhuys Publishers: Leiden, The Netherlands. p.89-118. 2000.

ALMEIDA, Z. S. de. **Os recursos pesqueiros marinhos e estuarinos do Maranhão: biologia, tecnologia, socioeconomia, estado da arte e manejo**. 2008. 286 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2008.

ALMEIDA, M. C. P. O movimento quilombola na Baixada Ocidental Maranhense: história, memória e identidade de comunidades remanescentes de quilombos em Pinheiro. **In: XXVII Simpósio Nacional de História**, 1, 2013, Natal-RN. Anais. Natal-RN: ANPUH Brasil, 2013, p.1-13

AMARAL, M. T. et al. Aspectos relacionados à pesca artesanal do Rio Curiú e lago tapera, Macapá-AP. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11 n. 22, p. 2852-2861, 2015.

ARRUDA, J. C. et al. Conhecimento ecológico tradicional da ictiofauna pelos quilombolas no Alto Guaporé, Mato Grosso, Amazônia meridional, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 13, n. 2, p. 315-329, 2018.

BARROS, F. B. et al. A tradição da pesca no território Sesmaria do jardim, Maranhão: conflitos socioambientais e estratégias de mobilização. **Revista de Antropologia**, n. 53, p. 128-152, 2019.

BERNARDES, R. H. et al. A pesca artesanal: atividade integradora dos sistemas agroecológicos em comunidade quilombola na Amazônia Maranhense, Brasil. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução no 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 18 Mar. 2005. Seção Resoluções, p. 19, 2005.

BRASIL. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidas**.

2011. Disponível em:
http://www.clean.com.br/downloads/Guia_Nacional_de_Coleta_e_Preservacao_de_Amostras_.pdf. Acesso: 03 fev. 2022.

DIEGUES, A. C. Biodiversidade e comunidades tradicionais no Brasil. São Paulo: **NUPAUB**, 1999.

DRUMOND, S. N. et al. Identificação molecular de *Escherichia coli* diarreiogênica na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó na região do Alto Rio Doce. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, n. 3, p. 579-590, 2018.

GASPAROTTO, F. A. **Avaliação Ecotoxicológica e Microbiológica da água de nascentes urbanas no município de Piracicaba-SP**. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba.

KOPPEN, W. **Climatologia: com um estudio de los clima de la tierra**. México, Fondo de Cultura Economia, 1948. 478p.

KUBITZA, F. O impacto da amônia, nitrito e do nitrato sobre o desempenho e a saúde dos peixes e camarões. **Panorama da Aquicultura**, v. 27, n. 164, p. 1-15, 2017.

LEIRA, M. et al. Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. **Pubvet**, v. 11, n. 1, p. 11-17, 2017.

LIUSON, E. **Pesquisa de coliformes totais, fecais e *Salmonella* spp. em tilápias de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo**. 2003. 93 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2003.

MELO, S.K. **Caracterização de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de lagoas do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais**. 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

MILLAN, R. N. **Dinâmica da qualidade da água em tanques de peixes de sistema pesque-pague: aspectos físico-químico e plâncton**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). 2009. 100 f. Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal, São Paulo, 2009.

MONTELES, J. S.; FUNO, I. C. A.; CASTRO, A. C. L. Caracterização da pesca artesanal nos municípios de Humberto de Campos e Primeira Cruz – Maranhão. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, 23:65-74. 2010.

MURGAS, L. D. S. et al. Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, v. 6, p. 70-76, 2009.

NOGUEIRA, E. M. S.; PEREIRA DE SÁ, M. F.: A pesca artesanal no baixo São Francisco: Atores, Recursos, Conflitos. 1a. ed. Petrolina PE: **SABEH**, 2015.

NUNES, J. L. G. **Estimador da Produtividade para as Pescarias Artesanais do Rio Xingu**. Dissertação de mestrado. Belém, 2015.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC. 17a ed. Gaithersburg, USA, 2003.

PEREIRA, P. R. M.; RODRIGUES, T. C. S.; VIEGAS, J. C. Diagnóstico ambiental e caracterização morfométrica das Microbacias Hidrográficas de Pedro do Rosário, Amazônia Maranhense (Brasil). **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 3, n. 5, p. 153-163, 2016.

RAMIRES, M. et al. A pesca e os pescadores artesanais de Ilhabela (SP), Brasil. **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 231-246, 2012.

SCORSAFAVA, M. A. et al. Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 229-232, 2010.

SECRETARIA ESTADUAL EXTRAORDINÁRIA DE IGUALDADE RACIAL. **Governo participa de certificação de comunidades quilombolas em Anajatuba**. 2018. Disponível

em:[http:// www.igualdaderacial.ma.gov.br/governo-participa-de-certificacao-de-comunidades-quilombolas-em-anajatuba/](http://www.igualdaderacial.ma.gov.br/governo-participa-de-certificacao-de-comunidades-quilombolas-em-anajatuba/). Acesso: 03 fev. 2022.

SILVA JUNIOR, C. H. L. et al. Dinâmica das queimadas na Baixada Maranhense. **Interespaço**, Grajaú/MA, v. 2, n. 5, 2016.

SOUZA, G. M. D. de. et al. Análise da qualidade microbiológica da água, ao longo da cadeia produtiva de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), na região norte do estado do paraná. In: VII Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar (pp 1-5). Maringá. **Anais... Anais do VII EPCC**, 2011.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**, 4. ed, Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

1 7.2 Capítulo 2

2 MICROBIOLOGICAL FEATURING OF TWO NEOTROPICAL FISH SPECIES FROM THE 3 QUILOMBOLA AREA OF MARANHÃO STATE, BRAZIL¹

4 **ABSTRACT-** The aim of the current study is to feature the microbiological quality of two
5 neotropical fish species from the *quilombola* area of Maranhão State, Brazil. In order to do
6 so, 21 samples of *Hoplerythrinus unitaeniatus* and 21 samples of *Cichlasoma bimaculatum*
7 were captured in flooded environment. Collected fish were euthanized in laboratory
8 environment; muscle fragments were removed for microbiological analyses focused on
9 enumerating molds and yeasts, viable strict and facultative mesophilic microorganisms
10 and coagulase-positive staphylococci; on counting total and thermotolerant coliforms;
11 and on investigating *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. Microbiological results were
12 compared to the Brazilian legislation, which establishes the list of microbiological
13 standards for food products. Among the assessed fish, 9.52% were classified as non-
14 acceptable for human consumption, based on the *Salmonella* parameter. Enumerated
15 coagulase-positive staphylococci ranged from < 10 to 3.9 x 10⁴ CFU/g; 9.52% of assessed
16 fish were classified as having intermediate standard for human consumption, whereas
17 4.76% were classified as non-acceptable for such a purpose. *E. coli* counting ranged from
18 3.6 to > 1,100MPN/g; 4.76% of assessed fish were classified as having intermediate
19 standard for human consumption, whereas 4.76% were classified as non-acceptable for
20 such a purpose. Total and thermotolerant coliforms' counting and the enumeration of
21 viable strict and facultative aerobic microorganisms, as well as of molds and yeasts, have
22 evidenced high microbial population rates; this finding suggests poor hygienic conditions
23 at capture site, contaminated raw material and risk of incidence of enteropathogens.
24 Based on the current results, hygienic-sanitary indicator microorganisms addressed in
25 Brazilian legislation, microorganisms indicative of useful conservation time and
26 microorganisms indicating unsatisfactory hygienic conditions were identified in *H.*
27 *unitaeniatus* and *C. bimaculatum*. This finding has evidenced imbalance in the investigated
28 environment, as well as compromised aquatic biodiversity.

29 **Keywords:** traditional communities; fish; microbiology; indicator microorganisms.

¹Artigo aceito para publicação na revista Acta Veterinaria Brasilica, ISSN 1981-5484, Qualis Capes B1 (quadriênio 2017-2020).

30 **RESUMO** - Objetivou-se caracterizar a qualidade microbiológica de duas espécies de
31 peixes neotropicais oriundas de área quilombola maranhense, Brasil. Para isso, foram
32 capturadas 21 amostras de *Hoplerythrinus unitaeniatus* e 21 amostras de *Cichlasoma*
33 *bimaculatum* de ambiente alagável. No laboratório, os peixes foram eutanasiados,
34 procedida a retirada dos fragmentos musculares e realizada as análises microbiológicas:
35 enumeração de bolores e leveduras, micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e
36 facultativos viáveis e de estafilococos coagulase positiva, quantificação de coliformes
37 totais e termotolerantes, pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. Os resultados
38 microbiológicos obtidos foram comparados com a legislação brasileira que estabelece a
39 lista de padrões microbiológicos para alimentos. Dos peixes avaliados, 9,52% foram
40 considerados inaceitáveis para consumo humano para o parâmetro *Salmonella*. A
41 enumeração de estafilococos coagulase positiva variou de <10 a $3,9 \times 10^4$ UFC/g, sendo
42 9,52% dos peixes considerados com padrão intermediário e 4,76% inaceitáveis para
43 consumo. A quantificação de *E. coli* variou de 3,6 a >1.100 NMP/g, sendo 4,76%
44 considerados com padrão intermediário e 4,76% inaceitáveis para consumo. A
45 quantificação de coliformes totais e termotolerantes e a enumeração de micro-
46 organismos aeróbios estritos e facultativos viáveis e bolores e leveduras revelou elevadas
47 populações microbianas o que sugere más condições higiênicas do local de captura,
48 matéria-prima contaminada e risco da presença de enteropatógenos. Com base nos
49 resultados obtidos conclui-se que nos *H. unitaeniatus* e *C. bimaculatum* foram
50 identificados micro-organismos indicadores higiênico-sanitários que figuram na
51 legislação brasileira, micro-organismos indicadores do tempo útil de conservação e
52 micro-organismos indicadores de condições higiênicas insatisfatórias, demonstrando
53 desequilíbrio no ambiente estudado com comprometimento da biodiversidade aquática.

54 **Palavras-Chave:** comunidades tradicionais; pescado; microbiologia; micro-organismos
55 indicadores.

56

57

INTRODUCTION

58 Fishing and aquaculture in Maranhão State are important activities providing animal
59 protein of high biological value for human consumption (MONTELES; FUNO; CASTRO,
60 2010). Western Maranhão State' Lowland stands out among areas with the highest fish
61 production in the State; this region comprises a hydrographic system integrated by a set

62 of rivers, lakes and floodplains, which gives it the status of the largest lacustrine basin in
63 Northeastern Brazil (PEREIRA; RODRIGUES; VIEGAS, 2016).

64 Western Maranhão State's Lowland hosts several traditional *quilombola* communities for
65 whom artisanal fishing is an important practice, based on traditional empirical
66 knowledge, which provides relevant protein source throughout the year (BERNARDES;
67 BOTELHO; MOTTA NETO, 2011). *Cichlasoma bimaculatum* (black acara) and
68 *Hoplerhythrinus unitaeniatus* (trahira) are important fishing-based food resources for
69 *quilombola* communities living in Maranhão State (VIANA et al., 2014). Both species are
70 often found in shallow-water environments and close to submerged or marginal
71 vegetation (LEAL et al., 2010; FROESE; PAULY, 2016).

72 However, artisanal fishing in Maranhão State has been strongly affected by social and
73 ecological changes, which result in loss of fish species on a yearly basis. In addition to
74 several environmental impacts – such as deforestation and pollution due to domestic
75 sewage discharge, among others – experienced by the aforementioned state, it is worth
76 emphasizing domestic and livestock animals' breeding under precarious sanitary
77 conditions, such as pigs, buffaloes and cattle, which can host bacterial etiological agents
78 (DE JESUS et al., 2022).

79 Despite fish's unquestionable benefits to human health, and the fact that they integrate
80 the food culture of different peoples (SARTORI; AMANCIO, 2012), fish are quite
81 susceptible to the action of viruses, fungi, parasites and bacteria capable of putting both
82 animal and human health at risk, since many of these agents are potentially zoonotic
83 (OLIVEIRA, 2005).

84 According to the historical series conducted by the Health Surveillance Secretariat (SVS -
85 Secretaria de Vigilância em Saúde) of the Brazilian Ministry of Health (MS - Ministério da
86 Saúde), 469,482 individuals were reported to have been exposed to water- and foodborne
87 diseases (WFBD) in Brazil, from 2007 to 2016; 118,104 of them got sick and 109 have
88 died (BRASIL, 2018). However, one must take into consideration that national data are
89 underestimated, since not all exposed individuals are located for epidemiological studies.
90 In addition, there is clear underreporting of WFBD events in the country (FAULA;
91 SOARES; DIAS, 2015). This underreporting issue becomes even more worrying in specific

92 social groups and subgroups, who live in environments subjected to inappropriate
93 sanitary conditions, who are occasionally concentrated in ethnically diverse populations
94 and who experience lack of public services, such as *quilombola* communities.

95 The aforementioned historical series has shown that 90.5% of etiological agents involved
96 in WFBD outbreaks were of the bacterial type; 70.3% of them accounted for unidentified
97 bacterial species, 7.5% were *Salmonella* spp., 7.2% were *Escherichia coli* and 5.8% were
98 *Staphylococcus aureus*. With respect to contaminated food types, fish, seafood and
99 processed food accounted for 0.8% of reported outbreaks, although 66.8% of cases were
100 classified as unidentified-origin food, whereas 9% were mixed-nature food (BRASIL,
101 2018). In light of the foregoing, the aim of the current study was to feature the
102 microbiological quality of two neotropical fish species from the *quilombola* area of
103 Maranhão State, Brazil.

104

MATERIALS AND METHODS

105 **Research Ethics**

106 The current research was approved by the Animal Ethics and Experimentation Committee
107 (CEEA - Comitê de Ética e Experimentação Animal) of State University of Maranhão
108 (UEMA - Universidade Estadual do Maranhão), under protocol n. 08/2021. It was carried
109 out in compliance with Resolutions n. 879/2008 and 1000/2012 by the Federal Council
110 of Veterinary Medicine (CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária) and with
111 Federal Law n. 11794/2008, which provide on Ethical procedures in Animal
112 Experimentation.

113

114 **Study Site**

115 The study site comprised a lake region located in the rural area of Anajatuba County,
116 Maranhão State. The aforementioned county belongs to Maranhão State's Lowland region
117 and it is located between the following geographic coordinates: Latitude 03°15'50" S and
118 Longitude 44°37'12" W.

119 Humid tropical climate, with dry winter season, prevails in this region: overall, the dry season
120 in it lasts from six to seven months; among them, three to four months are extremely dry, since
121 they record less than 8% rainfall on a daily basis. On the other hand, the rainy season lasts from

122 five to six months; at least two months can be considered very rainy, since they record more
123 than 30% of the region's total annual rainfall rate (CUNHA; SILVA, 2002).

124 **Fish Sample Collection**

125 Local fishermen collected the assessed fish in marginal lakes (flooded environment) of
126 Ponta Bonita community, in September 2021 (dry season) and February 2022 (rainy
127 season). Forty-two fish specimens were captured - 21 individuals belonged to species *H.*
128 *unitaeniatus* (jeju) and 21, to species *C. bimaculatum* (black acara) – based on using
129 actively operated (drag/siege) 4-mesh (20 mm) gillnet and 4-mesh (20 mm) casting net,
130 based on Silva et al. (2022).

131

132 Then, fish were packaged and transported alive in styrofoam box filled with water from
133 the capture environment to UEMA's Aquatic Resources Reproduction Laboratory
134 (LARAQUA - Laboratório de Reprodução de Recursos Aquáticos), where they were placed
135 in a tank filled with water, under constant oxygenation, for 12 hours, until further
136 biological material analysis and processing in the Food and Water Microbiology
137 Laboratory of the Agricultural Sciences Center – CCA/UEMA.

138

139 **Biological Material Processing: euthanasia and muscle fragment collection**

140

141 Fish were euthanized by perforating the upper part of their heads with pointed
142 instrument (scalpel blade). Subsequently, all 42 specimens were aseptically dissected in
143 order to have their longitudinal skeletal striated muscles (dorsal and ventral muscles)
144 removed to enable collecting muscle fragments.

145 **Laboratory Procedures**

146 Initially, 25 ± 0.2 g of each sample were weighed and added to 225 mL of 0.1% buffered
147 peptone water for fish's microbiological analysis; it corresponded to the first dilution (10^{-1}).
148 Subsequently, two other successive dilutions (10^{-2} and 10^{-3}) were prepared in test
149 tubes filled with 9 ml of 0.1% buffered peptone water.

150 Microbiological featuring was performed by enumerating molds and yeasts, as well as
151 viable strict and facultative mesophilic aerobic microorganisms and coagulase-positive

152 staphylococci, by counting total and thermotolerant coliforms, and by investigating
153 *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. All analyses were conducted based on procedures and
154 recommendations by the American Public Health Association (DOWNES; ITO, 2001).

155 **Enumerating molds and yeasts**

156 The herein adopted technique comprised deep plating of 1 mL of serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2}
157 and 10^{-3}), based on using Potato Dextrose Agar (PDA) acidified with 10% tartaric acid
158 solution. After the procedure was over, plates were incubated in oven at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, for
159 five (05) days. Results were expressed as colony forming units (CFU) per gram.

160 **Enumerating viable strict and facultative mesophilic aerobic microorganisms**

161 The herein adopted technique comprised deep plating of 1 mL of serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2}
162 and 10^{-3}), based on using Plate Count Agar (PCA). It was followed by plates' incubation
163 (in inverted position) in bacteriological oven at $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, for 48 ± 2 h. Only plates
164 presenting from 30 to 300 colonies were taken into consideration for counting; their
165 arithmetic mean was multiplied by the respective dilution factor; results were expressed
166 as Colony Forming Units/g of sample (CFU/g).

167 **Enumerating coagulase-positive staphylococci**

168 Coagulase-positive staphylococci analysis was performed by inoculating 0.1 ml of each
169 dilution (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) in Baird-Parker Agar (BP), based on surface scattering
170 technique. Then, plates were incubated (in inverted position) at 37°C , for 24-48h. Plates
171 holding 30 to 300 colonies were selected and five typical (black or gray, convex, with
172 opaque/clear zone around them) and atypical staphylococci colonies were selected for
173 Gram, catalase and coagulase tests.

174 Selected colonies were incubated in test tubes filled with 2 mL of brain-heart infusion
175 (BHI) broth, incubated at 37°C , for 24 hours, and subjected to coagulase test. Their plasma
176 clotting ability was confirmed based on coagulase enzyme activity.

177 **Counting total and thermotolerant coliforms**

178 Multiple tubes' technique was used to count total and thermotolerant coliforms. In order
179 to do so, 1-mL aliquots of each dilution were inoculated in a series of three inverted
180 Durham tubes filled with 9 mL of Lauryl Sulfate Tryptose (LST) broth. The aforementioned
181 tubes were incubated at 35°C, for 24-48 hours. A view of each positive tube (turbidity and
182 visible gas formation in the Durham tube) was transferred to tubes filled with Brilliant
183 Green (BG) and *Escherichia coli* (EC) broths, which were incubated at 35°C and 45°C,
184 respectively, both for 24-48 hours. The number of positive tubes was recorded and MPN
185 was determined based on a table suitable for the adopted dilutions; results were
186 expressed as MPN of total and thermotolerant coliform/g.

187 **Investigating *Escherichia coli***

188 *E. coli* was investigated based on its isolation and confirmation through conventional
189 methodology, as described below:

190 **1. First stage: enriching the samples**

191 Bacterial inocula from each positive EC tube were inoculated in MacConkey Agar (MCK). The
192 culture was incubated at 37°C, for 24 hours. All colonies showing different morphotypes, and
193 five colonies (at most) with the same morphotype, were transferred from the representative
194 plates. Each colony was inoculated in Trypticase Soy Agar (TSA), as well as in brain-heart
195 broth (BHI), and incubated at 37°C, for 24 hours.

196 **2. Second stage: identifying the isolated colonies**

197 The identification of species *E. coli* in each pure culture was confirmed through the following
198 biochemical-physiological tests: (i) glucose-based gas production; (ii) lactose fermentation; (iii)
199 lysine decarboxylation; (iv) tryptophan-based indole production; (v) non-degradation of urea;
200 and, (vi) lack of hydrogen sulfide production from sulfur amino acids, based on using Rugai's
201 medium modified by Pessoa and Silva (1972). In addition, Methyl Red (MR) and Voges
202 Proskauer (VP) biochemical tests were carried out.

203 **Investigating *Salmonella* sp.**

204 Samples held in 225 ml of 0.1% buffered peptone water were incubated at 37°C, for 24
205 hours, to investigate the incidence of *Salmonella* sp. These samples were transferred to

206 two different selective enrichment broths (Rappaport-Vassiliadis and Tetrathionate-
207 Novobiocin) and incubated at 37°C and 42°C, for 24 hours, respectively. Subsequently,
208 each sample was seeded in Petri dishes covered with Hektoen Enteric Agar (HE Agar) and
209 xylose lysine deoxycholate (XLD), and incubated at 37°C, for 24 hours. Typical colonies
210 formed on the plates were confirmed based on biochemical and serological tests. Initially,
211 colonies were subjected to the following tests: lysine decarboxylation, lactose and/or
212 sucrose fermentation and H₂S production, in Lysine Iron (LIA) and Triple Sugar Iron (TSI)
213 Agars. Cultures typical of genus *Salmonella* in these media were subjected to agglutination
214 test based on using polyvalent anti-Salmonella serum.

215 **Data analysis**

216 Laboratory results were processed and interpreted, stored in database, sorted and
217 presented in tables to enable better visualizing the set of variables. Descriptive statistical
218 analysis was also performed to find absolute and relative frequencies. Fisher's test was
219 carried out in InStat free software to check whether there were significant differences (at
220 5% significance level) in microbiological contamination between assessed periods and
221 sampled species.

222 **RESULTS AND DISCUSSION**

223 **Hygienic-sanitary indicator microorganisms addressed in Brazilian legislation**

224 Normative Instruction (NI) n. 60 by the National Health Surveillance Agency (ANVISA),
225 from December 23rd, 2019, provides on the microbiological quality standard for food
226 products and determines that for raw fishery (fish, crustaceans and mollusks) and giblets
227 (roe, gizzard, swim bladder) - be them seasoned or not, fresh, chilled or frozen - to be
228 acceptable for consumption, they must meet the microbiological criterion, according to
229 which, 25 grams of the analyzed sample cannot present *Salmonella* sp. (BRASIL, 2019).
230 Based on this criterion, 90.74% (n= 38/42) of the analyzed fish were acceptable for
231 human consumption, whereas 9.52% (n= 04/42) were non-acceptable for such a purpose
232 (Table 1).

233 Table 1. Investigating the incidence of *Salmonella* sp. in 21 *Cichlasoma bimaculatum* and 21
 234 *Hoplerythrinus unitaeniatus* individuals from wetland environment in Ponta Bonita
 235 Quilombola Community, Anajatuba County, Maranhão State.

Microbiological Standard	Fish Species				Total
	<i>Cichlasoma bimaculatum</i>		<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>		
	RS	DS	RS	DS	
Acceptable (Lack of <i>Salmonella</i> /25g)	17	02	02	17	38
Non-acceptable (Incidence of <i>Salmonella</i> /25g)	01	01	01	01	04
Total	18	03	03	18	42

236 Wherein: n = number of samples; RS= rainy season; DS= dry season;
 237 Microbiological Standard = Normative Instruction n. 60/2019 by National Health
 238 Surveillance Agency.

239 Current findings are worrisome, since *Salmonella* incidence in food products is a
 240 significant epidemiological factor for WFBD outbreaks. According to the European Food
 241 Safety Authority (EFSA, 2010), a large number of salmonellosis cases can affect public
 242 health in developed and developing countries where this disease is featured as emerging
 243 issue. According to Huber et al. (2004), species belonging to family Enterobacteriaceae,
 244 such as *Salmonella*, stand out among bacterial agents distributed in aquatic ecosystems.
 245 Based on on-site visits to the place where the assessed fish were captured, as well as on
 246 monitoring the procedure adopted to remove specimens from marginal lakes, the
 247 contamination of four samples with *Salmonella* is attributed to the environment, since
 248 different wild, domestic and livestock species lived in the assessed area. Therefore, these
 249 animals' waste contributes to pollute the lake environment and they can be the source of
 250 the observed contamination.

251 *Salmonella* has been the target of studies conducted with fish in different countries, due
 252 to its relevance for public health. Hughes; Gillespie; O'Brien (2007) conducted a survey in
 253 England, between 1992 and 2003, to investigate intestinal infection outbreaks associated

254 with food. Results have shown that this bacterial agent accounted for 53% of infection
255 cases and that approximately 6% of the total number of cases was associated with fish
256 and fish-product intake. Given the frequent series of salmonellosis cases associated with fish
257 intake, EFSA (2010) reported that this fishery type is a relevant vehicle for *Salmonella*
258 contamination, as well as emphasized its prevalence values in the following countries: Belgium
259 (14.3%); Spain (1.6%), Italy (1.2%), Greece (0.9%) and Germany (0.5%).

260 Study conducted by Bouchrif et al. (2009) in Morocco, Africa, has shown that fish recorded
261 the second largest number of positive samples for *Salmonella* among several analyzed
262 food products. Based on the study carried out by Nadimpalli et al. (2019) in Cambodia,
263 Asia, ten (10/60) *Salmonella* samples were isolated from raw fish meat sold in two public
264 markets.

265 This bacterium accounts for 800 thousand to 4 million cases of infectious diseases in the
266 United States of America (USA), on a yearly basis (GAZAL et al., 2018). Scallan et al. (2011)
267 collected data on foodborne diseases recorded between 2000 and 2008; non-typhoid
268 *Salmonella* spp. accounted for approximately 35% of hospitalizations and for 28% of
269 death cases.

270 According to Fernandes et al. (2018), most fish intake-associated salmonellosis cases
271 observed in humans are caused by serovar *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*, serovar
272 Typhimurium *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, and serovar Enteritidis. *Salmonella*
273 prevalence in freshwater fish ranges from 3.4% to 64%, depending on the quality of water
274 and on good production practices. Therefore, the prevalence value identified in the
275 present study (9.52%) is in compliance with reports in the aforementioned studies.

276 According to the microbiological criterion for coagulase-positive staphylococci
277 enumeration, the Brazilian legislation sets values ranging from 10^2 to 10^3 CFU/g (BRASIL,
278 2019). Based on this criterion, the enumeration of this sanitary indicator in the current
279 study ranged from < 10 to 3.9×10^4 CFU/g in the assessed fish; 85.71% (n= 36/42) of fish
280 were acceptable for human consumption, 9.52% (n= 04/42) presented intermediate
281 standard, and 4.76% (n=02/42) were considered non-acceptable for human consumption
282 (Table 2).

283 Table 2. Coagulase-Positive Staphylococci enumeration in 21 *Cichlasoma bimaculatum* and
 284 21 *Hoplerythrinus unitaeniatus* individuals from wetland environment in Ponta Bonita
 285 Quilombola Community, Anajatuba County, Maranhão State.

Microbiological Standard	Fish Species				Total
	<i>Cichlasoma bimaculatum</i>		<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>		
	RS	DS	RS	DS	
Acceptable ($\leq 10^2$ UFC /g)	16	02	01	17	36
Intermediary (10^2 UFC /g to 10^3 UFC /g)	01	01	01	01	04
Non-acceptable ($> 10^3$ UFC /g)	01	00	01	00	02
Total	18	03	03	18	42

286 Wherein: n = number of samples; RS= rainy season; DS= dry season; CFU= Colony
 287 Forming Unit; Microbiological Standard = Normative Instruction n. 60/2019 by
 288 National Health Surveillance Agency.

289 According to Novotny et al. (2004), there is high coagulase-positive staphylococci
 290 incidence in fish sold in Brazil. Costa et al. (2018) conducted a study focused on
 291 investigating the resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from *Cynoscion*
 292 *acoupa* (blacktail basher) sold at a public fair in Macapá City – Amapá State; they identified
 293 this group of microorganisms in 75% (n=15/20) of the analyzed samples. Silva Junior et
 294 al. (2015) have analyzed *Cynoscion* sp. (“*pescada branca*”) sold at Perpétuo Socorro fair,
 295 Macapá City, Amapá State; they found coagulase-positive staphylococci in 50% of the
 296 analyzed samples.

297 Coagulase-positive staphylococci incidence in 14.28% of the analyzed fish samples (n=
 298 06/42 total number of samples with intermediate and non-acceptable microbiological
 299 standard) may be associated with poor hygienic practices (equipment and utensils), with
 300 incorrect handling by local fishermen during fish capture and removal from fishing gear,
 301 as well as with local environmental conditions. Sales; Silva (2012) have pointed out that
 302 coagulase-positive staphylococci are often found in humans’ skin and mucous

303 membranes, whereas Plata; Rosato; Wegrzyn (2009) reported that from 20% to 30% of
304 the world population overall carries this pathogen.

305 All four samples showing intermediate microbiological standard, as well as the two
306 samples showing non-acceptable standard, have evidenced a worrisome situation, since
307 coagulase-positive staphylococci produce thermostable enterotoxins in food products.
308 Food products with intermediate microbiological profile require more rigorous
309 processing - in terms of cold storage methods and cooking techniques - to avoid microbial
310 multiplication and survival (CHAVES et al., 2015). Hygiene - both for fishermen/handlers
311 and for utensils and equipment used to catch fish (fishing gear) - is another aspect that
312 must be taken into account to avoid recontamination with these microorganisms.

313 Staphylococci contamination in fish is often attributed to factors external to animals
314 (environment, water, personnel involved in the captures, equipment and utensils in direct
315 contact with specimens). However, Ali (2014) has reported incidence of this
316 microorganism in *Cyprinus carpio* (common carp) and *Sirlus glanis* (wels catfish) skin,
317 liver, intestines and muscles. Coagulase-positive staphylococci were isolated from
318 skeletal striated muscles of specimens investigated in the current study.

319 With respect to microbiological criterion "counting *Escherichia coli*", Brazilian legislation
320 establishes values ranging from 50 to 5×10^2 MPN of *Escherichia coli*/g for products that
321 are not consumed raw (BRASIL, 2019), as the ones assessed in the current study. Values
322 recorded for this health indicator ranged from 3.6 to > 1,100 MPN/g in the analyzed fish;
323 90.48% (n= 38/42) of fish were acceptable for human consumption, 4.76% (n= 02/42)
324 presented intermediate standard and 4.76% (n= 02/42) were considered non-acceptable
325 for human consumption (Table 3).

326

327

328

329 Table 3. Counting *Escherichia coli* in 21 *Cichlasoma bimaculatum* and 21 *Hoplerythrinus*
 330 *unitaeniatus* individuals from flooded environment in Ponta Bonita Quilombola
 331 Community, Anajatuba County, Maranhão State.

Microbiological Standard	Fish Species				Total
	<i>Cichlasoma bimaculatum</i>		<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>		
	RS	DS	RS	DS	
Acceptable (< 50 MPN/g)	16	03	02	17	38
Intermediary (< 50 to 5×10^2 MPN/g)	00	00	01	01	02
Non-acceptable (5×10^2 MPN/g)	02	00	00	00	02
Total	18	03	03	18	42

332 Wherein: n = number of samples; RS= rainy season; DS= dry season; MNP= Most Probable
 333 Number; Microbiological Standard = Normative Instruction n. 60/2019 by National
 334 Health Surveillance Agency.

335 *E. coli* found in 9.52% of analyzed fish samples (total number of samples with
 336 intermediate and non-acceptable microbiological standard) may be associated with
 337 conditions of the aquatic habitat where the analyzed specimens were captured. According
 338 to Barbosa et al (2010), the incidence of this microorganism, even at low concentrations,
 339 indicates risk of pathogen transmission to humans.

340 Laboratory analysis of *E. coli* helps finding potential risk of food poisoning through water
 341 and food provided for consumption purposes. Thus, the meaning attributed to the
 342 incidence of *E. coli* in 9.52% of samples analyzed in the current study must be addressed
 343 based on two basic premises, according to Franco; Landgraf (2002): (i) it indicates
 344 microbial contamination of fecal origin and, therefore, unsatisfactory sanitary conditions
 345 at capture place; and, (ii) these bacteria can integrate pathogenic/diarrheagenic to
 346 humans and animals.

347 Based on the aforementioned aspects and on the analysis of indicators and criteria
348 established in NI 60/2019, in comparison to Collegiate Board of Directors' (RDC -
349 Resolução da Diretoria Colegiada) Resolution n. 12/2001 (legislation that previously
350 regulated microbiological standards for food), it is possible noticing that standards set for
351 fresh fishery are stricter and require important changes, such as: (i) histamine test for
352 raw fish, crustaceans, mollusks and giblets (roe, gizzard and swim bladder), be them
353 seasoned or not, fresh, cooled or frozen; and, (ii) analysis of *E. coli* to the detriment of
354 counting thermotolerant coliforms. With respect to this last parameter, fecal
355 contamination in food is indicated through *E. Coli* counting, hence the current
356 requirement in Brazilian legislation.

357 Therefore, animal excreta contaminating the environment can pollute the water in
358 aquatic ecosystems and reach fish living in them. These fish, in their turn, can emerge as
359 potential routes of pathogenic agents' transmission to humans, since salt or fresh water
360 is the natural environment of a wide variety of bacteria capable of causing infections in
361 humans, although such a potential depends on isolated or synergistic factors like
362 organism's survival, latency and infective dose, and host's susceptibility to harm both
363 animal and human health, due to incidence of undesirable pathogens, as mentioned by
364 Barbosa et al. (2010).

365 There was no statistically significant difference in microbiological contamination with the
366 three groups of hygienic-sanitary indicator microorganisms addressed in the Brazilian
367 legislation between the two investigated fish species and the assessed seasons. Therefore,
368 it is possible saying that bacterial infections affecting fish are a challenge, regardless of
369 the season, due to the complexity of factors involved in it, i.e., those inherent to the hosts
370 (age, immunological status, intercurrent diseases, among others), to bacterial agents
371 (species and pathogenicity), or to the environment (climate, local hygiene, biosecurity,
372 reservoirs, among others).

373 **Microorganisms indicative of useful shelf life and unsatisfactory hygienic** 374 **conditions**

375 With respect to results recorded for microorganisms indicating conservation time,
376 45.23% (n= 19/42) of assessed specimens presented molds and yeasts' values ranging

377 from 1.5×10^3 to 4.54×10^3 CFU/g, whereas 66.67% (n= 28/42) presented viable strict
378 and facultative aerobic microorganisms in bacterial populations ranging from 816 to 3.9
379 $\times 10^4$ CFU/g. As for results recorded for microorganisms indicating unsatisfactory
380 hygienic conditions, total coliforms were found in 66.67% (n= 28/42) of analyzed
381 specimens, whereas thermotolerant coliforms were found in 42.86% (n= 18) of them -
382 values ranged from 3.0 to > 1,100 MPN/g.

383 Although the Brazilian legislation lacks fish-related information regarding the limits of
384 counts tolerated for both organism groups (indicators of storage time and unsatisfactory
385 hygienic conditions), results in the current study suggested poor hygienic conditions of
386 the place, contaminated raw material, as well as risk of incidence of fecal-origin pathogens

387 Pathogenic agents transmitted from fish to humans do not often cause damage to fishery
388 and aquaculture production. Therefore, fishermen and/or producers do not feel
389 encouraged to seek adequate sanitary control to ensure the quality of the raw material.
390 However, contaminated fish can work as transmission route for these agents when they
391 are consumed by humans, as well as contaminate other food types and surfaces
392 (BARBOSA et al., 2010) and onset food outbreaks. This issue becomes even more
393 worrisome in specific social groups, who live in environments subjected to inappropriate
394 sanitary conditions, who are occasionally concentrated in ethnically diverse populations
395 and who experience lack of public services.

396 The incidence of pathogens is one of the main hazards compromising the quality of fishery
397 products. Such an incidence is associated with improper breeding practices, environmental
398 pollution, improper handling (poor water quality, lack of hygienic care with fish, equipment
399 and utensils, and lack of knowledge), as well as with direct input of feces from animals (poultry,
400 swine, cattle, dogs and cats) living close to fishing sites (MORITA et al., 2006).

401

CONCLUSIONS

402 Based on the current findings, it was possible concluding that the microbiological
403 featuring of *H. unitaeniatus* and *C. bimaclatum* has evidenced: (i) hygienic-sanitary
404 indicator microorganisms addressed by Brazilian legislation – *Salmonella* sp., *Escherichia*
405 *coli* and coagulase-positive staphylococci; (ii) microorganisms indicative of useful shelf
406 life - viable strict and facultative aerobic mesophiles, and molds and yeasts; and (iii)

407 microorganisms indicative of unsatisfactory hygienic conditions – total and
408 thermotolerant coliforms. The incidence of these agents has shown imbalance in the
409 investigated environment and impaired aquatic biodiversity. Therefore, it is essential
410 conducting studies of this nature to contribute to the adoption of management measures
411 aimed at avoiding irreparable damage to aquatic ecosystems and the depreciation of
412 *quilombola* communities' dietary base.

413

REFERENCES

414 ALI, H. H. Isolation and identification of *Staphylococcus* bacteria from fish of freshwater
415 and its antibiotics sensitivity in mosulcity. **Basrah Journal of Veterinary Research**, v. 1,
416 p. 33-42, 2014.

417 BARBOSA, M. M. C. et al. **Ocorrência de *Escherichia coli* patogênicas em pesque-**
418 **pagues.** 2010. Available at: chrome-
419 extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2
420 Fwww.iwra.org%2Fmember%2Fcongress%2Fresource%2FPAP00-
421 4851.pdf&clen=253099&chunk=true. Access on Feb. 22nd, 2022.

422 BERNARDES, R. H.; BOTELHO, A. C. B.; MOTTA NETO, J. A. A pesca artesanal: atividade
423 integradora dos sistemas agroecológicos em comunidade quilombola na Amazônia
424 Maranhense, Brasil. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.

425 BOUCHRIF, B. et al. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food
426 in Morocco. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 28, n. 3, p. 35-40, 2009.

427 BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância**
428 **Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos VE-DTA.** Brasília, 2018.
429 Available at:
430 [https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-](https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf)
431 [Surtos-DTA-Junho-2018.pdf](https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf). Access on Feb. 22nd, 2022.

432 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de
433 dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos.
434 **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 de dezembro de

- 435 2019. Available at: [www.cvs.saude.sp.gov.br/zip > U_IN-MS-ANVISA-60_231219](http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/U_IN-MS-ANVISA-60_231219). Access
436 on Feb. 22nd, 2022.
- 437 CHAVES, N. P. et al. Condições higiênico-sanitárias da bebida guaraná da Amazônia
438 comercializada por vendedores ambulantes na cidade de São Luís, MA. **Arquivos do**
439 **Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-7, 2015.
- 440 COSTA, A. L. P. da. Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de pescada
441 amarela (*Cynoscionacoupa*) comercializada em feira pública. **PUBVET**, v. 12, n. 5, p. 1-6,
442 2018.
- 443 CUNHA, H. W. A. P.; SILVA, A. C. da. Caracterização socioambiental do rio mearim na cidade
444 de Arari – MA. **Revista Ecosystema**, v. 27, n. 1-2, p. 31-36, 2002.
- 445 DE JESUS, G. dos S. et al. Qualidade ambiental de água oriunda de lagoas marginais
446 utilizadas para fins de pesca artesanal em Comunidade Quilombola Maranhense. In:
447 CASTRO, A. C.; CARVALHO, A. C.; CARVALHO, A. V. (Org.). **Meio ambiente e a outra**
448 **economia dos povos e comunidades tradicionais**. Guarujá: Científica Digital, 2022. p.
449 61-72.
- 450 DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination**
451 **of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.
- 452 EFSA. European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and
453 Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union
454 in 2008. **European Food Safety Authority Journal**, v. 8, n. 1, p. 1496, 2010. 368p.
- 455 FAÚLA, L. L.; SOARES, A. C. C.; DIAS, R. S. Panorama dos Surtos de Doenças de Transmissão
456 Alimentar, ocorridos em Minas Gerais, Brasil, no período de 2010 a 2014. **Gerais: Revista**
457 **de Saúde Pública do SUS/MG**. v.3, n.1, p.84-94, 2015.
- 458 FERNANDES, D. V. G. S. et al. *Salmonella* spp. in the fish production chain: a review. **Ciência**
459 **Rural**, v. 48, n. 8, p. 1-11, e2018141, 2018.
- 460 FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu, São
461 Paulo. 2002. 182 p.

- 462 FROESE, R.; PAULY, D. Editors. **FishBase**. 2016. World Wide Web electronic publication.
463 Available at: <http://www.fishbase.org>. Access on: Feb.17th, 2022.
- 464 GAZAL, L. E. de S. et al. *Salmonella* sp. em peixes – qual a importância para sanidade em
465 pescado? Pesquisa Agropecuária Gaúcha, v. 24, ns.1/2, p. 55-64, 2018.
- 466 HUBER, I. et al. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial
467 community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal Applied**
468 **Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 117-132, 2004.
- 469 HUGHES, C.; GILLESPIE, I. A.; O'BRIEN, S. J. Foodborne transmission of infectious intestinal
470 disease in England and Wales, 1992–2003. **Food Control**, v. 18, n. 7, p. 766-772, 2007.
- 471 LEAL, M. E. et al. Primeiro registro e aspectos ecológicos de *Hoplerythrinus unitaeniatus*
472 (Agassiz, 1829) (Characiformes, Erythrinidae) como espécie introduzida na Bacia do Rio
473 dos Sinos, RS, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 33-37, 2010. 10.1590/S1676- 313
474 06032010000300002
- 475 MONTELES, J. S.; FUNO, I. C. A.; CASTRO, A. C. L. Caracterização da pesca artesanal nos
476 municípios de Humberto de Campos e Primeira Cruz – Maranhão. **Boletim do**
477 **Laboratório de Hidrobiologia**, v. 23, p. 65-74. 2010.
- 478 MORITA, M. et al. **Utilização de indicadores bacterianos e a pesquisa de *Salmonella***
479 **spp. na avaliação da qualidade sanitária de águas de pesqueiros**. In: ESTEVES, K. E;
480 SANT'ANNA, C. L. Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e
481 manejo. 1 ed. São Carlos: RIMA, 2006, p. 91-104.
- 482 NADIMPALLI M. *et al.* Meat and fish as sources of extended-spectrum β -lactamase-
483 producing *Escherichia coli*, Cambodia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 1, p. 126-
484 131, 2019.
- 485 NOVOTNY, L. et al. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. A
486 review. **Veterinárni Medicína**, v. 49, p. 343-358, 2004.

- 487 OLIVEIRA, S. A. L. **Pesquisa de helmintos em musculatura e serosa abdominal de**
488 **peixes de importância comercial capturados no litoral norte do Brasil.** 2005. 70 f.
489 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Pará, Belém, 2005.
- 490 PEREIRA, P. R. M.; RODRIGUES, T. C. S.; VIEGAS, J. C. Diagnóstico ambiental e
491 caracterização morfométrica das Microbacias Hidrográficas de Pedro do Rosário,
492 Amazônia Maranhense (Brasil). **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e**
493 **Sustentabilidade**, v. 3, p. 153-163, 2016.
- 494 PESSOA, G.V.A.; SILVA, E.A.M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só
495 tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.32,
496 p.97-100, 1972.
- 497 PLATA, K.; ROSATO, A.; WEGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent:
498 overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica**
499 **Polonica**, v. 56, p. 597-612, 2009.
- 500 SALES, L. M.; SILVA, T. M. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente: Um desafio para a
501 saúde pública. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, p. 1-13, 2012.
- 502 SARTORI, A. G. O.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil.
503 **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.19, n. p.83-93, 2012.
- 504 SCALLAN, E. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens.
505 **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.
- 506 SILVA, L. R. Endoparasite diversity and liver alterations in *Hoplerythrinus unitaeniatus*
507 and *Cichlasoma bimaculatum* in a quilombola area in Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal**
508 **of Veterinary Parasitology**, v. 31, n. 2, p. e000922, 2022.
- 509 SILVA JÚNIOR, A. C. S. et al. Avaliação microbiológica de pescada branca (*Cynoscion* spp.)
510 comercializada na feira do pescado, Macapá AP. **Higiene Alimentar**, v. 29, p. 108-112,
511 2015.
- 512 VIANA, D. C. et al. Descrição do pescado na Baixada Maranhense – São Bento/MA. **Revista**
513 **Científica Semana Acadêmica**, v. 1, n. 42, p. 1-10, 2014.

7.3 Capítulo 3

PATÓTIPOS DIARREIOGÊNICOS DE *Escherichia coli* EM DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS E ÁGUA ORIUNDOS DE ÁREA QUILOMBOLA MARANHENSE, BRASIL¹

DIARRHEOGENIC PATHOTYPES OF *Escherichia coli* IN TWO NEOTROPICAL FISH SPECIES AND WATER FROM MARANHENSE QUILOMBOL AREA, BRAZIL

Greiciene dos Santos de JESUS¹, Vitória Mendes da Silva MONTEIRO², Vanielly Viana Rodrigues VIEIRA³, Joyce Caroline Campos Mendes BRAGA³, Ladilson Rodrigues SILVA¹, Danilo Cutrim BEZERRA⁴, Larissa Sarmiento dos SANTOS⁵, Nancyleni Pinto Chaves BEZERRA^{1,3,4,5*}.

¹Universidade Estadual do Maranhão, Programa de Pós-graduação Acadêmico em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Departamento de Biologia, Maranhão.

²Universidade Estadual do Maranhão, Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Maranhão.

³Universidade Estadual do Maranhão, Curso de Engenharia de Pesca, Departamento de Engenharia de Pesca, Maranhão.

⁴Universidade Estadual do Maranhão, Curso de Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Maranhão.

⁵Universidade Estadual do Maranhão, Programa de Pós-graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal, Maranhão.

*Correspondência E-mail: Nancyleni Pinto Chaves Bezerra. Cidade Universitária Paulo VI, Caixa Postal nº 9, Bairro: Jardim São Cristóvão, CEP: 65055-970, São Luís, MA, Brasil. E-mail: nancylenichaves@hotmail.com

RESUMO

Objetivou-se detectar patótipos diarreiogênicos em isolados de *Escherichia coli* obtidos de peixes neotropicais e água oriundos de área quilombola maranhense. Para isso, foram

¹ O artigo será submetido ao periódico Boletim do Instituto de Pesca, ISSN 1678-2305, Qualis Capes A4 (quadriênio 2017-2020).

coletadas quatro amostras de água e 42 exemplares de peixes. Em laboratório, foi procedida à coleta de fragmentos musculares, para a realização da pesquisa de *E. coli*. Das amostras positivas procedeu-se o isolamento e identificação bioquímica dos isolados, seguido da extração do DNA das culturas puras e caracterização dos isolados por análise molecular. Os resultados do estudo evidenciaram que em 100% das amostras de água foram quantificadas a bactéria em estudo com populações bacterianas que variaram de 336 a 1.607 NMP/100mL e em 19,04% (n=8/42) dos peixes, com populações de 3,6 a >1.100 *E. coli*/g. Foram obtidos 40 isolados bacterianos em peixes e 20 isolados das amostras de água que se comportaram conforme o esperado para o padrão da espécie *E. coli* nos testes bioquímicos. Para as análises moleculares, foram identificados em 10 isolados de água, genes de virulência característicos dos patótipos diarreiogênicos EPECa, EPECt e ETEC e em 30 isolados de peixes, os patótipos ETEC, EPECt e STEC. Ressalta-se para o risco microbiológico que a população está exposta com a utilização dos recursos aquáticos da comunidade quilombola.

Palavras-chave: enteropatógenos; microbiologia ambiental; sanidade animal.

ABSTRACT

The objective was to detect diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from neotropical fish and water from the maranhense quilombola area. For this, four water samples and 42 fish specimens were collected. In the laboratory, muscle fragments were collected and *E. coli* research was carried out. From the positive samples, the isolates were isolated and biochemically identified, followed by the extraction of DNA from the pure cultures and the characterization of the isolates by molecular analysis. The results of the study showed that in 100% of the water samples the bacteria under study were quantified with bacterial populations that varied from 336 to 1,607 MPN/100mL and in 19.04% (n=8/42) of the fish, with populations of 3.6 to >1100 *E. coli*/g. Forty bacterial isolates were obtained from fish and 20 from water samples that behaved as expected for the standard *E. coli* species in the biochemical tests. With molecular analyses, virulence genes characteristic of the diarrheagenic pathotypes EPECa, EPECt and ETEC were identified in only 10 isolates from water, and in 30 isolates from fish, the pathotypes ETEC, EPECt and STEC. It is worth noting the microbiological risk that the population is exposed to with the use of aquatic resources in the quilombola community.

Keywords: enteropathogens; environmental microbiology; animal health.

INTRODUÇÃO

As doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) constituem um problema de saúde pública frequente no mundo contemporâneo. No Brasil, poucos estados e municípios dispõem de estatísticas e dados sobre a ocorrência de surtos de DTHAs, que relacionam os agentes etiológicos mais comuns, os alimentos mais frequentemente envolvidos, a população de maior risco e outros fatores contribuintes. Ademais, a maioria dos casos dessas doenças não é notificada pois, muitos dos agentes etiológicos envolvidos causam sintomas brandos e as vítimas comumente não procuram atendimento médico (Santos, 2010).

Os agentes biológicos mais incriminados na contaminação de alimentos são as bactérias, vírus e parasitas, os quais podem causar distúrbios que variam de quadros gastroentéricos leves à casos mais severos, com possível risco de óbito. Alguns desses patógenos estão presentes naturalmente no ambiente aquático, enquanto outros podem ser introduzidos a partir de esgotos contaminados com fezes humanas e de animais (Amagliani et al., 2012).

Dentre os principais contaminantes microbiológicos destaca-se a *Escherichia coli*, bactéria que integra a microbiota intestinal dos seres humanos e animais de sangue quente, sendo, constantemente, eliminada no ambiente, contaminando solo, alimentos e água (Silva et al., 2010). Como os peixes são animais ectotérmicos, não apresentam *E. coli* na microbiota intestinal normal, entretanto, se houver contaminação do ambiente por excretas humanas e animais estas podem poluir as águas e chegar aos peixes, e os últimos podem emergir como vias de transmissão de agentes patogênicos aos seres humanos, pois a água, salgada ou doce, constitui ambiente natural de uma variedade de bactérias capazes de originar infecções, embora o potencial para isso dependa de fatores isolados ou sinérgicos, como: sobrevivência, latência, dose infectante do organismo e suscetibilidade do hospedeiro (Barbosa et al., 2010).

Várias linhagens de *E. coli* adquiriram atributos de virulência específicos, que conferem maior capacidade em se adaptar a novos *habitats* e ocasionar um amplo espectro de doenças, entre elas as diarreio gênicas. As diversas combinações desses fatores de virulência originaram linhagens com patótipos específicos de *E. coli* que são capazes de causar doenças (Kaper et al., 2004). As linhagens diarreio gênicas envolvem seis patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* de aderência difusa (DAEC); e, *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Dessas, as STEC e EPEC destacam-se devido ao seu potencial zoonótico emergente (Gyles; Fairbrother, 2010).

Portanto, tendo em vista a infraestrutura de saneamento básico no Maranhão insuficiente, em que animais domésticos e de interesse pecuário são criados em condições

sanitárias precárias e o relevante papel dos patótipos de *E. coli* como agente etiológico em doenças diarreicas, principalmente em regiões menos desenvolvidas e carentes, objetivou-se detectar patótipos diarreiogênicos em isolados de *E. coli* obtidos de peixes neotropicais e água oriundos de área quilombola maranhense.

MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo compreendeu a Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, situado na zona rural de Anajatuba, estado do Maranhão. O referido Município pertence à região da Baixada Maranhense, localizado entre as coordenadas geográficas de Latitude 03°15'50" S e Longitude de 44°37'12" W. De acordo com a Secretaria Estadual Extraordinária de Igualdade Racial (SEIR), Anajatuba possui 21 quilombos, sendo Ponta Bonita, oficialmente reconhecido pela Fundação Cultural Palmares (FCP) (SEIR, 2018).

O clima dominante na região, onde está inserido o município de Anajatuba, é do tipo AW (clima tropical úmido com estação seca de inverno), de acordo com a classificação climática de Koppen (1948). Na área de estudo, tem-se de modo geral, um período seco de seis meses (agosto a janeiro), dos quais, três a quatro meses são considerados muito secos, com menos de 8% da chuva total. No período chuvoso, de seis meses (fevereiro a julho), pelo menos dois meses podem ser considerados muitos chuvosos, com mais de 30% do total da precipitação pluviométrica.

Amostras

As amostras foram coletadas de ambiente alagável da comunidade quilombola de Ponta Bonita. Foram realizadas duas coletas, uma no período chuvoso e a outra no período seco, com intervalo semestral entre coletas. Sendo assim, foram coletadas quatro amostras de água, duas por campanha (setembro de 2021 - período seco; fevereiro de 2022 - período chuvoso), em frascos de vidro borosilicato estéreis com capacidade de 500 mL, acondicionadas ao abrigo de luz solar em caixas isotérmicas com gelo reciclável.

Foram capturados 42 peixes, sendo 21 *Hoplerythrinus unitaeniatus* (jeju; $18,7 \pm 2,5$ cm e $92,7 \pm 25,7$ gramas) e 21 *Cichlasoma bimaculatum* (acará preto; $12,45 \pm 0,77$ cm e $44,32 \pm 9,80$ g) com a utilização de rede de emalhe de malha 4 (20 mm), operada de forma ativa (arrastos/cercos) e uma tarrafa com malha 4 (20 mm). Em seguida, os peixes foram acondicionados e transportados vivos em caixa isotérmica com capacidade de 100 litros provida com água do ambiente de captura, até o Laboratório de Reprodução de Recursos Aquáticos - LARAQUA da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), onde foram

colocados em um tanque com água e oxigenação constante por período de 12 horas até posterior análise e processamento do material biológico no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água.

Os peixes foram eutanasiados por perfuração da parte superior da cabeça com instrumento pontiagudo (lâmina de bisturi). Os fragmentos musculares removidos (25 ± 5 gramas) foram acondicionados em sacos plásticos estéreis e armazenados a -20°C até a realização das análises microbiológicas.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da UEMA sob o protocolo nº 08/2021 por atender as Resoluções do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº. 879/2008, 1000/2012 e a Lei Federal nº. 11794/2008, que tratam dos procedimentos Éticos na Experimentação Animal.

Análises Laboratoriais

Água

Foi utilizado para a quantificação do Número Mais Provável (NMP) *E. coli*, o sistema cromogênico enzimático (Colilert, Idexx, USA), por meio da utilização de substratos definidos. De cada amostra colhida, 10 mL da amostra foi diluída em 90 mL de água destilada esterilizada e vertido em frascos esterilizados contendo o substrato. Em seguida, a solução foi distribuída em cartelas Quanti-Tray que foram seladas e incubadas em estufa a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por 24 horas.

A confirmação da presença de *E. coli* se deu pela emissão da fluorescência azul da amostra quando exposta à luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm (IDEX Laboratories Inc.). Os resultados foram expressos em NMP/100mL da amostra sob análise, após conversão pelo fator de diluição, seguida da interpretação em tabela fornecida pelo fabricante.

Peixes

Para análise microbiológica dos peixes foram pesadas $25 \pm 0,2$ g de cada amostra, adicionada em 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1%, correspondendo à primeira diluição (10^{-1}), homogeneizada por aproximadamente dois minutos em "stomacher" a uma rotação média de 250 rotações por minuto (rpm). Na sequência, mais duas diluições sucessivas (10^{-2} e 10^{-3}) foram preparadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada tamponada a 0,1%.

Para a quantificação de coliformes termotolerantes foi realizada a técnica dos tubos múltiplos em que alíquotas de 1 mL de cada diluição foram inoculadas em séries de três tubos,

contendo 9 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), concentração simples, com tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas.

Uma alçada de cada tubo positivo (turvação e formação de gás visível no tubo de Durham) foram transferidos para tubos contendo o caldo do *E. coli* (EC), que foram incubados a 45 °C, por 24-48 horas. Foram anotados o número de tubos positivos e determinado o NMP em uma tabela adequada às diluições utilizadas e o resultado expresso em NMP de coliformes/grama.

Isolamento e Confirmação de *Escherichia coli*

Para a pesquisa de *E. coli* foi realizado o isolamento e confirmação com a utilização de metodologia convencional, como descrito a seguir:

a) Primeira etapa: enriquecimento da amostra

Inóculos bacterianos (água e peixes) foram inoculados em Ágar MacConkey e incubados a 37°C, por 24 horas. Das placas representativas foram transferidas todas as colônias com morfotipos diferentes e, no máximo, cinco colônias com o mesmo morfotipo. Cada uma delas foi inoculada em Ágar Trypticase de Soja (TSA) e em caldo cérebro-coração (BHI) e incubada a 37°C, por 24 horas.

b) Segunda etapa: identificação das colônias isoladas

A identificação das espécies de *E. coli* em cada cultura pura foi confirmada por testes bioquímico-fisiológicos, utilizando meio Rugai modificado com lisina: (i) produção de gás a partir de glicose; (ii) fermentação da lactose; (iii) descarboxilação de lisina; (iv) produção de indol a partir de triptofano; (v) não degradação da ureia; e, (vi) ausência de produção de sulfeto de hidrogênio a partir de aminoácidos sulfurados. Além, dos testes bioquímicos de Vermelho de Metila (VM) e Voges Proskauer (VP).

Análises Moleculares

A extração do DNA das culturas puras de *E. coli* foi realizada com a resina InstaGene Matrix® (BioRA) de acordo com as indicações do fabricante. Inicialmente 200 µL da cultura foi centrifugada por um minuto à 12.000 rotações por minuto (rpm). O *pellet* formado foi ressuspenso em 1 mL de água autoclavada seguida da centrifugação (12 rpm/1min). O sobrenadante foi descartado e adicionado 200 µL da resina com posterior incubação das amostras por 30 minutos a 56°C. Na sequência, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e incubadas pela última vez por oito minutos a 100 °C. Então, as amostras foram homogeneizadas novamente em vórtex por 10 segundos e centrifugadas por mais 3

minutos a 12.000 rpm. Ao final dessa etapa foi retirado 50 µL do sobrenadante e descartado o precipitado.

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro pela leitura de absorbância a 260 nm e a relação 260/280 nm foi utilizada para determinar a pureza das amostras (Sambrook e Russel, 2001). Em seguida, a concentração das amostras foi ajustada com TE pH 8,0 para aproximadamente 200 ng/µL e o DNA foi armazenado a -20° C até a realização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de patótipos diarreio gênicos de *E. coli*.

O DNA dos isolados de *E. coli* foi caracterizado por PCR utilizando o Kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante, para a obtenção de um volume final de 25 µL por reação. Os primers alvos e as condições para amplificação estão sumarizadas na Tabela 1. Os controles positivos para *eae*, *Stx1* e *Stx2* (*E. coli* CDC EDL-933, INCQS 00171), *bfpA* (*E. coli* CDC O126, INCQS 000184), *elt* (*E. coli* 0761-2) e *est* (*E. coli* 0122-4), bem como o controle negativo interno (água ultrapura), foram incluídos em cada lote de reações.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores na reação em cadeia da polimerase (PCR) e condições de amplificação para as estirpes de *Escherichia coli* diarreio gênica

Designação do primer	Iniciadores (5'-3')	Programa	Tamanho do Amplicon (bp)	Referência
eae1	CTG AAC GGC GAT TAC GCG AA	94°C/5 min	917	Reid et al. (1999)
		94°C/1 min		
		53°C/2min		
		72°C/3min		
		30x		
bfpA	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC	72°C/7 min	326	Gunzburg et al. (1995)
		94°C/5 min		
		94°C/30 s		
		56°C/1 min		
		72°C/2 min		
29x				
		72°C/7 min		

Stx1	CAG TTA ATG TGG TGG GGA AGG	95°C/5 min	348	Vidal et al. (2004)
		95°C/20 s		
		61°C/40 s		
		72°C/90 s		
		30x		
72°C/7 min				
Stx2	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	95°C/5 min	584	Vidal et al. (2004)
		95°C/20 s		
		61°C/40 s		
		2°C/90 s		
		30x		
72°C/7 min				
elt	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC	95°C/5 min	450	Aranda et al. (2004)
		95°C/45 s		
		50°C/1 min		
		72°C/1 min		
		40x		
72°C/7 min				
est	ATT TTT MTTTCIGTATTRTCTT	95°C/5 min	190	Aranda et al. (2004)
		95°C/45 s		
		50°C/1 min		
		72°C/1 min		
		40x		
72°C/7 min				

Onde: bp= pares de bases; s= segundo; min= minutos.

Fonte: Elaborado pelos autores.

RESULTADOS

Peixes

Os resultados do estudo evidenciaram que em 19,04% (n= 8/42) dos peixes foram quantificadas populações bacterianas que variaram de 3,6 a >1.100 *E. coli*/g. Dois morfotipos bacterianos distintos caracterizados por colônias rosadas e, colônias incolores/transparentes foram isoladas no meio seletivo e diferencial utilizado. Destas, foi possível diagnosticar 40 isolados bacterianos com características bioquímicas compatíveis com *E. coli*. Do total de

isolados bacterianos, em 30 detectaram-se patótipos diarreiogênicos de *E. coli* (Tabela 02). As estirpes diarreiogênicas foram identificados em ambas as espécies e campanhas amostrais, mas, com maior casuística no período chuvoso. Os patótipos identificados nos isolados bacterianos por ordem decrescente de ocorrência foram: EPECT, ETEC e STEC.

Ao comparar os resultados microbiológicos obtidos com a legislação brasileira vigente, ou seja a Instrução Normativa (IN) n° 60 de 23 de dezembro de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece como padrão aceitável para *E. coli* em pescado não consumidos crus, valores inferiores a 50 *E. coli*/g (Brasil, 2019), constata-se que: (i) 90,48% (n= 38/42) dos peixes estavam aceitáveis para consumo; (ii) 4,76% (n= 02/42) apresentaram padrão intermediário (<50 a 5x10² *E. coli*/g); e (iii) 4,76 % (n= 02/42) padrão inaceitável (>5x10² *E. coli*/g).

É importante ressaltar que das amostras aceitáveis, em 7,90% delas (n=3/38; P2; P5 e P6) foram identificados patótipos diarreiogênicos de *E. coli*. Em uma amostra com padrão intermediário (P1) e duas com padrão inaceitável (P7 e P8) foram identificados genes de virulência para *E. coli* diarreiogênica. Já, duas amostras, uma com padrão aceitável e outra intermediário, mesmo apresentando isolados típicos de *E. coli*, não foram identificados os patótipos diarreiogênicos (Tabela 2).

Tabela 02. Patótipos de *Escherichia coli* diarreiogênica detectados em exemplares de peixes neotropicais provenientes de ambiente alagável de comunidade quilombola maranhense, Brasil

Isolados	Peixes	Genes Identificados	Patótipos de <i>Escherichia coli</i> Diarreiogênica	
20	<i>Cichlasoma bimaculatum</i>	P1	<i>elt, bfpA</i>	ETEC, EPECT
		P2	<i>bfpA, Stx1</i>	EPECT, STEC
		P3	—	—
		P4	—	—
20	<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	P5	<i>elt, Stx1</i>	ETEC, STEC
		P6	<i>bfpA</i>	EPECT
		P7	<i>elt, bfpA, Stx1</i>	ETEC, EPECT, STEC
		P8	<i>elt, bfpA</i>	ETEC, EPECT

40

08

elt, bfpA, Stx1

ETEC, EPECt, STEC

Onde: P= peixes; EPECt= *E. coli* enteropatogênica típica; ETEC= *E. coli* enterotoxigênica; STEC= *E. coli* produtora de toxina Shiga.

Água

Das amostras de água, em 100% (n= 4) foram quantificadas *E. coli* com populações bacterianas que variaram de 336 a 1.607 NMP/100mL. No meio seletivo e diferencial utilizado para isolamento bacteriano e nos testes bioquímicos foi possível diagnosticar 20 isolados sugestivos de *E. coli*. Desses isolados, em 10 detectaram-se patótipos diarreogênicos da bactéria em estudo (Tabela 03), apenas nas amostras coletadas no período chuvoso em que se constataram as maiores populações bacterianas (amostra 1 - 1.607 NMP/100mL; amostra 2 - 909 NMP/100mL).

Tabela 03. Patótipos de *Escherichia coli* diarreogênica detectados em amostras de água provenientes de ambiente alagável de comunidade quilombola maranhense, utilizada para fins de pesca artesanal

Isolados	Água	Gene	Patótipos de <i>Escherichia coli</i> diarreogênica
20	A1	<i>eae1, bfpA</i>	EPECa, EPECt
	A2	<i>elt, bfpA</i>	ETEC, EPECt
	A3	—	—
	A4	—	—

Onde: A= água; EPECa= *E. coli* enteropatogênica atípica; EPECt= *E. coli* enteropatogênica típica; ETEC= *E. coli* enterotoxigênica

DISCUSSÃO

O isolamento da *E. coli* na musculatura de oito peixes avaliados e a detecção de genes de virulência em seis deles sugere a contaminação do ambiente de captura, uma vez que este micro-organismo não integra o microbioma dessa classe de vertebrados (Guzman et al., 2004). Membros do gênero *Escherichia* são habitantes naturais do trato intestinal de seres humanos e animais de sangue quente (Kaper et al., 2004). A presença dessa bactéria em recursos pesqueiros e água é um indicativo de contaminação microbiana de origem fecal e sugere condições sanitárias insatisfatórias, além de sinalizar para o grau de contaminação ao qual o

ambiente e os organismos aquáticos estão expostos e a presença de micro-organismos potencialmente patogênicos (Franco e Landgraf, 2008).

Foi detectada *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) associada ao gene *elt* em quatro exemplares de peixes avaliados sem, contudo, a detecção do gene *est*. Para Muratori et al. (2004), a microbiota do peixe reflete o ambiente terrestre próximo aos recursos hídricos e a contaminação da água pode ocorrer por entrada direta de excretas de animais criados próximos e, ainda por falta de saneamento básico no local. É comum na área avaliada a criação de animais domésticos (cães e gatos) e de interesse pecuário (bubalinos, bovinos e suínos) e a existência de animais silvestres, essas podem ser as fontes de infecção para os peixes avaliados. Mainil (2013) afirma que os principais hospedeiros do patótipo ETEC são os seres humanos, suínos, bovinos e cães, com destaque para os bovinos.

Para Kolenda et al. (2015), ETEC pode ser isolado de bezerros doentes, entretanto, animais saudáveis também podem albergar esse patótipo. Tutija et al. (2022), no estado do Mato Grosso do Sul, detectaram maior prevalência de ETEC em amostras de bezerros avaliadas (n= 170/176; 92,61%). E, no Estado do Paraná, Dall et al. (2021), ao analisarem oito bezerros com quadro diarreico diagnosticaram ETEC em 50% desses animais. Para Fairbrother et al. (2005), a ETEC pode sobreviver por pelo menos seis meses no meio ambiente quando protegida por esterco, logo o ambiente se configura em um meio de transmissão desse patótipo.

Em cinco peixes foram detectados genes de virulência para EPEC com características típicas (*bfpA*). Pakbin et al. (2021) citam que EPECt constitui, nos países em desenvolvimento, a principal causa de surtos de doenças diarreicas em crianças, com altas taxas de morbidade e mortalidade em menores de seis meses de idade. Para Drumond et al. (2018), recursos aquáticos em que se diagnosticam EPECt devem ser utilizados com precaução, pelo risco de ocorrência de gastroenterites nos usuários. A detecção de EPEC em locais onde se realiza atividades pecuárias, como a estudada, evidencia a necessidade de implementação de medidas higiênico-sanitárias dos trabalhadores no manuseio dos animais, na utilização de esterco bovino na adubação de alimentos, principalmente frutas e hortaliças ingeridas cruas (Monteiro et al., 2021).

Em três peixes foram detectados genes de virulência característicos de STEC (*Stx1*). Samadpour (1994) citam a ocorrência de STEC em diferentes produtos de origem animal, como carnes bovina, suína, aves e peixes. Sanath et al. (2001) identificaram esse patótipo em moluscos e peixes frescos.

Em ambas as espécies avaliadas foram detectados genes de virulência para *E. coli* diarreiogênica, com maior percentual de contaminação desses no período chuvoso. Drumond et al. (2018) em estudo realizado na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó na região do Alto Rio Doce, Minas Gerais, Brasil, para identificação molecular de *E. coli* diarreiogênica, em duas épocas do ano, detectaram o gene de virulência *Stx1*, em dois dos 13 pontos amostrais, apenas na época de maior índice pluviométrico.

Quanto às amostras de água, constatou-se patótipos diarreiogênicos apenas no período chuvoso (EPECa, EPECt e ETEC). A não detecção de STEC nessas amostras não é indicativo da ausência desse patótipo ao longo do ano na área avaliada, pois a sazonalidade é considerada a principal variável influenciadora na degradação da qualidade microbiológica das águas superficiais, devido à intensificação do escoamento superficial, acentuando o transporte de partículas contaminadas por material fecal para os corpos d'água. Brennan et al. (2013) inferem que a capacidade de sobrevivência da *E. coli* devido a necessidades nutricionais simples e à sua adaptabilidade no interior do solo transforma o meio ambiente em um disseminador de contaminação microbiológica para corpos hídricos, potencializando a possibilidade de carreamento de patótipos diarreiogênicos.

Em uma amostra de água foi detectada o patótipo EPEC com características atípicas (*eaec1*). Segundo Nguyen et al. (2006), esse patótipo possui alta patogenicidade para seres humanos, com o prolongamento do estado diarreico em pacientes acometidos e possibilidade de evolução para óbito.

Em estudo realizado em diferentes pontos da bacia do rio La Paz, na Bolívia, Guzman et al. (2019) observaram a incidência de diferentes patótipos de *E. coli* diarreiogênicas, sendo que a ETEC apresentou maior ocorrência ao longo da bacia. Traoré et al. (2016) em estudo realizado em corpos hídricos no distrito de Vhembe, África do Sul demonstraram alta incidência de ETEC nas amostras analisadas. Os resultados obtidos no presente estudo para água corroboram com os referidos pesquisadores.

Este é o primeiro estudo realizado no estado do Maranhão para a detecção de patótipos diarreiogênicos de *E. coli* em peixes neotropicais oriundos de comunidade quilombola. Jeju e acará preto são comumente encontrados na Baixada Ocidental Maranhense (Pereira et al., 2016) e constituem base da alimentação para muitas famílias maranhenses, entre elas os quilombolas o que reforça a importância social, cultura e econômico do estudo.

No Brasil, poucos estudos abordam a presença de micro-organismos diarreiogênicos em produtos oriundos da pesca artesanal. Além disso, a presença de *E. coli* em locais de pesca é avaliada, normalmente, sob o aspecto quantitativo, como indicadora de contaminação fecal

em relação a qualidade da água de captura, sem o enfoque que mesmo em baixas concentrações a presença desse enteropatógeno indica risco microbiológico aos consumidores (Barbosa et al., 2010). Essa é uma informação importante e constatada no presente estudo em que se evidenciou que mesmo em amostras com padrão aceitável para *E. coli*, de acordo com legislação brasileira vigente, detectou-se genes de virulência para *E. coli* diarreiogênica. Isso reforça a necessidade de incorporação de análises moleculares para reforçar estudos microbiológicos com técnicas tradicionais.

Para Schuroff et al. (2014), o monitoramento de genes de virulência em linhagens de *E. coli* ambientais se torna indispensável para o controle de *E. coli* patogênica no ambiente e em suprimentos de água e alimento. Os dados obtidos neste trabalho contribuem para ampliar o estudo desta espécie em fontes ambientais, já que nestas fontes seu estudo é ainda bastante incipiente.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos conclui-se que peixes neotropicais e amostras de água de comunidade quilombola maranhenses apresentaram-se contaminadas por *E. coli*, com detecção dos patótipos diarreiogênicos EPECt, ETEC e STEC em peixes e EPECa, EPECt e ETEC em água, com ambos os recursos naturais mais comprometida no período chuvoso, o que evidencia a influência da sazonalidade na ocorrência desse enteropatógeno na área avaliada. Para garantia da qualidade desses recursos e a preservação da comunidade aquática que ali vivem, faz-se necessárias medidas como o monitoramento microbiológico, investimentos em infra-estrutura, além da conscientização da população sobre a importância da preservação desse patrimônio natural, a fim de impedir danos ao sistema aquático e à saúde humana.

REFERÊNCIAS

- Amagliani, G.; Brandi, G.; Schiavano, G.F. 2012. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. *Food Research International*, 45(2):780-788. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.022>
- Aranda, K.R.S.; Fagundes, N.U.; Scaletsky, I.C.A. 2004. Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12):5849-5853. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5849-5853.2004>

Barbosa, M.M.C.; Pino, F. de R.; Ribeiro, L.F.; Zanini, H.L.H.T.; Amaral, L.A. do. Ocorrência de *Escherichia coli* patogênicas em pesque-pagues. 2010. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgklclfindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.iwra.org%2Fmember%2Fcongress%2Fresource%2FPAP004851.pdf&clen=253099&chunk=true>. Acesso em: 22 fev. de 2022.

Brasil. 2019. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2019. 249, Seção 1: p. 133.

Brennan, F. P.; Grant, F.; Botting, C. H.; O'Flaherty, F.; Richards, K. G.; Abram, F. 2013. Insights into the low-temperature adaptation and nutritional flexibility of a soil-persistent *Escherichia coli*. *Fems Microbiology Ecology*, 84(1), 75-85. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12038>

Dall, A.M.; Lorenzetti, E.; Leme, R.A.; Ladeia, W.A.; Mainardi, R.M.; Bernardi, A., Headley, S.A.; Freire, R.L.; Pereira, U.P.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A. 2021. Severe outbreak of bovine neonatal diarrhea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology. *Brazilian journal of microbiology*, 52(4): 2547–2553. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00565>.

Drumond, S.N.; Santiago, A. da F.; Moreira, M.; Lanna, M.C. da S.; Roeser, H.M.P. 2018. Molecular identification of diarrheagenic *Escherichia coli* in the watershed of Xopotó river, in Alto do Rio Doce, Brazil. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 23(3): 579–590. <https://doi.org/10.1590/s1413-41522018165696>.

Fairbrother, J.M; Nadeau, E; Gyles, CL. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Research Review*, 6(1):17-39. <https://doi.org/10.1079/ahr2005105>.

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. 2008. 1ª ed. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu. 192p.

- Gunzburg, S.T.; Tornieport, N.G.; Riley, L.W. 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal Clinical Microbiology*, 33(5): 1375-1377. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.5.1375-1377.1995>.
- Guzman, M.C.; Bistoni, M.A.; Tamagnini, L.M.; González, R.D. 2004. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. *Water Research*, 38(9):2367-2373. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.02.016>.
- Guzman, O. J.; Gonzales, S. L.; Poma, V.; Bengtsson, P. J.; Thorell, K.; Flach, C. F.; Iñiguez, V.; Sjöling, A. (2019). Diarrheal bacterial pathogens and multi-resistant enterobacteria in the Choqueyapu River in La Paz, Bolivia. *PloS one*, 14(1): e0210735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210735>
- Gyles, C.L.; Fairbrother, J.M. 2010. *Escherichia coli*. In: Gyles, C.L.; Prescott, J.F.; Songer, G.; Thoen, C. O (eds). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4ed. New York: Wiley-Blackwell. p. 267-308.
- Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2): 123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- Kolenda, R; Burdukiewicz, M; Schierack, P.; 2015. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Frontiers Cellular and Infection Microbiology*, 12(5): 23. doi: 10.3389/fcimb.2015.00023. PMID: 25815276; PMCID: PMC4357325.
- Koppen, W. *Climatologia: com um estudio de los clima de la tierra*. México, Fondo de Cultura Economia, 1948. 478p.
- Mainil, J. 2013. Fatores de virulência de *Escherichia coli*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1-2): 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>
- Monteiro, S.V. M., dos Santos Mendes, E., da Costa Silva Menezes, K., Guimarães, C. A., Gonçalves, H. G. P., Bezerra, N. P. C., Bezerra, D. C., dos Santos Ribeiro, L. S., de Carvalho Neta, A. V., & Coimbra, V. C. S. 2021. First detection of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in the Mearim River Watershed, Maranhão State, Brazil. *Semina: Ciencias Agrarias*,

42(6): 3869–3881. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n6Supl2p3869>.

Muratori, M. C. S.; Costa, A. P. R.; Viana, C. M.; Rodrigues, P. C.; Podestá-Junior, R. L. de. 2004. Qualidade sanitária de pescado “in natura”. *Higiene Alimentar*, 8:50-54.

Nguyen, R. N.; Taylor, L. S.; Tauschek, M.; Robins-Browne, R.M. 2006. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4): 597-603. <https://doi.org/10.3201/eid1204.051112>.

Pakbin, B.; Brück, W.M.; Rossen, J.W.A. 2021. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Science*, 22(18): 9922. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>.

Pereira, P.R.M.; Rodrigues, T. C. S.; Viegas, J. C. 2016. Diagnóstico ambiental e caracterização morfométrica das Microbacias Hidrográficas de Pedro do Rosário, Amazônia Maranhense (Brasil). *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, 3(5): 153-163. <http://dx.doi.org/10.21438/rbgas.030505>

Reid, S.D.; Betting, D.J.; Whittam, T.S. 1999. Molecular Detection and Identification of Intimin Alleles in Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, 37(8): 2719-2722. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.37.8.2719-2722.1999>.

Samadpour, M.; Ongerth, J.E.; Liston, J.; Tran, N.; Nguyen, D.Q.; Whittam, T.S.; Wilson, R.A.; Tarr, P.I. 1994. Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(3): 1038-1040. <https://doi.org/10.1128/aem.60.3.1038-1040.1994>.

Sambrook, J., Russel, D. W. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2100 p.

Sanath K. H.; Otta S.K; Karunasagar I; Karunasagar I. 2001. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR.

Letters in Applied Microbiology, 33(5): 334-338. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.01007.x>. PMID: 11696091.

Santos, C.A.M.L. 2010. Doenças transmitidas por pescado no Brasil. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, 32(4): 234-241.

Schuroff, P.A.; Lima, N.R.; Burgos, A.M.L.; Lopes, A.M.; Pelayo, J.S. 2014. Qualidade microbiológica da água do Lago Igapó de Londrina - PR e caracterização genotípica de fatores de virulência associados a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, 35(2): 11-20. <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2014v35n2p11>.

Secretaria Estadual Extraordinária De Igualdade Racial. Governo participa de certificação de comunidades quilombolas em Anajatuba. 2018. Disponível em: <http://www.igualdaderacial.ma.gov.br/governo-participa-de-certificacao-de-comunidades-quilombolas-em-anajatuba/>. Acesso: mar. 03, 2022.

SILVA, N. *et al.* Manual de métodos de análise microbiológica de Alimentos. São Paulo: Varela, 2010. 632 p.

Traoré, A. N.; Mulaudzi, K.; Chari, G. J.; Foord, S. H.; Mudau, L. S.; Barnard, T. G.; Potgieter, N. 2016. The Impact of Human Activities on Microbial Quality of Rivers in the Vhembe District, South Africa. International journal of environmental research and public health, 13(8), 817. <https://doi.org/10.3390/ijerph13080817>

Tutija, J.F.; Ramos, C.A.N.; Lemos, R.A.A.; Santos, A.A.L.; Reckziegel, G.H.; Freitas, M.G.; Leal, C.R.B. 2022. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* from calves in an important meat-producing region in Brazil. Journal of Infection in Developing Countries, 16(6): 1030-1036. <https://doi.org/10.3855/jidc.13377>

Vidal, R. *et al.* 2004. Multiplex PCR for Diagnosis of Enteric Infections Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology, v. 42, n. 4, p. 1787-1789, 2004.

7.4 Capítulo 4

PRIMEIRA DETECÇÃO DE GENES ENTEROTOXIGÊNICOS EM DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS ORIUNDOS DE ÁREA QUILOMBOLA MARANHENSE, BRASIL

Greiciene dos Santos de JESUS¹, Vanielly Viana Rodrigues VIEIRA², Joyce Caroline Campos Mendes BRAGA², Vitória Mendes da Silva MONTEIRO³, Izabela Alves Paiva¹, Danilo Cutrim BEZERRA⁴, Nancyleni Pinto Chaves Bezerra^{1,2,4*}.

¹Programa de Pós-graduação Acadêmico em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Centro de Educação, Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, São Luís, MA, Brasil.

²Curso de Engenharia de Pesca, Departamento de Engenharia de Pesca, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, MA, Brasil.

³Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, MA, Brasil.

⁴Curso de Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, MA, Brasil

*Correspondência: Nancyleni Pinto Chaves Bezerra. E-mail: nancylenichaves@hotmail.com

Resumo

Em peixes, a contaminação por estafilococos pode surgir, principalmente, de fatores externos aos animais (ambiente, água, pessoal envolvido nas capturas, equipamentos e utensílios que entram em contato direto com os espécimes), e por fatores relacionados diretamente aos animais destacando-se as lesões de pele, a presença desse patógeno, pode implicar em perdas econômicas e desequilíbrio social, principalmente em comunidades tradicionais que tem a pesca como fonte de subsistência. Nesse sentido, objetivou-se com o estudo detectar genes enterotoxigênicos em isolados de estafilococos coagulase positiva de peixes oriundos de área quilombola maranhense. Para isso, foram coletados 21 *Hoplerythrinus unitaeniatus* (jeju) e 21 *Cichlasoma bimaculatum* (acará preto). Em ambiente laboratório, foi procedida à coleta de fragmentos de tecido muscular, para a realização das análises microbiológicas tradicionais (isolamento e testes bioquímicos), seguido da extração do DNA das culturas puras e caracterização dos isolados por biologia molecular. A enumeração de estafilococos coagulase

positiva (ECoP) variou de <10 a $3,9 \times 10^4$ ECoP/g nos peixes avaliados, sendo 85,71% (n= 36/42) dos peixes considerados aceitáveis para consumo, 9,52% (n= 04/42) considerados com padrão intermediário e 4,76% (n= 02/42) considerados inaceitáveis para consumo. Foram obtidos 18 isolados de *Staphylococcus* sp. em que se constatou que 33,34% (n= 6) desses produziram a enzima coagulase e 100% a enzima catalase. Do total de isolados, 33,34% (n= 6/18) eram estafilococos coagulase positiva (ECoP) e 66,67% eram coagulase negativa. Dos seis isolados de ECoP, três continham genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas SEC e SEE e, em um isolado de estafilococos coagulase negativa foi detectado o gen *see* produtor de enterotoxina estafilocócica (SE). Os genes amplificados, neste estudo, foram *see* (22,23%; 4/18) e *sec* (5,56%; 1/18). E, 75% (n= 3/4) dos genótipos obtidos, correspondiam a combinações de genes *sec* + *see*. Conclui-se que a técnica molecular utilizada permitiu a detecção dos genes *sec* e *see*, este último gene tanto em isolados de estafilococos coagulase positiva como em isolados de estafilococos coagulase negativa. Animais domésticos, como bubalinos e bovinos, e o ambiente contaminado podem ser a origem mais provável dos isolados de *Staphylococcus* nas amostras de peixes avaliadas.

Palavras-chave: Comunidades tradicionais. Pescado. *Staphylococcus*. Biologia molecular.

INTRODUÇÃO

O consumo de peixes aumentou nas últimas quatro décadas, tanto pela maior demanda quanto pelas mudanças no hábito alimentar da população, que tem, cada vez mais, optado por alimentos com perfil nutricional adequado (FORNARI *et al.*, 2017). Mas, o consumo de peixe pode representar risco à saúde humana, devido aos impactos ambientais e a contaminação dos recursos aquáticos que podem comprometer a qualidade desse produto de origem animal (LIMA *et al.*, 2015).

Dados divulgados pelo Ministério da Saúde sobre o perfil epidemiológico das doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) no Brasil, de 2009 a 2018, apontou, dentre os alimentos incriminados em surtos de DTHA, o pescado como estando envolvido em 2,1% dos casos que ocorreram no país, neste período (BRASIL, 2018).

A intoxicação alimentar por estafilococos é uma das DTHA mais comuns e resulta da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (EE) pré-formadas em alimentos (HENNEKINNE *et al.*, 2012). No período de 2000 a 2015, *S. aureus* foi diagnosticado como agente causal de 7,7% dos surtos intoxicação alimentar ocorridos no Brasil (BRASIL, 2015).

A presença de estafilococos coagulase positiva em peixes, pode implicar em perdas econômicas e desequilíbrio social, principalmente em comunidades tradicionais que tem a pesca como fonte de subsistência e obtenção de renda. Além disso, considera-se que há potencial risco zoonótico para a população consumidora, que ao ingerir o alimento infectado, pode colocar em risco sua saúde. Nesse sentido, objetivou-se com o estudo detectar genes enterotoxigênicos em isolados de estafilococos coagulase positiva de peixes oriundos de área quilombola maranhense.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de Estudo

A área de estudo compreendeu a Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, situado na zona rural de Anajatuba, estado do Maranhão. O referido Município pertence à região da Baixada Maranhense, localizado entre as coordenadas geográficas de Latitude 03°15'50" S e Longitude de 44°37'12" W. De acordo com a Secretaria Estadual Extraordinária de Igualdade Racial (SEIR), Anajatuba possui 21 quilombos, sendo Ponta Bonita, oficialmente reconhecido pela Fundação Cultural Palmares (FCP) (SEIR, 2018).

O clima dominante na região, onde está inserido o município de Anajatuba, é do tipo AW (clima tropical úmido com estação seca de inverno), de acordo com a classificação climática de Köppen (1948). Na área de estudo, tem-se de modo geral, um período seco de seis meses (agosto a janeiro), dos quais, três a quatro meses são considerados muito secos, com menos de 8% da chuva total. No período chuvoso, de seis meses (fevereiro a julho), pelo menos dois meses podem ser considerados muito chuvosos, com mais de 30% do total da precipitação pluviométrica.

Amostras

As amostras foram coletadas de ambiente alagável da comunidade quilombola de Ponta Bonita. Foram realizadas duas coletas, uma no período chuvoso e a outro no período seco, com intervalo semestral entre coletas.

Foram capturados 42 peixes, sendo 21 *Hoplerthrinus unitaeniatus* (jeju; $18,7 \pm 2,5$ cm e $92,7 \pm 25,7$ g) e 21 *Cichlasoma bimaculatum* (acará preto; $12,45 \pm 0,77$ cm e $44,32 \pm 9,80$ g) com a utilização de rede de emalhe de malha 4 (20 mm), operada de forma ativa (arrastos/cercos) e uma tarrafa com malha 4 (20 mm). Em seguida, os peixes foram acondicionados e transportados vivos em caixa isotérmica com capacidade de 100 litros provida

com água do ambiente de captura, até o Laboratório de Reprodução de Recursos Aquáticos – LARAQUA da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), onde foram colocados em um tanque com água e oxigenação constante por período de 12 horas até posterior análise e processamento do material biológico no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água.

Os peixes foram eutanasiados por perfuração da parte superior da cabeça com instrumento pontiagudo (lâmina de bisturi). Em seguida, os fragmentos musculares foram removidos (25 ± 5 g) e acondicionados em sacos plásticos estéreis e armazenados a -20°C até a realização das análises microbiológicas.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da UEMA sob o protocolo nº 08/2021 por atender as Resoluções do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº. 879/2008, 1000/2012 e a Lei Federal nº. 11794/2008, que tratam dos procedimentos Éticos na Experimentação Animal.

Análises Laboratoriais

Microbiológicas

Para análise microbiológica foram pesadas $25 \pm 0,2$ g de cada amostra, adicionada em 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1%, correspondendo à primeira diluição (10^{-1}), homogeneizada por aproximadamente dois minutos em "stomacher" a uma rotação média de 250 rotações por minuto (rpm). Na sequência, mais duas diluições sucessivas (10^{-2} e 10^{-3}) foram preparadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada tamponada a 0,1%.

Para a enumeração de Estafilococos coagulase positiva (ECoP) seguiu-se os procedimentos e recomendações da *American Public Health Association* (DOWNES; ITO, 2001).

A enumeração de ECoP foi realizada com a inoculação de 0,1 mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em ágar Baird Parker (BP)² por meio da técnica de espalhamento em superfície. Em seguida, as placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24-48h. Foram selecionadas placas contendo de 30 a 300 colônias e coletadas cinco colônias típicas (cor negra ou cinza, lisas, convexas, com presença de zona opaca/clara em torno das colônias) e atípicas para estafilococos para realização dos testes de Gram, catalase e coagulase.

Para o teste de coagulase, as colônias selecionadas foram incubadas em tubos de ensaio contendo 2 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Seguido, da comprovação da capacidade de coagular o plasma pela ação da enzima coagulase.

²**Ágar Bair Parker:** ágar enriquecido com solução de gema de ovo e adicionado de telurito de potássio a 1%.

Moleculares

A extração do DNA das culturas puras de ECoP foi realizada com a resina InstaGene Matrix® (BioRA) de acordo com as indicações do fabricante. Inicialmente 200 µL da cultura foi centrifugada por um minuto à 12.000 rotações por minuto (rpm). O *pellet* formado foi ressuspenso em 1 mL de água autoclavada seguida da centrifugação (12 rpm/1min). O sobrenadante foi descartado e adicionado 200 µL da resina e 120 µL da enzima lisozima com posterior incubação das amostras por 30 minutos a 56°C. Na sequência, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e incubadas pela última vez por oito minutos a 100 °C. Então, as amostras foram homogeneizadas novamente em vórtex por 10 segundos e centrifugadas por mais 3 minutos a 12.000 rpm. Ao final dessa etapa foi retirado 50 µL do sobrenadante e descartado o precipitado.

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro pela leitura de absorbância a 260 nm e a relação 260/280 nm foi utilizada para determinar a pureza das amostras (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Em seguida, a concentração das amostras foi ajustada com TE pH 8,0 para aproximadamente 200 ng/µL e o DNA armazenado a -20° C até a realização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de genes enterotoxigênicos de ECoP.

O DNA dos isolados de ECoP foi caracterizado por PCR utilizando o Kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante, obtendo-se um volume final de 25 µL por reação. Os *primers* alvos e as condições para amplificação estão sumarizadas na Tabela 1. Os controles positivos (estirpes enterotoxigênicas padrão de *S. aureus* pertencentes à American Type Culture Collection - ATCC) e o controle negativo interno (água ultra pura), foram incluídos em cada lote de reações.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores na reação em cadeia da polimerase (PCR) e condições de amplificação para genes enterotoxigênicos de estafilococos coagulase positiva

Designação do Gene	Primer	Iniciadores (5'-3')	Programa	Tamanho do Amplicon (bp)	Referência
<i>sea</i>	GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG		102	Betley; Mekalanos (1988)
	GSEAR-2	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG			
<i>seb</i>	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAAGTACTGAGC		164	Jones; Khan (1986)
	GSEBR-2	CCAAATAGTTGACGAGTTAGG	94°C/5 min		
<i>sec</i>	GSECR-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	94°C/2 min	451	Bohach; Schlievert (1987)
	GSECR-2	CACACTTTTAGAATCAACCG	54,6°C/2 min		
<i>sed</i>	GSEDR-1	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG	72°C/1min	278	Bayles; Iandolo (1989)
	GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	35x		
<i>see</i>	GSEER-1	AGGTTTTTTCACAGGTCCATCC	72°C/7 min	209	Couch; Soltis; Betley (1985)
	GSEER-2	CTTTTTTTTCTTCGGGTCAATC			
<i>FemA</i>	GFEMAR-1	AAAAAAGCACATAACAAGCG		132	Berger-Bachi <i>et al.</i> (1989)
	GFEMAR-2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG			

Onde: bp= pares de bases; s= segundo; min= minutos.

Fonte: Elaborado pelos autores

Os produtos de PCR foram visualizados mediante a aplicação de 5 µL do amplificado em gel de agarose 2%, corado com SYBR Safe®, submetido à eletroforese horizontal por 30 minutos a 90V em tampão TBE 1X. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e imagens digitais serão gravadas com o modelo L-PIX Image EX (Locus Biotecnologia, Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Instrução Normativa (IN) n° 60 de 23 de dezembro de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o padrão de qualidade microbiológica dos alimentos e determina que pescado (peixes, crustáceos, moluscos) e miúdos (ovas, moela, bexiga natatória) crus, temperados ou não, frescos, resfriados ou congelados para serem considerados aceitáveis para consumo, devem apresentar como um dos critérios microbiológicos, a enumeração de Estafilococos coagulase positiva de até 10^3 ECoP/g (BRASIL, 2019). Com base nesse critério, a enumeração deste indicador sanitário variou de <10 a $3,9 \times 10^4$ ECoP/g nos peixes avaliados, sendo 85,71% (n= 36/42) dos peixes considerados aceitáveis para consumo, 9,52% (n= 04/42) com padrão intermediário e 4,76% (n= 02/42) inaceitáveis para consumo (Tabela 2).

Tabela 2. Enumeração de Estafilococos Coagulase Positiva (ECoP) em 21 *Cichlasoma bimaculatum* e 21 *Hoplerythrinus unitaeniatus* provenientes de ambiente alagável de comunidade quilombola maranhense

Padrão Microbiológico	Espécies de Peixe Fresco				Total
	<i>Cichlasoma bimaculatum</i>		<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>		
	PC	PS	PC	PS	
Aceitável ($\leq 10^2$ ECoP/g)	16	02	01	17	36
Intermediário (10^2 UFC/g a 10^3 ECoP/g)	01	01	01	01	04
Inaceitável ($>10^3$ ECoP/g)	01	00	01	00	02
Total	18	03	03	18	42

Onde: n = número de amostras; PC= período chuvoso; PS= período seco; ECoP= Estafilococos coagulase positiva; Padrão microbiológico= Instrução Normativa n° 60/2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Novotny et al. (2004) citam que a incidência de estafilococos coagulase positiva em peixes comercializados no Brasil é alta. No trabalho realizado por Costa et al. (2018) sobre o perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de *Cynoscion acoupa* (pescada amarela) comercializados em feira pública da cidade de Macapá – Amapá foram identificadas em 75%

(n=15/20) das amostras analisadas o micro-organismo. Silva Júnior *et al.* (2015) ao avaliarem *Cynoscion* sp. (pescada branca) comercializados na feira do Perpétuo Socorro, Macapá-Amapá, encontraram ECoP em 50% das amostras analisadas.

A presença da ECoP em 14,28% das amostras de peixes analisadas nesse estudo (n=06/42- amostras com padrão microbiológico intermediário e inaceitável), pode estar relacionada as más práticas higiênicas (equipamentos, utensílios) e a incorreta manipulação humana durante à captura dos peixes, realizadas por pescadores locais. Sales e Silva (2012) pontuam que estafilococos coagulase positiva são frequentemente encontradas em pele e mucosas de seres humanos e Plata, Rosato e Wegrzyn (2009) citam que 20 a 30% da população mundial em geral são portadoras deste patógeno.

Bujamma e Padmavathi (2015) ao realizarem trabalho no mercado de peixe da cidade de Guntur na Índia, constataram que a manipulação inadequada pelos feirantes e consumidores foram as fontes de contaminação de *Staphylococcus aureus* para o pescado comercializado. Para esses pesquisadores, conservação imprópria do alimento com o uso de gelo (água) contaminado, condições de armazenamento que favorecem a contaminação cruzada do pescado com outros alimentos que apresentam uma microbiota intrínseca distinta da encontrada na carne do peixe e a contaminação terciária mediada por moscas são fatores que promovem inoculação e a contaminação dos produtos seguida de deterioração do alimento e potencial aumento dos casos de intoxicação alimentar entre os consumidores de pescado.

A contaminação das 14,28% amostras analisadas também pode ser atribuída a fatores ambientais da área geográfica trabalhada em que se constatou *in locu* poluição devido ao lançamento dos esgotos domésticos, criação de animais domésticos de interesse pecuário em condições sanitárias precárias, a exemplo de suínos, bubalinos e bovinos. Para Ali (2014), a contaminação dos *hábitats* aquáticos por esgoto e a microbiota permanente e transitória dos peixes pode ser a origem da contaminação por bactérias do gênero *Staphylococcus*. Mas, o referido pesquisador cita que é muito difícil fazer a correta distinção da origem dessas bactérias em peixes.

As quatro amostras com padrão microbiológico intermediário e as duas com padrão inaceitável denotam uma situação preocupante considerando o fato dos ECoP serem produtores de enterotoxinas termoestáveis em alimentos. Alimentos com perfil microbiológico intermediário necessitam de um processamento mais rigoroso, no que se refere aos métodos de conservação a frio e às técnicas de cocção, para evitar a multiplicação e sobrevivência microbiana. Outro aspecto que deve ser levado em consideração para não ocorrer uma

recontaminação com esses micro-organismos é a higiene, tanto do pescador/manipulador quanto dos utensílios e equipamentos utilizados na captura.

Dos 42 peixes analisados foram obtidos 18 isolados de *Staphylococcus* sp. em meio seletivo e testados quanto à produção das enzimas catalase e coagulase. Nesses isolados foi possível estudar a relação entre a morfologia e a capacidade de produção de ambas as enzimas em que se constatou que 33,34% (n= 6) dos isolados produziram a enzima coagulase e 100% (n= 18) a enzima catalase. Do total de isolados, 33,34% (n= 6/18) eram estafilococos coagulase positiva (ECoP) e 66,67% (n= 12/18) eram coagulase negativa. Para Silva e Gandra (2004), entre os ECoP, *Staphylococcus aureus* é a espécie mais prevalente em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica; entretanto, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus* também podem produzir enterotoxinas e já foram envolvidas em surtos.

Este é o primeiro estudo realizado no estado do Maranhão sobre a detecção de genes enterotoxigênicos em peixes neotropicais oriundos de ambiente natural. As amostras em estudo continham contagens de *Staphylococcus* sp. superiores a 10^2 UFC/g e foram pesquisados apenas os genes codificadores de enterotoxinas clássicas (*sea* a *see*) uma vez que pesquisadores relatam serem esses os responsáveis por 95% dos casos de intoxicação estafilocócica em seres humanos (CHA *et al.*, 2006; ZOCHE *et al.*, 2009) e o gene *FemA*.

Dos seis isolados de ECoP, três continham genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas SEC e SEE e, em um isolado de estafilococos coagulase negativa foi detectado o gen *see* produtor de enterotoxina estafilocócica (SE) (Tabela 3).

Tabela 3. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em *Cichlasoma bimaculatum* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* provenientes de ambiente alagável da Comunidade Quilombola de Ponta Bonita, município de Anajatuba, estado do Maranhão

	Isolados		Genes Enterotoxigênicos					
	Total (n)	Genes Enterotoxigênicos (n)	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>FemA</i>
Estafilococos coagulase positiva	06	03	-	-	+	-	+	-
Estafilococos coagulase negativa	12	01	-	-	-	-	+	-
Total	18	04	00	00	01	00	04	00

Onde: n= quantidade de isolados.

No Brasil, pesquisas realizadas em diferentes regiões do país, mostram a ocorrência de *S. aureus* em pescado (DAMS; BEIRÃO; TEIXEIRA, 1996; HILUY *et al.*, 1996). No estado de Santa Catarina, Ayulo, Machado e Scussel (1994), relataram a produção de enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SED e SEB) em porção muscular de mariscos. Cunha Neto, Silva e Stamford (2002) detectaram *Staphylococcus* enterotoxigênico em peixe cozido e camarão e atribuíram que a manipulação foi a fonte de contaminação das amostras.

Ainda no Brasil, Veras *et al.* (2008) constaram a presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas em 33,3% (5/15) dos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa oriundos de produtos lácteos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, ocorridos no período de 1998 a 2002, no estado de Minas Gerais. Em outro estudo, Cunha *et al.* (2002) pesquisaram genes codificadores de enterotoxinas em cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa e verificaram a presença dos genes *sea* (15%) e *sec* (5%) o que se assemelha aos resultados do presente estudo.

Os genes amplificados, neste estudo, foram *see* (22,23%; 4/18) e *sec* (5,56%; 1/18). Esses resultados assemelham-se aos valores obtidos por Zoche (2008) que encontraram maior percentual dos genes codificadores das enterotoxinas SEE e SEC nas amostras de queijo analisadas. E, 75% (n= 3/4) dos genótipos obtidos, correspondiam a combinações de genes *sec*

+ see. Estirpes de *S. aureus* com padrões de enterotoxinas diversificados têm sido frequentemente reportados nas pesquisas (MAC LAUHLIN *et al.*, 2000; OMOE *et al.*, 2002; ROSEC; GIGAUD, 2002). Para Omoe *et al.* (2005), a produção de enterotoxinas clássicas é aumentada quando o isolado possui combinados de genes.

Estudos têm demonstrado a relação entre a fonte de contaminação e o tipo de enterotoxina estafilocócica (SE) produzida por estirpes de *Staphylococcus* isoladas de alimentos e a obtenção dessas informações permite inferir a provável fonte de contaminação de um determinado alimento. A produção da enterotoxina SEC, por exemplo, está relacionada com contaminações proveniente de animais, como os bovinos (TOLLERSRUD *et al.*, 2000; STEPHEN *et al.*, 2001; NÁJERA-SÁNCHEZ *et al.*, 2003; JORGENSEN *et al.*, 2005).

Na área geográfica de captura dos peixes estudados é comum a criação de animais domésticos e de interesse pecuário (bovinos, bubalinos e suínos) soltos nos campos inundáveis. Logo, é possível inferir que esta provável fonte de contaminação é congruente com a relatada na maioria dos estudos (ADESIYUN; LENZ; SCHAAL, 1998; TOLLERSRUD *et al.*, 2000; STEPHEN *et al.*, 2001; NÁJERA-SÁNCHEZ *et al.*, 2003; FUEYO *et al.*, 2005; JORGENSEN *et al.*, 2005), todavia, investigações feitas no Brasil revelaram que apesar de linhagens de *S. aureus* de origem bovina parecerem produzir mais SEC, o predomínio é de linhagens produtoras de genes codificadores de SED (CARDOSO *et al.*, 1999).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta diagnóstica de alta sensibilidade e precisão, mesmo em amostras com baixa concentração de *Staphylococcus*, na detecção de genes codificadores de SE's (SANTILIANO *et al.*, 2011), contudo, é impossível afirmar que todas as quatro amostras gene-positivas, identificadas nesse estudo, possam causar intoxicação alimentar. Mas, a técnica utilizada possibilitou a detecção do potencial genético para a produção de enterotoxinas, o que reforma a importância desta técnica diagnóstica.

O gênero *Staphylococcus* é responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções alimentares no mundo. A contaminação por *Staphylococcus* sp., pode ocorrer em todos os estágios de produção ou estocagem do alimento, por cepas de origem ambiental ou humana. Encontrando condições favoráveis como aquecimento ou refrigeração em temperatura inadequada, este grupo de micro-organismo cresce e pode produzir toxinas. O controle das enterotoxinas é possível desde que se observe as boas práticas sanitárias e de higiene nos estágios de obtenção, produção, estocagem e manuseio de alimentos, pois a proteção ao público contra esta doença ocasionada por este produto tóxico é uma obrigação de profissionais da área de alimentos e da saúde (SILVA; GANDRA, 2004).

Na área estudada, a economia se baseia na agricultura de subsistência, pecuária extensiva, extrativismo vegetal e na pesca artesanal. Esta última tem se mostrado fortemente impactada por mudanças sociais e ecológicas, pois, costata-se perda de espécies de peixes e de cardumes ano após ano, mesma situação citada por Amaral *et al.* (2015). Em grande parte do estado do Maranhão, além da existência de inúmeros impactos ambientais (desmatamento e poluição devido ao lançamento dos esgotos domésticos entre outros), cita-se, ainda, a criação e animais domésticos de interesse pecuário em condições sanitárias precárias, a exemplo de suínos, bubalinos e bovinos. Esses fatores, combinados ou não, podem ser responsáveis por danos irreparáveis à biodiversidade aquática.

Condições ambientais, atividades antrópicas, falta de higiene do pescador e dos apetrechos de pesca que são variáveis críticas e podem estar presentes em toda a cadeia produtiva, perpassando pela captura ou despesca até a mesa do consumidor acrescidas das condições intrínsecas dos peixes podem aumentar a proporção de patógenos presentes nos peixes e resultar em doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHAs).

CONCLUSÕES

- Com base no padrão brasileiro da qualidade microbiológica de alimentos, foi constatado baixo percentual de peixes com padrão intermediário e inaceitável para consumo.
- A técnica molecular utilizada permitiu a detecção dos genes *sec* e *see*, este último gene tantos em isolados de estafilococos coagulase positiva como em isolados de estafilococos coagulase negativa.
- Animais domésticos, como bubalinos e bovinos, e o ambiente contaminado podem ser a origem mais provável dos isolados de *Staphylococcus* nas amostras avaliadas.
- Mesmo com baixos percentuais de contaminação deve-se buscar melhoria na qualidade dos produtos de origem pesqueira na área avaliada e utilização de temperaturas adequadas para o preparo desse alimento de origem animal com vistas a evitar a intoxicação estafilocócica.

REFERÊNCIAS

- ADESIYUN, A. *et al.* Exfoliative toxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals and humans beings in Nigeria. **Microbiologica**, v. 14, p. 357-362, 1991.
- ALI, H. H. Isolation and identification of Staphylococcus bacteria from fish of fresh water and its antibiotics sensitivity in mosul city. **Basrah Journal of Veterinary Research**, v. 1, p. 33-42, 2014.
- AMARAL, M. T. *et al.* Aspectos relacionados à pesca artesanal do Rio Curiú e lago tapera, Macapá-AP. **Enciclopédia Biosfera**, v.11 n.22, p. 2852-2861, 2015.
- AYULO, A. M. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. **International journal of food microbiology**, v. 24, (1-2), 1994.
- BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal Bacteriology**, v. 171, p. 4799-4806, 1989.
- BERGEN-BACHI, B. *et al.* FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Molecular cloning and characterization. **Molecular and General Genetics**, v. 219, p. 263–269, 1989.
- BETLEY, M. J.; MEKALANOS, J. J. Staphylococcal enterotoxigen A is encoded by phage. **Science**, v. 229, p. 185-187, 1985.
- BOHACH, G. A.; SCHILIEVERT, P. M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular Gene Genetic**, v. 209, n. 1, p. 15-20, 1987.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2015. Disponível em <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/ApresentaodadosgeraisDTA2015.pdf>. Acesso em 10 de março de 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos VE-DTA**. Brasília, 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>. Acesso em: 22 fev. de 2022.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2019. Disponível em: www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/U_IN-MS-ANVISA-60_231219. Acesso em: 22 fev. de 2022.

BUJJAMMA, P.; PADMAVATHI, P. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in fish samples of local domestic fish market. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, p. 427-433, 2015.

CARDOSO, H. F. T. *et al.* Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 347-349, 1999.

CHA, J. O. *et al.* Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 864-871, 2006.

COSTA, A. L. P. da. *et al.* Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada em feira pública. **PUBVET**, v. 12, n. 5, a, p. 1-6, 2018.

COUCH, J. L.; SOLTIS, M. T.; BETLEY, M. J. Cloning and nucleotide sequence of the type e staphylococcal enterotoxin gene. **Journal Bacteriology**, v. 170, p. 2954-2960, 1988.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M. da; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Food Science and Technology**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

DAMS, R.I.; BEIRÃO, L.H.; TEIXEIRA, E. Avaliação da qualidade microbiológica da pescadinha (*Cynoscion striatus*) inteira e em filés nos principais pontos críticos de controle de uma indústria de pescado congelado. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 14, n. 2, p. 151-162, 1996.

DOWNES, F. P.; ITO, H. (eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

FORNARI, C. A. C. *et al.* Estudo sobre os hábitos alimentares e de consumo de pescado da população de Palmas (TO). **Revista Desafios**, v. 04, n. 04, 2017.

FUEYO, J. M. *et al.* Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, 243: 447-454, 2005.

HENNEKINNE, J. *et al.* 2010. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?. **Toxins**, v. 2, p. 2106-2116, 2010.

HILUY, D. J.; PINHEIRO, H. C. G.; MOURÃO, A. F.; MACEDO, E. P.; CARVALHO, M. L. M.; PINTO, A. Avaliação da qualidade dos produtos pesqueiros no estado do Ceará. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 45, p. 37, 1996.

JONES, C. L.; KHAN, S. A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriology**, v. 166, p. 29-33, 1986.

JORGENSEN, H. J. *et al.* Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal Applied Microbiology**, v. 99, p. 158–167, 2005.

KOPPEN, W. **Climatologia: com um estudio de los clima de latierra**. México, Fondo de Cultura Economia, 1948. 478p.

LIMA D. P. *et al.* Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Brasil. **Acta Amazônica**, p. 405-14, 2015.

MAC LAUHLIN, J. *et al.* The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 479-488, 2000.

NÁJERA-SÁNCHEZ, G. *et al.* Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of Bibliografía 56 enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1055–1062, 2003.

NOVOTNY, L. *et al.* Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. A review. **Veterinari Medicina**, v. 49, p. 343-358, 2004.

OMOE, K. *et al.* Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of enterotoxins productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh or sei genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 857-862, 2002.

OMOE, K. *et al.* Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, p. 191-198, 2005.

PLATA, K., ROSATO, A. E.; WEGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, p. 597-612, 2009.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 61-70, 2002.

SALES, L. M.; SILVA, T. M. *Staphylococcus aureus* metilina resistente: Um desafio para a saúde pública. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, p. 1-13, 2012.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.

SANTILIANO, F. C. *et al.* Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET**, v. 5, n. 3, p. 1-15, 2011.

SECRETARIA ESTADUAL EXTRAORDINÁRIA DE IGUALDADE RACIAL. **Governo participa de certificação de comunidades quilombolas em Anajatuba**. 2018. Disponível em: <http://www.igualdaderacial.ma.gov.br/governo-participa-de-certificacao-de-comunidades-quilombolas-em-anajatuba/>. Acesso: 03 jan. 2022.

SILVA, W. P. da; GANDRA, E. Á. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 32-40, 2004.

SILVA JÚNIOR, A. C. S. *et al.* Avaliação microbiológica de pescada branca (*Cynoscion* spp.) comercializada na feira do pescado, Macapá AP. **Higiene Alimentar**, v. 29, p. 108-112, 2015.

STEPHEN, R. *et al.* 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in northeast Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 373-382, 2001.

TOLLERSRUD, T. *et al.* Characterization of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica**, v. 108, p. 565-572, 2000.

VERAS, J. F. *et al.* A study of enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 410-415, 2008.

ZOCHE, F. ***Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos: PCR para detecção em queijo minas frescal e caracterização do agrupamento egc em isolados obtidos em alimentos de origem animal.** 2008. Dissertação (Mestrado em em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) . Universidade Federal de Pelotas. Brasil.

ZOCHE, F. *et al.* PCR Multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciência**, v. 34, n. 7, p. 487-491, 2009.

8. CONCLUSÃO GERAL

Por meio dos resultados obtidos nessa pesquisa é possível concluir que o ambiente alagável da comunidade quilombola de Ponta Bonita, apresenta parâmetros físico-químicos e microbiológicos em desconformidade com os padrões disciplinados em legislações ambientais e de alimentos. Os resultados do estudo demonstram que ocorre depreciação ambiental da qualidade da água no tocante aos parâmetros físico (turbidez), químicos (oxigênio dissolvido, sólidos totais dissolvidos, ferro e cloretos) e microbiológicos (coliformes totais e *E. coli*) das lagoas marginais. Pontua-se que tais impactos em algum momento podem contribuir para o estresse animal e, promover, queda na imunidade e predisposição a ocorrência de doenças de diferentes etiologias, com comprometimento da base da alimentação dos quilombolas da comunidade de Ponta Bonita.

A diversidade de micro-organismos identificados em *H. unitaeniatus* e *C. bimaculatum* congregou: (i) micro-organismos indicadores higiênico-sanitários da legislação brasileira – *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva; (ii) micro-organismos indicadores do tempo útil de conservação - mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e bolores e leveduras; (iii) micro-organismos indicadores de condições higiênicas insatisfatórias – coliformes totais e coliformes termotolerantes. A presença desses agentes juntamente com os genótipos de *E. coli* diarreogênica e de estafilococos coagulase positiva demonstram desequilíbrio no ambiente estudado.

Cabe ressaltar que ações que permitam o monitoramento na área de estudo é de fundamental importância uma vez que contribuem para o alcance das metas dos ODS. Visando assegurar a saúde e promover o bem-estar destas comunidades (ODS 2), assegurando a mesma segurança alimentar e nutricional, erradicação da pobreza (ODS 3), o aproveitamento consciente dos recursos pesqueiros (ODS 12), geração de renda para as economias locais dos povos tradicionais. O que permite o subsídio e a instrumentalização de tomadas de decisões por parte do poder público e privados, afim de melhorias das condições de vida destas comunidades, com melhor gestão dos recursos hídricos e a promoção do saneamento (ODS 6). Considera-se, portanto, que estudos desta natureza são importantes por contribuir para adoção de medidas de manejo afim de evitar desequilíbrio aos ecossistemas aquáticos e também fomentar os objetivos de desenvolvimento sustentável.

Diante do exposto, ressalta-se que o consumo do pescado adequadamente preparado e cozido, a educação dos consumidores e pescadores sobre os fatores de contaminação cruzada, a conscientização da população no consumo inadequado de peixes mal-cozidos e outras

medidas no preparo podem reduzir alguns problemas relacionados ao consumo de peixes oriundos de ambiente impactado, como o avaliado e comprovado nos resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras de água e peixes analisadas.

Do ponto de vista da saúde pública, torna-se importante e necessária uma campanha educacional dirigida aos quilombolas para conscientização sobre as boas práticas de manejo nestes ambientes e a necessidade do monitoramento microbiológico e físico-químicos periódico do ambiente alagável.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, P. R.; BACHA, C. J. C. Evolução da atividade pesqueira no Brasil: 1960-1994. **Teoria e Evidência Econômica**, v. 7, n. 13, p. 9-24, 1999.

ADESIYUN, A. A.; LENZ, W.; SCHAAL, K. P. Exfoliative toxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals and humans beings in Nigeria. **Microbiologica**, v. 14, p. 357-362, 1991.

AGOSTINHO, A. A. *et al.* Biodiversity in the high Paraná River floodplain. In: GOPAL, B.; JUNK, W. J.; DAVIS, J. A. **Biodiversity in wetlands: assessment, function and conservation**, Backhuys Publishers: Leiden, The Netherlands. p.89-118. 2000.

ALI, H. H. Isolation and identification of *Staphylococcus* bacteria from fish of fresh water and its antibiotics sensitivity in mosul city. **Basrah Journal of Veterinary Research**, v. 1, p. 33-42, 2014.

ALMEIDA, A. W. B. **Os quilombolas e a base de lançamentos de Alcântara**. Brasília: IBAMA, 2006.

ALMEIDA, M. C. P. O movimento quilombola na Baixada Ocidental Maranhense: história, memória e identidade de comunidades remanescentes de quilombos em Pinheiro. In: **XXVII Simpósio Nacional de História**, 1, 2013, Natal-RN. Anais. Natal-RN: ANPUH Brasil, 2013, p.1-13.

ALMEIDA, Z. S. de. **Os recursos pesqueiros marinhos e estuarinos do Maranhão: biologia, tecnologia, socioeconomia, estado da arte e manejo**. 2008. 286 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2008.

AMARAL, M. T. *et al.* Aspectos relacionados à pesca artesanal do Rio Curiú e lago tapera, Macapá-AP. **Enciclopédia Biosfera**, v.11 n.22, p. 2852-2861, 2015.

AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; SCHIAVANO, G. F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 780-788, 2012.

ANGELES, G. R. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud Pública de México**, v. 44, n. 5, p. 464-475, 2002

ARANDA, K. R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I. C. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5849-5853, 2004.

ARRUDA, J. C. *et al.* Conhecimento ecológico tradicional da ictiofauna pelos quilombolas no Alto Guaporé, Mato Grosso, Amazônia meridional, Brasil. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Hum.**, Belém, v. 13, n. 2, p. 315-329, 2018.

ASSIS, L. Alimentos Seguros: **Ferramentas para Gestão e Controle da Produção e Distribuição**. São Paulo: Editora Senac, 2014.

AZEVEDO, R. A. B., AGUIAR, M. V. A., COVEZZI, M. **Ambiente e sociedade na Bacia do Alto Paraguai (MT)**. In: Pequenos produtores da Zona Bragantina (PA) (Nitsch, M., Kasper, A. eds.), Brasília: MCT/CNPq. (Estudos dos impactos humanos nas florestas inundadas nos Trópicos), 1998, p. 37-60.

AYULO, A. M. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. **International journal of food microbiology**, v. 24, (1-2), 1994.

BALABAN, N.; RASSOLY, A. Staphylococcal enterotoxin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2000.

BAQUI, A. H. *et al.* Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladesh children less than 5 years of age. **Journal of Infectious Diseases**, v. 166, p. 792-796, 1992.

BARBOSA, M. M. C. *et al.* **Ocorrência de *Escherichia coli* patogênicas em pescapagues**. 2010. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.iwra.org%2Fmember%2Fcongress%2Fresource%2FPAP00-4851.pdf&clen=253099&chunk=true. Acesso em: 22 fev. de 2022.

BARROS, F. B. *et al.* A tradição da pesca no território Sesmaria do jardim, Maranhão: conflitos socioambientais e estratégias de mobilização. **Revista de Antropologia**, n. 53, p.128-152, 2019.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal Bacteriology**, v. 171, p. 4799-4806, 1989.

BENNET, R.W. The biomolecular temperaments os staphylococcal enterotoxin in thermally processed fodd. **Journal Association Official Analytical Chemistry International**, v. 75, p. 6-12, 1992.

BENSON, T. E. *et al.* X-Ray Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* femA. **Structure**, v. 10, p. 1107-1115, 2002.

BERNARDI, C. C. **Conflitos sócio-ambientais decorrentes da bubalinocultura em territórios pesqueiros artesanais: o caso de Nova Olinda do Maranhão**.2005. (Dissertação de Mestrado) - Brasília: Universidade Católica de Brasília, 2005.

BERNARDES, R. H. *et al.* A pesca artesanal: atividade integradora dos sistemas agroecológicos em comunidade quilombola na Amazônia Maranhense, Brasil. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.

BERGEN-BACHI, B. *et al.* FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Molecular cloning and characterization. **Molecular and General Genetics**, v. 219, p. 263–269, 1989.

BETLEY, M. J.; MEKALANOS, J. J. Staphylococcal enterotoxican A is encoded by phage. **Science**, v. 229, p. 185-187, 1985.

BLANCO, M. *et al.* Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene (*eae*). *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p.645–651, 2004.

BOHACH, G. A.; SCHILIEVERT, P. M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular Gene Genetic**, v. 209, n. 1, p. 15-20, 1987.

BONFA NETO, D. O estado mundial da pesca e aquicultura em 2020. **Mares: revista de Geografia e Etnociências**, v. 2, n. 2, p. 111-114. 2020.

BORGES, A. *et al.* **Fluviometria**. In Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai (Pantanal) – PCBAP Hidrosedimentologia do Alto Paraguai, Brasília: Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. 1997. v.2, t.2A, pp. 309-430.

BORGES, M. *et al.* Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1431-1438, 2008a.

BORGES, M. *et al.* *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 71-86, 2008b.

BOUCHRIF, B. *et al.* Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 28, n. 3, p. 35-40. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019a. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-331-de-23-de-dezembro-de-2019.pdf/view>. Acesso em: 22 fev. de 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019b. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2019. Disponível em: www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/U_IN-MS-ANVISA-60_231219. Acesso em: 22 fev. de 2022.

BRASIL. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidas**. 2011. Disponível em: http://www.clean.com.br/downloads/Guia_Nacional_de_Coleta_e_Preservacao_de_Amostras_.pdf. Acesso: 03 fev. 2022.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução no 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 18 Mar. 2005. Seção Resoluções, p. 19, 2005.

BRASIL. Lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional. Lei N° 11.346 de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 de setembro de 2006. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/111346.htm. Acesso em: 22 fev. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. 2010. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf. Acesso em: 21 fev. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2015. Disponível em <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/ApresentaodadosgeraisDTA2015.pdf>. Acesso em 10 de março de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos VE-DTA**. Brasília, 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>. Acesso em: 22 fev. de 2022.

BRASIL. Presidência da República. Decreto n° 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei n° 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei n° 7.889 de 23 de novembro de 1989 que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 de março de 2017. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/D9013.htm. Acesso em: 22 fev. de 2022.

BRENNAN, F. P. *et al.* Insights into the low-temperature adaptation and nutritional flexibility of a soil-persistent *Escherichia coli*. **Fems Microbiology Ecology**, v. 84, n. 1, p. 75-85, 2013.

BRUNO, L. M. *et al.* Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza (CE). **Boletim do centro de pesquisa de processamento de alimentos**, v. 23, n. 1, p. 75- 84, 2005.

BUJJAMMA, P.; PADMAVATHI, P. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in fish samples of local domestic fish market. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, p. 427-433, 2015.

CARDOSO, H. F. T. *et al.* Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 347-349, 1999.

CALHEIROS, D. F., OLIVEIRA. M. D. O rio Paraguai e sua planície de inundação o Pantanal Matogrossense. **Ciência & Ambiente**, v. 41, p. 113- 130, 2010.

CAMPOS, M. M. *et al.* A dinâmica da pesca artesanal na Bacia de Campos: organização social e práticas em economia solidária entre os pescadores artesanais. **Revista Crítica de Ciências Sociais**, v. 116, p. 71-102. 2018.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. *Salmonella*. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/>. Acesso em: 22 fev. de 2022.

CHA, J. O. *et al.* Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 864–871, 2006.

CHAVES, N. P. *et al.* Condições higiênico-sanitárias da bebida guaraná da Amazônia comercializada por vendedores ambulantes na cidade de São Luís, MA. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-7, 2015.

CHENG, D. *et al.* PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 4, p. 320-328, 2006.

CHRISTOFOLETTI, A. Geomorfologia fluvial. São Paulo: **Edgard Blucher**, Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo, 1981.

CLEMENTS, A. *et al.* Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, 71-87, 2012.

CONEDERA, G. *et al.* Verocytotoxin- producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.96, p.67-73, 2004.

CONWAY, T.; KROGFELT, K. A.; COHEN, P. S. The life of commensal *Escherichia coli* in the mammalian intestine. **EcoSal Plus**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2004.

CORDEIRO, M. **Caracterização molecular de cepas de Staphylococcus aureus isoladas no Hospital Municipal de Ipatinga - MA**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

COSTA, A. L. P. da. Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada em feira pública. **PUBVET**, v. 12, n. 5, a, p. 1-6, 2018.

COSTA, C. L. **Sustentabilidade da pesca artesanal no lago de Viana, área de proteção ambiental da Baixada Maranhense**. 2006. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade de Ecossistemas) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2006.

COUCH, J. L.; SOLTIS, M. T.; BETLEY, M. J. Cloning and nucleotide sequence of the type e staphylococcal enterotoxin gene. **Journal Bacteriology**, v. 170, p. 2954-2960, 1988.

CROXEN, M. A. *et al.* Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 04, p. 822–880, 2013.

CUNHA, H. W. A. P.; SILVA, A. C. da. Caracterização sócio ambiental do rio Mearim na cidade de Arari – MA. **Revista Ecossistema**, v. 27, n. 1-2, p. 31-36, 2002.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M. da; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Food Science and Technology**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

DALL, A.M. *et al.* Severe outbreak of bovine neonatal diarrhea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology. **Brazilian journal of microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2547- 2553, 2021.

DAMS, R.I.; BEIRÃO, L.H.; TEIXEIRA, E. Avaliação da qualidade microbiológica da pescadinha (*Cynoscion striatus*) inteira e em filés nos principais pontos críticos de controle de uma indústria de pescado congelado. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 14, n. 2, p. 151-162, 1996.

DE JESUS, G. dos S. *et al.* Qualidade ambiental de água oriunda de lagoas marginais utilizadas para fins de pesca artesanal em Comunidade Quilombola Maranhense. In: CASTRO, A. C.; CARVALHO, A. C.; CARVALHO, A. V. (Org.). **Meio ambiente e a outra economia dos povos e comunidades tradicionais**. Guarujá: Científica Digital, 2022. p. 61-72.

DIEGUES, A. C. Biodiversidade e comunidades tradicionais no Brasil. São Paulo: **NUPAUB**, 1999.

DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

DRAEGER, C. L. *et al.* Epidemiological Surveillance System on Foodborne Diseases in Brazil after 10 - Yers of Its Implementation: Completeness Evaluation. **International Journal of Environmental Reserach and Public Health**, v. 15, p. 1-9, 2018.

DRUMOND, S. N. *et al.* Identificação molecular de *Escherichia coli* diarreio gênica na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó na região do Alto Rio Doce. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v.23 n.3, 579-590, 2018.

DUMKE, R. *et al.* Detection of phages carrying the Shiga toxin 1 and 2 genes in waste water and river water samples. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 1p.48-53, 2006.

EFSA. European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. **European Food Safety Authority Journal**, v. 8, n. 1, 1496, 2010. 368p.

EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. European Food Safety Authority. **EFSA Journal**, v. 12, n. 2, p. 3547, 2014.

FAIRBROTHER. *et al.* *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Anim Health Research Review**, v. 6, n.1, p. 17-39, 2005.

FALKOW, S. **The evolution of pathogenicity in *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella***. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2nd ed. Washington: Neidhardt and others Press, 1996. 2723-2769.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture. Sustainability in action.** Roma, 2020. 244p.

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture. Sustainability in action.** Roma, 2021. 244p.

FARIAS, A. C. da S. FARIAS, R. B. A. Desempenho comparativo entre países exportadores de pescado no comércio internacional: Brasil eficiente?. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 03, p. 451-466, 2018.

FAÚLA, L. L.; SOARES, A. C. C.; DIAS, R. S. Panorama dos Surtos de Doenças de Transmissão Alimentar, ocorridos em Minas Gerais, Brasil, no período de 2010 a 2014. **Gerais: Revista de Saúde Pública do SUS/MG**. v. 3, n. 1, p.84-94, 2015.

FERNANDES, D. V. G. S. *et al.* *Salmonella* spp. in the fish production chain: a review. **Ciência Rural**, v. 48, n. 8, p. 1-11, e2018141, 2018.

FERRAZ DE LIMA, J. A. Recursos Pesqueiros em ambientes inundáveis (rio Cuiabá: Pantanal de Mato Grosso). **In: X Encontro Brasileiro de Ictiologia** (pp. 302-310). **Anais... Anais do X EBI**. 1993.

FERREIRA, J. M. C. N. **Genes enterotoxigênicos e resistência a antibióticos em isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* de origem alimentar**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar) - Instituto Politécnico de Castelo Branco.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 2, p. 136-69, 1997.

FONTE, A. I. E. da. **Queijo de Coalho do Sertão Alagoano: Enterotoxigenicidade de *S. aureus* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 2012. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

FORNARI, C. A. C. *et al.* Estudo sobre os hábitos alimentares e de consumo de pescado da população de Palmas (TO). **Revista Desafios**, v. 04, n. 04, 2017.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu. 2002.

FRANCO, B. D. G. M, LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. cap. 4, p. 33-81.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu. p. 192, 1ª ed, 2008.

FROESE, R.; PAULY, D. Editors. **FishBase**. 2016. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <http://www.fishbase.org>. Acesso em: 17 fev. 2022.

FUEYO, J. M. *et al.* Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, 243: 447-454, 2005.

GASPAROTTO, F. A. **Avaliação Ecotoxicológica e Microbiológica da água de nascentes urbanas no município de Piracicaba-SP**. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GAZAL, L. E. de S. *et al.* *Salmonella* sp. em peixes – qual a importância para sanidade em pescado? **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 24, ns.1/2, p. 55-64, 2018.

GENIGEORGIS, C.A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **International Journal of Food Microbiology**, v. 9, p. 327-360, 1989.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. **Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars**. 9th ed. Paris: Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella Institut Pasteur. 2007. Disponível em: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf. Acesso em: 22 fev. de 2022.

GUION, C. E. *et al.* Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1752-1757, 2008

GUNZBURG, S.T.; TORNIEPORT, N.G.; RILEY, L.W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1375-1377, 1995.

GUZMAN, M.C. *et al.* Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, v. 38, n. 9, p. 2367-2373, 2004.

GUZMAN, O. J.; *et al.* A. Diarrheal bacterial pathogens and multi-resistant enterobacteria in the Choqueyapu River in La Paz, Bolivia. **PloS one**, v.14, n. 1, 2019.

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: Gyles, C.L.; Prescott, J.F.; Songer, G.; Thoen, C. O (eds). **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4ed. New York: Wiley-Blackwell. 2010, 267-308p.

HARVARD. School of Public Health. The Nutrition Source. **Omega-3 Fatty Acids: an essential contribution**. 2012. Disponível em: <http://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/what-shouldyou-eat/omega-3-fats/index.html>. Acesso em: 22 fev. de 2022.

HILUY, D. J.; PINHEIRO, H. C. G.; MOURÃO, A. F.; MACEDO, E. P.; CARVALHO, M. L. M.; PINTO, A. Avaliação da qualidade dos produtos pesqueiros no estado do Ceará. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 45, p. 37, 1996.

HENNEKINNE, J. *et al.* 2010. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?. **Toxins**, v. 2, p. 2106-2116, 2010.

HUBER, I. *et al.* Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 117-132, 2004.

HUGHES, C.; GILLESPIE, I. A.; O'BRIEN, S. J. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. **Food Control**, v. 18, n. 7, p. 766-772, 2007.

HUSS H. H., ABABOUCHE, L.; GRAM, L. **Assessment and management of seafood safety and quality**. FAO Fish. Tech. Paper 444, 2003. 230p.

ISAAC. V. J. *et al.* **Síntese do estado de conhecimento sobre a pesca marinha e estuarina do Brasil**. In: ISAAC. V. J. *et al.* (Org.) **A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século XXI: recursos, tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais**. Belém. Pará. 2006. p. 181- 186.

JABLONSKI, J. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAL, L.R.; MONTEVILLE, T.J. (eds). **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington DC: ASM Press, 2001. cap. 19, p. 411-434.

JARRAUD, S. *et al.* Egc, a highly prevalent operon of enterotoxins gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 669-677, 2001.

JOHNSON, A. M. *et al.* Heat-Labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells. **Journal of Antimicrobiology**, v. 191, n. 1, p. 178-186, 2009.

JONES, C. L.; KHAN, S. A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriology**, v. 166, p. 29-33, 1986.

JORGENSEN, H. J. *et al.* Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal Applied Microbiology**, v. 99, p. 158–167, 2005.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p.123-140, 2004.

KOLENDA, R; BURDUKIEWICZ, M; SCHIERACK, P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. **Frontiers Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n.5, p. 23, 2015.

KOPPEN, W. **Climatologia: com um estudio de los clima de la tierra**. México, Fondo de Cultura Economia, 1948. 478p.

KUBITZA, F. O impacto da amônia, nitrito e do nitrato sobre o desempenho e a saúde dos peixes e camarões. **Panorama da Aquicultura**, v. 27, n. 164, p. 1-15, 2017.

KUHNERT, P.; BOERLIN, J.; FREY, P. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and environment. *FEMS Microbiology Reviews*, v.24, p.652-659, 2000.

LEAL, M. E. *et al.* Primeiro registro e aspectos ecológicos de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz, 1829) (Characiformes, Erythrinidae) como espécie introduzida na Bacia do Rio dos Sinos, RS, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 33-37, 2010.

LEIRA, M. *et al.* Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. **Pubvet**, v. 11, n. 1, p. 11-17, 2017.

LETERTRE, C. *et al.* Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 38-43, 2003.

LIENEMANN, T. *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O100:H: stx2 e in drinking water contaminated by waste water in Finland. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1239–1283, 2011.

LIMA D. P. *et al.* Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Brasil. **Acta Amazônica**, p. 405-14, 2015.

LINDER, C. E. **Salmonella spp. em sistema intensivo de criação de peixes tropicais de água doce. Botucatu: UNESP.** 2002. 61 f. Dissertação (Mestre em Vigilância Sanitária Animal) - Programa de PósGraduação em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

LIUSON, E. **Pesquisa de coliformes totais, fecais e Salmonella spp. em tilápias de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo.** 2003. 93 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2003.

LOIR, Y.; LE, BARON, F.; GAUTIR, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic Molecular Research**, v. 2, p. 63-76, 2003.

MACEDO, D.S; MARTINS, M.L; WEBER, M.L. Identificação das condições higiênico-sanitárias na comercialização de peixes em feiras livres na Zona Sul de São Paulo. **Life Style Journal**, São Paulo, SP, p. 23-30, 2015.

MAC LAUHLIN, J. *et al.* The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 479-488, 2000.

MAINIL, J. Fatores de virulência de *Escherichia coli*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1-2, p. 2-12, 2013.

MALACRIDA, A. M.; DIAS, V. H. C.; LIMA, C. L. Perfil epidemiológico das doenças bacterianas transmitidas por alimentos no Brasil. **II Simpósio de Produção Sustentável e Saúde Animal**, Umuarama, Paraná. 2017.

MALDONADO, F.; SANTOS, A. C. Cooperativas de pescadores artesanais: uma análise sob a perspectiva teórica. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, v. 8, n. 3, p. 323-333. 2006.

MARANHÃO. **Maranhão é um dos maiores produtores de peixe do nordeste**. 2019. Disponível em: <http://www.ma.gov.br/agenciadenoticias/desenvolvimento/maranhao-e-um-dos-maiores-produtores-de-peixe-do-nordeste>. acesso em: 08 mar. de 2022.

MARR, J.C.; LYON, J.D.; ROBERSON, J.R.; LUPHER, M.; DAVIS, W.C.; BOHACH, G.A. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. **Infection Immunology**, v. 61, p. 4254-4262, 1993.

MARTINS, P. **Análise da distribuição das espécies, da prevalência de genes de enterotoxinas e do perfil de resistência a antibióticos de isolados Estafilococos coagulase positiva de carne de frango resfriada e congelada**. 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MATEUS, L. A. F.; VAZ, M. M.; CATELLA, A. C. **Fishery and fishing resources in the Pantanal**. In: JUNK, W. J. *et al.* (Ed.) *The Pantanal: ecology, biodiversity and sustainable management of a large neotropical seasonal wetland*. Sofia: Pensoft Publishers, 2011. p. 621-647.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.

MELO, C. C. V. *et al.* Caracterização dos consumidores de peixe do município de Lavras, Minas Gerais. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v.72, n.3, p.178-184, 2015.

MELO, S. K. **Caracterização de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de lagoas do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais**. 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

MENDEZ-ARANCIBIA, E. *et al.* Prevalence of diferente virulence factors and biofilm production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara (Tanzania). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p. 985-989. 2008.

MERAZ, I. M. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* and diffusely adherent *E. coli* as likely causes of a proportion of pathogen-negative travelers' diarrhea--a PCR-based study. **Journal of Travel Medicine**, v. 15, n. 6, p. 412–418, 2008.

MILLAN, R. N. **Dinâmica da qualidade da água em tanques de peixes de sistema pesque-pague: aspectos físico-químico e plâncton**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). 2009. 100 f. Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal, São Paulo, 2009.

MIRANDA, K. *et al.* Pesticide residues in river sediments from the Pantanal Wetland, Brazil. **Journa of Environmental Science and Health**, v. 43, n. 8, p. 717-722, 2008.

MOCHEL, F. R., CASTRO, A. C. L. **Zoneamento Costeiro do Estado do Maranhão**. Laboratório de Hidrobiologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2003.

- MOHAMED, J. A. *et al.* Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.121-126, 2007.
- MONTEIRO, S.V. M.*et al.* First detection of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in the Mearim River Watershed, Maranhão State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 6, p.3869–3881, 2021.
- MONTELES, J. S.; FUNO, I. C. A.; CASTRO, A. C. L. Caracterização da pesca artesanal nos municípios de Humberto de Campos e Primeira Cruz – Maranhão. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, 23:65-74. 2010.
- MORITA, M. *et al.* **Utilização de indicadores bacterianos e a pesquisa de *Salmonella* spp. na avaliação da qualidade sanitária de águas de pesqueiros.** In: ESTEVES, K. E; SANT'ANNA, C. L. *Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo.* 1 ed. São Carlos: RIMA, 2006, p. 91-104.
- MUHLDORFER, I.; HACKER, J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. **Microbial Pathogenesis**, v. 16, n. 3. p. 171-81, 1994.
- MURATORI, M. C. S. *et al.* Qualidade sanitária de pescado “in natura”. **Higiene Alimentar**, v. 8, p. 50-54, 2004.
- MURGAS, L. D. S. *et al.* Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, v.6, p. 70-76, 2009.
- NADIMPALLI, M. *et al.* Meat and fish as sources of extended-spectrum β -lactamase–producing *Escherichia coli*, Cambodia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 1, p. 126-131, 2019.
- NAGY, B.; FEKETE P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p.443-454, 2005.
- NÁJERA-SÁNCHEZ, G. *et al.* Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of Bibliografia 56 enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1055–1062, 2003.
- NATARO, J.P; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, n. 1, p. 1-142, 1998.
- NGUYEN, R. N. *et al.* Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerging Infectious Diseases**, 2006.
- NOGUEIRA, E. M. S.; PEREIRA DE SÁ, M. F.: A pesca artesanal no baixo São Francisco: Atores, Recursos, Conflitos. 1a. ed. Petrolina PE: **SABEH**, 2015.
- NOGUEIRA, N. M. C. Estrutura da comunidade fitoplanctônica, em cinco lagos marginais do rio Turiaçu (Maranhão, Brasil) e sua relação com o pulso de inundação. São Carlos, SP: **UFSCAR**, 2003.

NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. **Microbes and infection**, v. 3, n. 7, p. 585-594, 2001.

NOVOTNY, L. *et al.* Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. A review. **Veterinární Medicína**, v. 49, p. 343-358, 2004.

NUNES, J. L. G. **Estimador da Produtividade para as Pescarias Artesanais do Rio Xingu**. Dissertação de mestrado. Belém, 2015.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, p. 299-304, 2000.

OCHOA, T. J. *et al.* Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from Periurban areas in Lima, Peru. **Clinical Infectious Disease**, v. 49, p.1694-702, 2009.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC. 17a ed. Gaithersburg, USA, 2003.

OLIVEIRA, P.S.G. **Estudo das várzeas visando o controle de cheias urbanas e a restauração ecológica: o caso do parque linear do Ribeirão das Pedras, em Campinas, SP**. 2004. Tese (Doutorado em engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas. São Paulo.

OLIVEIRA, M. G. *et al.* Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as na important reservoir of shiga toxin- producing *Escherichia coli* in Brazil. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 73, n. 18, p. 5945-5948, 2007.

OLIVEIRA, M. G. *et al.* Diversity of virulence profiles shiga toxin- producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 139-146, 2008.

OLIVEIRA, S. A. L. **Pesquisa de helmintos em musculatura e serosa abdominal de peixes de importância comercial capturados no litoral norte do Brasil**. 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2005.

OMOE, K. *et al.* Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of enterotoxins productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh or sei genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 857-862, 2002.

OMOE, K. *et al.* Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, p. 191-198, 2005.

ONOE, Y.; MORI, M. Amino acid requirement for growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. **International Journal of Food Microbiology**, 36, v. 77-82, 1997.

ONU. United Nations. Department of Economic and Social Affairs Population Dynamics. **World Population Prospects 2019**. 2020. Disponível em: <https://population.un.org/wpp/DataQuery/>. Acesso em: 22 fev. de 2022.

OPINTAN, J. Á *et al.* Carriage of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by older children and adults in Accra, Ghana. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 104, n. 7, p. 504–506, 2010.

ORWIN, P. M. *et al.* Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 360-366, 2001.

OSTROM, E. *Governing the commons: The evolution of institutions for collective action.* Cambridge university press. 1990.

PAKBIN, B.; BRÜCK, W.M.; ROSSEN, J.W.A. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A **Review. International Journal of Molecular Science**, v. 22, n. 18, p. 9922, 2021.

PAIVA, VALDIR. **Entenda por que a população de Anajatuba é 76% negra.** 2018. Portal Geledes. Disponível em: <http://www.geledes.org.br/entenda-por-que-populacao-de-anajatuba-e-76-negra/>. Acesso: 24 set. 2022.

PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** São Paulo: Mc Graw-Hill, v.1, p. 524, 1996.

PEREIRA, M. L., CARMO, L.; SANTOS, E. J.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL, M. S. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 559 – 561, 1996.

PEREIRA, P. R. M.; RODRIGUES, T. C. S.; VIEGAS, J. C. Diagnóstico ambiental e caracterização morfométrica das Microbacias Hidrográficas de Pedro do Rosário, Amazônia Maranhense (Brasil). **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 3, p. 153-163, 2016.

PESSOA, G.V.A.; SILVA, E.A.M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.32, p.97-100, 1972.

PINHEIRO, F. da S. *et al.* CD16 promotes *Escherichia coli* sepsis through an Fc γ R inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. **Nature Medicine**, v. 13, n. 11, p. 1368-1374, 2007.

PLATA, K.; ROSATO, A.; WEGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, p. 597-612, 2009.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. **Genus Salmonella.** In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria*, v. 2, 2nd ed. New York: Springer, 2005. p. 764-799.

POVILL, C.; LAZAR, A.; BONVICINO, C. R. Levantamento de agentes zoonóticos encontrados em pequenos marsupiais da América do Sul. **Heringeriana**, v. 11, n. 2. p. 13-32, 2017.

RAHIMI, E. E A; FOROUGH. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. **Veterinarski arhiv**, v. 83, n. 1, p. 23 – 30, 2013.

RAJENDRAN, P. *et al.* Pathotypes of diarrhea genics *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 2, p. 117-22, 2010.

RAMALHO, C. W. N. Os possíveis impactos dos vazamentos de óleo nas comunidades pesqueiras artesanais em Pernambuco: um breve e provisório balanço. **Recife: Núcleo de Estudos Humanidades, Mares e Rios (NUHUMAR) – PPGS/UFPE**. p. 01-05, 2019.

RAMIRES, M. *et al.* A pesca e os pescadores artesanais de Ilhabela (SP), Brasil. **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 38, n. 3, p.231-246, 2012.

RASKO, D. A. *et al.* The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 20, p. 6881-6893. 2008.

REID, S.D.; BETTING, D.J.; WHITTAM, T.S. Molecular Detection and Identification of Intimin Alleles in Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 8, p. 2719-2722, 1999.

RESENDE, E. K. **Os pulsos de inundação e a produção pesqueira na Bacia do rio Taquari**. In: Impactos Ambientais e Sócio-econômicos na Bacia do Rio Taquari – Pantanal In: GALDINO, S.; VIEIRA, L. M.; PELLEGRIN, L. A. (eds), Corumbá: Embrapa Pantanal, 2005, p. 261-293.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 61-70, 2002.

SALES, L. M.; SILVA, T. M. *Staphylococcus aureus* metilina resistente: Um desafio para a saúde pública. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, p. 1-13, 2012.

SAMADPOUR, M. *et al.* Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 1038-1040, 1994.

SANTANA, E. H. W. *et al.* Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, 545-554, 2010.

SANTANA, E. H. W. **Determinação do perigo de consumo do leite cru relacionado a intoxicação estafilocócica**. Londrina, PR. 2008. 74 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Estadual de Londrina - UEL; 2006.

SANATH K.H. *et al.* Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 334-338, 2001.

SANTILIANO, F. C. *et al.* Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância. **Pubvet**, v. 5, n. 3, p. 1327-1342, 2011.

SANTOS, C.A.M.L. Doenças transmitidas por pescado no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, n.4, p. 234-241, 2010.

SANTOS, G. M.; SANTOS, A. C. M. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. **Estudos Avançados**, v. 19, n. 54, p. 165-182, 2005.

SANTOS, A. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, R. R. D. **Ocorrência, tipagem molecular e capacidade de colonização de amostras de Salmonella enterica em peixes nativos**. 2015. 86 f. Tese (Doutor em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SARTORI, A. G. O.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, n. p.83-93, 2012.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.

SCALLAN, E. *et al.* Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCALETISKY, I. C. *et al.* Association of patterns of *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with acute and persistent diarrhea. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 36, n. 1, p. 54-60, 1999.

SCALETISKY, I. C. *et al.* Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in northeast Brazil: a case-control study. **Jounal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 645-648, 2002.

SCHEMBRI, M. A.; KJAERGARRD, K.; KLEM, P. Global gene expression. In *Escherichia coli* biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 253-267, 2003.

SCHUROFF, P.A. *et al.* Qualidade microbiológica da água do Lago Igapó de Londrina - PR e caracterização genotípica de fatores de virulência associados a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 2, p.11-20, 2014.

SCORSAFAVA, M. A. *et al.* Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.2, p. 229-232, 2010.

SECRETARIA ESTADUAL EXTRAORDINÁRIA DE IGUALDADE RACIAL. **Governo participa de certificação de comunidades quilombolas em Anajatuba**. 2018. Disponível em:<http://www.igualdaderacial.ma.gov.br/governo-participa-de-certificacao-de-comunidades-quilombolas-em-anajatuba/>. Acesso: 03 fev. 2022.

SECRETARIA DE POLÍTICAS DE PROMOÇÃO DA IGUALDADE RACIAL. Programa Brasil Quilombola. 2012.

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

SILVA, L. R. et al. Endoparasite diversity and liver alterations in *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Cichlasoma bimaculatum* in a quilombola area in Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 31, n. 2, p. e000922, 2022.

SILVA, A. P. de. **Pesca artesanal brasileira. Aspectos conceituais, históricos, institucionais e prospectivos**. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2014. 32 p.

SILVA, M. L. da. **Pesquisa de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo**. 2007. 146 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2010. 632 p.

SILVA JÚNIOR, A. C. S. et al. Avaliação microbiológica de pescada branca (*Cynoscion* spp.) comercializada na feira do pescado, Macapá AP. **Higiene Alimentar**, v. 29, p. 108-112, 2015.

SILVA JUNIOR, C. H. L. et al. Dinâmica das queimadas na Baixada Maranhense. **Interespaço**, Grajaú/MA, v. 2, n. 5, 2016.

SILVA, W. P. da; GANDRA, E. Á. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 32-40, 2004.

SILVA, W.P.; GANDRA, E.A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.18, n.122, p.32-40, 2004.

SONG, T. et al. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. **FEMS Microbiology Letters**, v.243, n. 1, p. 259-263, 2005.

SOUZA, G. M. D. de. et al. Análise da qualidade microbiológica da água, ao longo da cadeia produtiva de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), na região norte do estado do Paraná. In: VII Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar (pp 1-5). Maringá. **Anais... Anais do VII EPCC**, 2011.

SU, Y. C.; WONG, A. C. Identification and Purification of a New Staphylococcal Enterotoxin, H. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1438– 1443, 1995.

STEPHEN, R. et al. 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in northeast Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 373-382, 2001.

TOLLERSRUD, T. *et al.* Characterization of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica**, v. 108, p. 565-572, 2000.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

TRAORÉ, A. N. *et al.* The Impact of Human Activities on Microbial Quality of Rivers in the Vhembe District, South Africa. **International journal of environmental research and public health**. V.13, n.8, p. 817, 2016.

TUTIJA, J.F. *et al.* Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* from calves in an important meat-producing region in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 16, n.6, p. 1030-1036, 2022.

UNITED NATIONS. 2015. Resolution adopted by the General Assembly: Transforming our world: The 2030 Agenda for Sustainable Development (A/RES/70/1). <https://undocs.org/en/A/RES/70/1>

UNITED NATIONS. 2021. 72nd Session of the General Assembly of the United Nations. <https://www.fao.org/americas/eventos/ver/pt/c/1450084/>.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

VAZZOLER, A.E.A.M, AGOSTINHO, A.A. & HAHN, N.S. A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná: **EDUEM**, Maringá. p.267-280. 1997.

VELÁZQUEZ, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-387, 2005.

VERAS, J. F. *et al.* A study of enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 410-415, 2008.

VIANA, D. C. *et al.* Descrição do pescado na Baixada Maranhense – São Bento/MA. **Revista Científica Semana Acadêmica**, v. 1, n. 42, p. 1-10, 2014.

VIDAL, M. *et al.* Multiplex PCR para diagnóstico de infecções entéricas associadas a *Escherichia coli* diarreica. **Journal of Clinical Microbiology**, V.42, n. 4, p. 1787-1789, 2004

VIDAL, M. *et al.* Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p.5362-5365, 2005.

VIDAL, M. F.; XIMENES, L. F. Produção de pescados na área de atuação do bnb. **Caderno Setorial ETENE**. v.4, p.91, 2019.

VIEIRA, N. *et al.* High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of Northern Coastal Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, p.528-533, 2007.

WONG, A. C. L.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: CLIVER, D.O; RIEMANN, H.P. Foodborne Diseases. **Amsterdam: Academic Press**, p. 231-248, 2002.

WU, S. *et al.* Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**.v. 8, n. 7, p. 1-20, 2016.

XIMENES, L. F. Produção de pescado no Brasil e no Nordeste Brasileiro. **Caderno Setorial ETENE**, v. 5, n. 150, p. 1-16, 2021.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**, 4. ed, Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

ZOCHE, F. ***Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos: PCR para detecção em queijo minas frescal e caracterização do agrupamento egc em isolados obtidos em alimentos de origem animal**. 2008. Dissertação (Mestrado em em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) . Universidade Federal de Pelotas. Brasil.

ZOCHE, F. *et al.* PCR Multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciência**, v. 34, n. 7, p. 487-491, 2009.

ZUNABOVIC, M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments - A review. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 2, p. 351-362, 2011.

ANEXO

ANEXO 1- CARTA DE ACEITE

[AVB] Manuscrito aceito para publicação na Acta Veterinaria Brasilica
2022-10-20 10:53 AM

Prezados autores,

Temos o prazer de informar-lhe que após avaliação por nossos revisores e editores do artigo corrigido "**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS ORIUNDAS DE ÁREA QUILOMBOLA MARANHENSE, BRASIL**" submetido à Acta Veterinaria Brasilica, decidimos **aceitá-lo para publicação em nosso periódico.**

Conforme determinado em nossa política editorial, informamos que após a comunicação do aceite do seu artigo para publicação, os autores devem proceder com o **pagamento da taxa de publicação em até 30 dias.**

Reforçamos que a Acta Veterinaria Brasilica **alterou seu formato para pagamento** de suas publicações e demais serviços. Os pagamentos deverão ser realizados **somente** via **depósito identificado (conforme dados que seguem abaixo)**. O valor da taxa de publicação é **R\$ 300,00/artigo.**

Banco: Caixa Econômica Federal

Agência: 1013

Operação: 003

Conta corrente: 439-0

Nome: Fundação Guimarães Duque

CNPJ: 08.350.241/0001-72

Todo pagamento deverá conter, obrigatoriamente, o **nome completo e CPF do pagante** (de qualquer um dos autores do trabalho). Caso contrário, não teremos como identificar o pagamento, o que pode resultar no indeferimento da publicação do manuscrito.

Após o pagamento, pedimos que **enviem a comprovação do depósito** para o Conselho Editorial (secretariaavb@gmail.com), identificando no e-mail o ID ou título do manuscrito para as devidas verificações.

Quaisquer dúvidas que surgirem durante esse processo devem ser comunicadas a este Conselho Editorial (secretariaavb@gmail.com).

Solicitamos que façam a revisão/versão do seu manuscrito para o inglês, pois a publicação ocorre especificamente nesse idioma.

Os autores são livres para escolher o melhor orçamento com empresas de confiança dos mesmos, prestadoras desse tipo de serviço, ou consultar um nativo na língua inglesa para fazer tal revisão e emissão de declaração.

Sendo assim, aguardaremos seu manuscrito corrigido, na língua inglesa, e com certificado/declaração de revisão.

Quando recebermos seu manuscrito em inglês, nossa equipe de revisores fará os devidos ajustes de formatação e edição e será enviada uma versão do mesmo para leitura de prova e posterior publicação.

Colocamo-nos sempre à disposição dos senhores para outros esclarecimentos e agradecemos por considerar a Acta Veterinaria Brasilica como forma de divulgar à comunidade acadêmica seus conhecimentos científicos e resultados de pesquisa.

Maria Rociene Abrantes

Atenciosamente,

Michelly Fernandes de Macedo

Editora Chefe da Acta Veterinaria Brasilica