

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Cleide Rosana Vieira Batista e aprovada pela comissão julgadora em 10.07.87.

Campinas, 10 de julho de 1987.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Banca

DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS DE SIGNIFICÂNCIA À SAÚDE PÚBLICA EM SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*, STEINDACHNER, 1798) "IN NATURA" CONSUMIDA NA REGIÃO DA GRANDE FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA.

CLEIDE ROSANA VIEIRA BATISTA

ORIENTADORA: DR<sup>a</sup> SONIA P. SALZBERG

06/87

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

CAMPINAS

1987

## E R R A T A

ONDE SE LÊ

LEIA-SE

Páginas:

vii - ABSTRACT	SUMMARY
xii - 22	27
03 - Bibliográficas	Bibliográfica
03 - Ambiental	Ambiente
03 - Desejos	Dejetos
11 - Baixas (68)	Baixas (66)
12 - Bergdoll	Bergdoll
13 - Gilbert (38)	Gilbert (39)
14 - Camarão (100), Ostras (22)	Camarão (103), Ostras (10)
14 - Contaminar	Contaminar
20 - N <	N >
21 - Ao barco	Do barco
22 - Com rede	Com barco
43 - Tabela 2	Tabela 1
44 - Com média de $1,0 \times 10^3$	Com média de $1,1 \times 10^3$
47 - Porto e Barcelona	Porto de Barcelona
54 - Distribuidor, média $1,0 \times 10^3$	Distribuidor, média $1,1 \times 10^3$
63 - COLWELL, R.R. et alii	COLWELL, R.R.; LOVELACE, T. E.; WAN, L.; KANEKO, T.; STALEY, T.; CHEN, P.K.; & TUBIASH, H.
64 - FOSTER, J.F. et alii	FOSTER, J.F.; FOWLER, J.L. & DACEY, J.
65 - GULASEKEHARAM, J. et alii	GULASEKEHARAM, J.; UELAUDA- PILLAI, T. & NILLES, G.R.
67 - LEON, E. et alii	LEON, E.; RIDELRON, J. M.; CABRERA, S.; CONSTANTINIDES, S.; LEE, T.C. & CHICHESTER, C.O.

A meus pais,

A meu marido, Antônio Henrique

A minha filha, Luana

com amor e gratidão.

## AGRADECIMENTOS

A meu marido, Antônio Henrique, pelo carinho, paciência, dedicação e apoio que permitiram a realização deste trabalho.

A Professora Dr<sup>a</sup> Sonia P. Salzberg, sinceros agradecimentos pela orientação e dedicação.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Técnico do Laboratório de Microbiologia, Carlos Amaral, pelo auxílio e dedicação prestada.

Ao Professor Fletes do Curso de Ciência da Computação e Estatística da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos ensinamentos e discussão dos dados estatísticos.

Ao amigo Daniel Barrera Arellano, cujo incentivo, apoio e amizade muito contribuiu para esta realização.

Ao colega e chefe do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Ernani Santana.

Aos colegas, Jaime e Aime Raquel, pelo auxílio na identificação da espécie da sardinha.

A aluna de pós-graduação Mariko Ueno, pelas análises de enterotoxinas estafilocócica.

Aos professores, Antônio de Melo Serrano, Emílio S. Contreras Guzman e Pilar R. de Massaguer, pelo enriquecimento deste

trabalho.

A colega, Vildes Maria Scussel, pela atenção e dedicação dispensada.

## RESUMO

Foram examinadas 50 amostras de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) coletadas em 25 peixarias e 3 amostras coletadas no porão do barco de 3 distribuidores de pescado, sendo que em um dos barcos foi coletada também uma amostra no momento da captura do pescado no mar. Assim, obtivemos um total de 54 amostras de sardinha que foram analisadas quanto a presença de microrganismos psicrófilos, mesófilos, coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Yersinia enterocolitica*. Cepas positivas de *Staphylococcus aureus* foram testadas quanto a produção de enterotoxina "B". Nas amostras coletadas em peixarias, 5 (10,0%) apresentaram contagem superior a  $1 \times 10^6$  UFC/G para microrganismos mesófilos e a mesma contagem para microrganismos psicrófilos em 20 (87,0%) amostras. Das amostras coletadas nos porões dos barcos, uma apresentou microrganismos mesófilos e duas apresentaram microrganismos psicrófilos com contagem superior a  $1 \times 10^6$  UFC/G. A presença de coliformes totais acima de  $1 \times 10^2$  NMP/G foi evidenciada em 25 (50,0%) amostras de peixarias e em três amostras de distribuidores. Nenhuma das amostras coletadas nas peixarias, bem como nos distribuidores apresentaram coliformes fecais acima de  $1 \times 10^2$  NMP/G. No entanto, uma amostra coletada na peixaria apresentou *E. coli* em 0,1 G de sardinha. Em 12 (24,0%) amostras provenientes de peixarias e uma proveniente de distribuidor foi isolado *S. aureus* em valor superior a  $1 \times 10^3$  UFC/G. Apenas um isolado foi positivo para enterotoxina "B". Somente uma amostra proveniente de uma peixaria apresentou *Salmonella* sp. Desta amos-

tra foram selecionados 5 isolados dos quais apenas 3 confirmaram ser *Salmonella* sp. A comparação entre a amostra coletada no momento da captura em alto mar e a outra no porão do mesmo barco, mostrou na última, uma contagem de microrganismos mesófilos dois ciclos logarítmicos acima da primeira e um ciclo acima da contagem de coliformes totais. Quanto a contagem de microrganismos psicrófilos a amostra do porão mostrou a redução de um ciclo logarítmico. *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*, não foram detectados em ambas as amostras. Em nenhuma das amostras pesquisadas foram detectados *Vibrio parahaemolyticus* nem *Yersinia enterocolitica*.

## ABSTRACT

Fifty samples of sardine (*Sardinella brasiliensis*) were obtained from 25 fish stores and three samples picked at the bottom deck of three fishing ships. In one of the ships a sample was directly picked at the capture in the sea, making a total of 54 samples. The samples were analyzed for psychrophilic, mesophilic, total coliforms, faecal coliformes, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrium parahaemolyticus* and *Yersinia enterocolitica*. The confirmed *S. aureus* were assayed for the presence of enterotoxin B. In 5 (10%) of the samples collected at the fish stores mesophilic microorganisms were above  $1 \times 10^6$  CFU/G. The same level of contamination was also found in 20 (87,0%) samples of psychrophilic microorganisms. In 25 (50%) samples from the fish stores and in three samples from the fishing the total coliforms were above  $1 \times 10^2$  CFU/G. No sample presented faecal coliforms above  $1 \times 10^2$  CFU/G but 2% from the fish stores were positive for *Escherichia coli*. Twelve (24,0%) samples from fish stores and one sample from one fishing ship presented *S. aureus* above  $10^3$  CFU/G but only one isolate was positive for enterotoxin B. Only one sample (2,0%) from a fish store presented *Salmonella* sp. and of the five isolates obtained from this sample only three confirmed the microorganisms. In the fishing boat where two samples were collected, at the capture and at the bottom deck, the last one presented a mesophilic total count two logarithmic increment cycles above the sample from the capture and one cycle above for total coliforms with a reduction in one cycle for psychrophilic micrororganisms. *Salmonella* sp. and *S. aureus* were not detected in both samples. None of the samples under

study were positive for *Vibrium parahaemolyticus* or *Yersinia enterocolitica*.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	v
SUMMARY .....	vii
SUMÁRIO .....	ix
ÍNDICE DE TABELAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	03
2.1. O Pescado e sua Relação com as Tóxi-Infecções Ali- mentares .....	03
2.2. Microrganismos Mesófilos e Psicrófilos .....	05
2.3. Bactérias do Grupo Coliforme .....	07
2.4. <i>Salmonella</i> sp .....	09
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
2.6. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	14
2.7. <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1. Material .....	20
3.1.1. Equipamentos e Vidrarias .....	20
3.1.2. Meios de Cultura e Reagentes .....	20
3.1.3. Matéria-Prima .....	20
3.1.3.1. Coleta das Amostras .....	20
3.1.3.2. Preparo das Amostras .....	22
3.2. Métodos .....	23
3.2.1. Preparo das Diluições e Pré-Enriquecimento das Amostras .....	23

3.2.2. Contagem padrão, em placas, de microrganismos Mesófilos e Psicrófilos .....	24
3.2.3. Enumeração de Bactérias Coliformes .....	24
3.2.4. Isolamento, Identificação e Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
3.2.5. Isolamento e Identificação de <i>Salmonella</i> sp..	26
3.2.6. Isolamento, Identificação e Contagem de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	29
3.2.7. Isolamento e Identificação de <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	29
3.2.8. Análises Estatísticas .....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
4.1. Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos .....	33
4.2. Contagem Padrão de Microrganismos Psicrófilos .....	37
4.3. Enumeração de Bactérias Coliformes .....	39
4.4. Isolamento, Identificação e Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	43
4.5. Isolamento e Identificação de <i>Salmonella</i> sp .....	46
4.6. Isolamento, Identificação e Contagem de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	48
4.7. Isolamento, Identificação e Contagem de <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	49
4.8. Avaliação Estatística do Grau de Contaminação das Amostras de Peixarias .....	49
4.9. Considerações Gerais sobre os Resultados .....	50
5. CONCLUSÕES .....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
7. ANEXOS .....	72

## ÍNDICE DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Freqüência de amostras positivas e acima do padrão microbiológico, em sardinha ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ) coletada em peixarias e distribuidores de pescado da Grande Florianópolis .....	52
TABELA 2 - Distribuição do número e percentagem das amostras segundo o tipo e contagem de microrganismos em amostras de sardinha ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ) coletadas em peixarias e distribuidores de pescado da Grande Florianópolis .....	53
TABELA 3 - Variação da contagem e contagem média de microrganismos em amostras de sardinha ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ) de peixarias e distribuidores de pescado .....	54
TABELA 4 - Número de microrganismos encontrados em sardinha ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ) coletada na captura e no porão do mesmo barco .....	55
TABELA 5 - Relação entre cepas isoladas e cepas positivas de diferentes microrganismos em amostras de sardinha ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ) de peixarias e distribuidores de pescado .....	56
TABELA 6 - Avaliação estatística de amostras de sardinha ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ) de peixarias da grande Florianópolis .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Contagem padrão, em placas, de microrganismos mesófilos e psicrófilos, enumeração de bactérias do grupo coliforme e isolamento, identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
FIGURA 2 - Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> sp .....	28
FIGURA 3 - Isolamento, identificação e contagem de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	30
FIGURA 4 - Isolamento e identificação de <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	31
FIGURA 5 - Freqüência de <i>Staphylococcus aureus</i> em amostras de sardinha ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ) de peixarias e distribuidores de pescado da Grande Florianópolis .....	45
FIGURA 6 - Freqüência dos microrganismos encontrados em amostras de sardinha ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ) de peixarias e distribuidores de pescado da Grande Florianópolis .....	58

## 1. INTRODUÇÃO

Face ao maior conhecimento do valor nutricional dos alimentos e a maior difusão destes princípios na população brasileira, os consumidores procuram adequar suas dietas com alimentos nutritivos e de baixo custo. Nesse sentido, o pescado tem estado dia a dia no prato do povo brasileiro.

Entre os pescados, a sardinha é um peixe de grande aceitação popular tendo em vista que seu preço é bem inferior ao dos outros produtos do mar, tais como camarão e tainha; além de ser largamente utilizada em escala industrial.

No Estado de Santa Catarina, a produção pesqueira sofreu nos anos de 1985 a 1986 um decréscimo significativo, especialmente no que diz respeito a produção de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) que representou em 1986, 51,84% de toda a produção pesqueira do estado, com um decréscimo de 10,81% sobre o ano anterior. Por outro lado, entre as principais espécies capturadas, a sardinha destacou-se quanto ao valor total de comercialização que representou 27,31% e quanto a participação representativa em kg, que foi de 51,84% (87).

O pescado normalmente apresenta uma microflora natural característica, mas ocasionalmente pode sofrer contaminação no seu habitat, especialmente em águas dos estuários ou poluídas por material fecal; ou durante os processos de captura, manipulação e processamento. Nessas condições, bactérias patogênicas como, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*, ou indicadores de contaminação fecal como, *E. coli* e estreptococos fecais, ou outros microrganismos podem-se desenvolver produzindo "per-se" ou através

de toxinas, toxi-infecções alimentares com manifestações clínicas variáveis.

Os operários são considerados os principais causadores de contaminação bacteriana dos produtos pesqueiros. Se portadores de uma infecção, esta pode ser transmitida através do manuseio do produto. O problema entretanto, agrava-se no comércio de pescado pelo sistema a varejo; pois além da contaminação inicial adquirida após sua captura nos atos de carga e descarga, o pescado pode sofrer contaminações adicionais no estabelecimento de venda, devido ao manuseio, acomodação nas prateleiras, agravada por possível falta de refrigeração.

É interessante ressaltar também o tipo de embalagem utilizada no momento da venda, dado o fato de, na maioria das vezes, o pescado ser embalado em papel de jornal, o qual se constitui naturalmente numa fonte de contaminação.

Baseado nas considerações acima, nosso trabalho se propõe pesquisar bactérias presentes no pescado vendido que indicam qualidade higiênico-sanitária, assim como bactérias patogênicas passíveis de causarem surtos de tóxi-infecções alimentares no homem. Também nos propomos avaliar o grau de higiene durante a captura, manipulação e armazenamento do pescado comercializado. Com este fim serão estudados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., bactérias mesófilas e psicrófilas, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*. As culturas de *S. aureus* isoladas do produto serão analisadas quanto a produção de enterotoxina B.

Embora o *Clostridium botulinum* tipo "E" seja um patógeno de grande importância em pescados, não foi possível a sua pesquisa devido as condições laboratoriais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICAS

### 2.1. O Pescado e sua Relação com as Tóxi-Infecções Alimentares

O pescado, recém capturado, normalmente não apresenta bactérias no tecido muscular, no entanto, encontra-se grande carga bacteriana nas guelras, limo superficial e intestino<sup>(14, 19, 38, 89)</sup>.

A flora bacteriana normal do pescado é oriunda do solo, ar e água, estando diretamente relacionada com o seu ambiental aquático<sup>(89)</sup>. Predominam as bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Micrococcus* e quando o pescado é capturado próximo da terra pode conter também esporulados aeróbios do gênero *Bacillus*. *Clostridium botulinum* e *Vibrio parahaemolyticus* podem estar presentes em pescados capturados em águas não poluídas<sup>(29, 70)</sup>. Os demais microrganismos causadores de tóxi-infecções alimentares raramente ocorrem no pescado capturado em águas não poluídas, exceto se o mesmo foi contaminado após sua captura. Este processo pode ser iniciado a bordo através das superfícies de contato nos barcos, no uso de gelo feito de água contaminada, falta de asseio nos convés e porão do barco, como também o hábito não higiênico dos pescadores. Em terra as condições sanitárias do local de desembarque, a exposição a insetos, desejos de pássaros e roedores, o uso de cestos ou caixas sujas para o acondicionamento e transporte do pescado, bem como as operações de processamento sob condições higiênico-sanitárias inadequadas podem também promover a contaminação do produto<sup>(14, 90, 92, 94)</sup>.

O pescado capturado em águas poluídas por excrementos de

origem animal e humano, pode servir de veículo para os mais importantes tipos de bactérias causadoras de tóxi-infecções alimentares, como por exemplo *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Vibrio parahaemolyticus* (17, 90).

Appleman et alii (3), verificaram que o pescado capturado em águas não poluídas no mar do Norte estava completamente livre de *E. coli*, estafilococos coagulase positivo e *Salmonella*, e que quando capturados em águas poluídas esses microrganismos poderiam estar presentes. Segundo esses autores, a contaminação começa, sem dúvida, no barco e especialmente com materiais associados ao convés, como tábuas, gelo, redes e trabalhadores a bordo, sendo que o mercado e a planta de processamento bem como todos os equipamentos, inclusive caixas sanificadas inadequadamente, facas e também a água de processamento podem aumentar a contaminação.

Georgala (37), ao analisar filés com pele verificou que 95% das contaminações bacterianas correspondem a microrganismos coliformes, dos quais 38% pertenciam ao grupo dos coliformes fecais. Estes microrganismos eram provenientes da água utilizada para a lavagem e das tábuas utilizadas para filetar. Apesar da elevada presença de bactérias coliformes o pesquisador não encontrou *Shigella*, nem *Salmonella*. No entanto 30% dos filés apresentaram estafilococos coagulase positivos, presumivelmente como resultado do processo de manipulação.

Raj & Liston (79), estudando em produtos do mar congelados a sobrevivência de bactérias de significância a saúde pública verificaram que o congelamento e armazenamento sob refrigeração não reduzem significativamente a carga bacteriana dos alimentos. No caso particular de produtos do mar, após longa armazenagem no estado congelado e até mesmo após congelamento e descongelamento repetidos, pode haver sobrevivência de bactérias patogênicas ou

potencialmente patogênicas em número significativo para constituir um risco a saúde. Os autores acharam *S. typhimurium*, *S. aureus* e *E. coli* em estado viável em cada ml de homogeneizado de pescado após 5 ciclos de descongelamento em número suficiente para causar risco a saúde pública.

Segundo o "Department of Food Control and National Institute of Health", do Japão, apud Kawabata<sup>(51)</sup>, os microrganismos do gênero *Salmonella* e *Staphylococcus* foram os mais envolvidos nos casos de tóxi-infecções alimentares devido ao consumo de pescado e produtos da pesca ocorridas no Japão no período de 1957-1958.

Todd<sup>(99)</sup> analisou as tóxi-infecções alimentares ocorridas no período de 1967 a 1971, na Austrália; de 1968 a 1972, no Japão e de 1973 a 1975 nos Estados Unidos, Canadá, Inglaterra e País de Gales e verificou que o maior número de surtos, 6.109, ocorreu no Japão. *Salmonella* sp., *S. aureus* e *C. perfringens* foram os principais agentes responsáveis pelas tóxi-infecções. O *Vibrio parahaemolyticus* apresentou maior incidência no Japão. Os pescados foram responsáveis por 6 (12,5%) surtos na Austrália, 1.270 (35,4%) no Japão, 10 (0,5%) na Inglaterra e País de Gales, 84 (5,8%) no Canadá e 112 (9,3%) nos E.U.A.

## 2.2. Microrganismos Mesófilos e Psicrófilos

As bactérias psicrófilas são de interesse por causarem alteração em alimentos refrigerados e congelados. Por outro lado na faixa de temperatura de bactérias mesófilas encontram-se a maioria dos microrganismos potencialmente patogênicos para o homem<sup>(98)</sup>.

Os microrganismos psicrófilos são menos importantes como agentes de deterioração nos alimentos mantidos a temperatura am-

biente. Já em alimentos refrigerados a presença de grande número de bactérias psicrófilas pode refletir o crescimento de uma população inicial durante o armazenamento e/ou contaminação maciça em algum ponto antes ou durante o armazenamento refrigerado<sup>(2)</sup>.

Em virtude de que os pescados, moluscos e crustáceos vivem em ambientes cujas temperaturas oscilam entre 15 a 20 °C, a microflora normal destes animais é composta principalmente por psicrófilos, tais como *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*<sup>(45, 98, 2, 60, 88)</sup>.

Dado que os pescados são geralmente armazenados a baixas temperaturas (refrigeração ou congelamento), o tempo de conservação e a rapidez da deterioração dependem, principalmente da intensidade e do tipo de contaminação por microrganismos psicrótróficos ou psicrófilos uma vez que estes apresentam intensa atividade lipclítica e proteolítica<sup>(62)</sup>.

No pescado, tanto os microrganismos psicrófilos como os mesófilos desempenham um papel importante no processo de putrefação. Os psicrófilos têm maior ação no início da decomposição do pescado e à medida que a decomposição vai aumentando, os microrganismos mesófilos aumentam em número, principalmente quando as temperaturas dos locais de armazenamento são mais elevadas, dando continuidade ao processo de degradação<sup>(54)</sup>.

A contagem em placas de mesófilos é usada, rotineiramente, para se obter uma avaliação geral do produto, fornecendo-nos uma estimativa de população bacteriana existente, como também conclusões sobre as condições higiênico-sanitárias do processo de fabricação, efeito da temperatura de conservação, grau de alteração do alimento e sua provável vida de prateleira<sup>(98, 48, 46, 59)</sup>.

Em virtude dos pescados estarem no mercado geralmente a tem-

peraturas inadequadas são passíveis de contaminação por bactérias mesófilas<sup>(45)</sup>. Um número elevado desses microrganismos pode indicar matéria prima contaminada, limpeza e desinfecção deficientes, ou condições inadequadas de tempo/temperatura durante o processamento e/ou armazenamento dos alimentos, bem como uma possível contaminação por bactérias patogênicas<sup>(48, 98)</sup>.

### 2.3. Bactérias do Grupo Coliforme

Os coliformes são membros da família *enterobacteriaceae* capazes de fermentar a lactose com produção de gás dentro de 48 horas a temperatura de 32 a 37 °C<sup>(22, 2, 45)</sup>. Neste grupo estão incluídas as bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*<sup>(45, 76, 70)</sup>. São caracterizadas como bastões curtos aeróbios ou anaeróbios facultativos, gram negativos e não esporulados<sup>(18, 2, 35, 76, 77)</sup>.

Nos E.U.A., no ano de 1914, o serviço de saúde pública instituiu os coliformes como indicadores de poluição fecal da água, pois pensava-se que eles habitassem exclusivamente o trato intestinal de animais de sangue quente e sua presença na água era, portanto, resultado de uma contaminação fecal direta ou poluição<sup>(22)</sup>. Através de estudos posteriores constatou-se que, embora a *E. coli* fosse um habitante normal do trato intestinal do homem e de animais, os outros membros do grupo coliforme poderiam ocorrer em outros habitats (vegetais, solo), além das fezes<sup>(104, 35, 76, 77, 48)</sup>. Em virtude disso utilizou-se a terminologia "coliformes fecais" para uma indicação mais precisa de poluição fecal. Chordash & Insalata<sup>(22)</sup>, Jay<sup>(48)</sup>; Geldrich et alii<sup>(36)</sup> sugeriram o uso de *E. coli* tipo I como um indicador de poluição fecal, uma vez que este organismo tem uma especificidade fecal mais elevada.

Os coliformes fecais são membros da família *enterobacteriaceae* e são distinguidos dos coliformes não fecais por fermentarem a lactose com produção de gás dentro de 24/48 horas a temperaturas de incubação elevadas, tais como 42, 44, 44,5 ou 45,5 °C (2, 45, 48, 22).

Em 1887, Escherich, apud Chordash & Insalata<sup>(22)</sup> isolaram *E. coli* de fezes humanas. Em 1892, Schardinger, apud Jay<sup>(48)</sup> designou a *E. coli* como um indicador de patógenos transmitido pela água.

Para adultos normais a *E. coli* é um comensal entérico não invasivo, entretanto quando ganha acesso aos tecidos fora do seu habitat normal ou em recém-nascidos ou adultos predispostos, pode ser responsável por graves casos de tóxi-infecções. É importante salientar que nem todas as linhagens de *E. coli* são patogênicas e as que são patogênicas podem ser classificadas em: a) enteropatógena/enteroinvasiva: ataca o epitélio do cólon e multiplica-se intracelularmente produzindo uma síndrome semelhante a disenteria; b) *E. coli* enterotoxigênica: ataca o epitélio do intestino grosso e pode elaborar enterotoxinas termoestáveis e/ou termolábeis, apresentando sintomas semelhantes a cólera. No homem, os sintomas clínicos são típicos de gastroenterites<sup>(44, 83, 22)</sup>.

Segundo Leitão<sup>(59)</sup> os pescados capturados em águas não poluídas não apresentam *E. coli* e os demais coliformes, porém podem ser contaminados por esses microrganismos pela manipulação inadequada e armazenamento no gelo.

Griffiths<sup>(40)</sup>, concluiu que a *E. coli* não é um habitante normal do trato intestinal do pescado marinho, embora este organismo esteja presente em pescado capturado em águas poluídas. Assim a presença de bactérias indicadoras em produtos de pesca deve originar-se do ambiente de processamento.

A presença de *E. coli* nos alimentos nem sempre está diretamente relacionada com a ocorrência de *Salmonella* ou outro patógeno entérico, mas somente implica em um certo risco de que esses organismos possam estar presentes<sup>(98, 45, 48)</sup>.

De uma maneira geral a presença de bactérias coliformes em alimentos é altamente indesejável pois indica uma contaminação por matéria fecal, possível presença de patógenos entéricos, condições higiênico-sanitárias deficientes e armazenamento inadequado<sup>(35, 48, 45)</sup>.

#### 2.4. Salmonella sp

O gênero *Salmonella* inclui várias espécies potencialmente patogênicas para o homem e animais<sup>(11)</sup>.

Esta bactéria habita o trato intestinal do homem e animais e sua presença nos alimentos indica provável contaminação fecal, direta ou indireta devido a uma contaminação secundária através de utensílios e equipamentos, ou manuseio por indivíduos infectados<sup>(98)</sup>.

Um dos maiores reservatórios de *Salmonella* são as aves. Berg & Anderson<sup>(11)</sup>, estudaram a incidência de *Salmonella* e *Edwardsiella tarda* em 521 amostras de fezes de gaivota na costa de Oregon e obtiveram *Salmonella* em 2,1% e *E. tarda* em 0,4% das amostras.

A *Salmonella* pode atacar considerável número de alimentos sem causar alteração detectável na aparência, odor ou até mesmo sabor<sup>(35)</sup>.

A Salmonelose é uma infecção que afeta o trato gastrointestinal, sendo mais grave em crianças e velhos, podendo produzir casos graves, às vezes com morte, em indivíduos de todas as idades.

Os sintomas e sinais da gastroenterite são: febre, diarreia, dores intestinais e vômitos. Eles podem variar desde uma simples indisposição até uma grave desidratação<sup>(45, 98)</sup>.

A verdadeira incidência do envenenamento alimentar por *Salmonella* não é conhecida, uma vez que, freqüentemente, pequenos surtos não são relatados aos órgãos oficiais de saúde pública<sup>(48)</sup>.

A probabilidade de infecção pelo consumo de um alimento contendo *Salmonella* depende da resistência do hospedeiro, da infeciosidade da linhagem e do número de organismos ingeridos<sup>(35)</sup>.

O pescado marinho capturado fora da costa e em países que possuem padrões de sanificação eficientes raramente apresentam *Salmonella*. Por outro lado podem ser contaminados pela bactéria quando capturados em zonas poluídas ou sofreram operações de manipulação, transporte ou processamento sob condições sanitárias inadequadas<sup>(20)</sup>.

Orlob<sup>(74)</sup> estudou a sobrevivência de diferentes espécies de *Salmonella* em águas marinhas e verificou que a mesma variava, segundo a espécie, desde 15 minutos até 34 dias.

Nos Estados Unidos durante os anos de 1951, 1961, 1963 e 1964 foram relatados respectivamente 1.733, 8.500, 18.000 e 21.113 casos de salmonelosis. Em 1967, o "National Communicable Disease Center" de 37 estados relatou um total de 273 surtos de envenenamento alimentar envolvendo 22.171 casos, dos quais 12.836, ou seja, 58% foram causados por *Salmonella* sp.<sup>(48)</sup> Segundo Todd<sup>(99)</sup>, nos E.U.A. durante o período de 1973 a 1975 as *Salmonellas* foram responsáveis por 106 (33,5%) surtos de tóxi-infecções alimentares. Floyd & Jones<sup>(31)</sup> encontraram *Salmonella* e *Shigella* em 11% dos peixes capturados nas águas do Nilo.

No ano de 1953 na Suécia, um surto de *S. typhimurium* causou

105 casos fatais, correspondendo a mortalidade média de 1,1% sendo que aproximadamente metade dos mortos eram pessoas de meia idade<sup>(45)</sup>.

Segundo Leiguarda et alii<sup>(57)</sup> de 97 peixes, compreendendo 10 espécies diferentes capturados no Rio da Prata, 19,6% apresentaram *Salmonella*.

Gulasekeharam et alii<sup>(41)</sup> pesquisaram *Salmonella* em 629 amostras de pescado fresco e em 42 amostras de água de lavagem e encontraram *Salmonella* em 39 amostras de pescado fresco e em 42 amostras de água de lavagem, isolando um total de 15 cepas das quais todas, exceto *S. chittagong* e *S. oranienberg*, já haviam sido isoladas, em ocasiões anteriores, de fonte humana e animal.

Embora a *Salmonella* tenha como temperatura de crescimento de 37 °C, pode sobreviver e até se multiplicar a temperaturas mais baixas<sup>(68)</sup>.

A temperatura mínima na qual a *Salmonella* pode crescer e se multiplicar é influenciada tanto pelo meio de crescimento como pelos microrganismos competitivos. As *Salmonellas* são capazes de crescer em alimentos do mar e outros alimentos a temperatura de 8 °C competindo com as bactérias deterioradoras normais e alcançando alto número. Em temperaturas menores de 8 graus, saprófitas psicrotroficos podem crescer rapidamente, alcançando elevado número antes que se inicie o crescimento de *Salmonella* e desse modo inibir seu crescimento<sup>(66)</sup>.

Culturas puras de *Salmonella* são capazes de crescer mais rapidamente, assim como iniciar o crescimento a temperaturas mais baixas do que quando em competição com outros microrganismos. Isto foi verificado por Matches & Liston<sup>(66)</sup>, que constataram que a temperatura mínima para o crescimento de *Salmonella* variou de 5,5 a 6,8 °C.

Do ponto de vista prático é importante reconhecer que pode ocorrer crescimento de *Salmonella* em temperatura abaixo de 6 °C após um período de tempo relativamente longo. É muito importante um bom controle de temperatura, principalmente em alimentos armazenados sob refrigeração por longo período. Nesse caso, a temperatura do alimento deveria ser mantida sempre abaixo de 5 °C<sup>(66)</sup>.

### 2.5. *Staphylococcus aureus*

O envenenamento alimentar por estafilococos foi estudado inicialmente em 1894 por Denys e em 1914 por Barber, mas somente em 1930 Dack et alii provaram a capacidade de algumas linhagens de *S. aureus* produzir envenenamento alimentar<sup>(48)</sup>.

O crescimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos apresenta um risco potencial de saúde pública uma vez que certas linhagens produzem enterotoxinas que, se ingeridas, causam tóxi-infecção alimentar<sup>(2)</sup>, cujos sintomas e sinais se caracterizam por náusea, vômito, diarréia, indisposição geral e fraqueza; começando entre 1 a 6 horas (normalmente de 2 a 4 horas) após a ingestão do alimento. Embora raramente esta doença seja fatal, se houver vários acessos podem ocorrer complicações como desidratação e choque<sup>(45, 48, 13)</sup>.

Segundo Bergdool<sup>(12)</sup>, pelo menos 50% das cepas de *S. aureus* produzem enterotoxina, cuja ação se manifesta a nível de um micrograma/G de produto contaminado.

Os *S. aureus* produzem 5 enterotoxinas chamadas A, B, C, D, E, sendo a mais comumente envolvida em surtos de tóxi-infecção a do tipo "A", sendo que 1 micrograma já pode causar sintomas de intoxicação nos seres humanos<sup>(48)</sup>.

Acreditava-se que a produção de enterotoxina se relacionava com a produção de coagulase, desoxiribonuclease termoestável e fermentação laboratorial do manitol, mas através de estudos verificou-se que nenhuma dessas propriedades isoladas nem a combinação delas é um índice absolutamente seguro de enterotoxigenicidade (48).

Embora a produção de coagulase geralmente seja característica do *S. aureus*, nem sempre todas as linhagens responsáveis por tóxi-infecção produzem essa enzima; mas tendo em vista a não existência de métodos mais adequados para detectar esses patógenos vários autores<sup>(98, 48)</sup>, recomendam a utilização do teste de coagulase e termonuclease para a identificação de *S. aureus*.

Segundo o "Center for Disease Control" dos E.U.A. de 1969 a 1972, os estafilococos foram responsáveis pela maior proporção de surtos de envenenamento alimentar de etiologia bacteriana variando de 37 a 46%<sup>(48)</sup>. No período de 1973 a 1975 Todd<sup>(99)</sup> verificou que, nos E.U.A., foram registrados 107 (33,9%) surtos de tóxi-infecções alimentares ocasionados pelo *S. aureus*.

Em alimentos crus, principalmente produtos animais é comum a presença de *S. aureus* a qual pode não estar relacionada com contaminação humana, mas sim por contaminação com o couro do animal, penas e pele, podendo ou não resultar também de lesões ou tecidos contundidos<sup>(2)</sup>.

Gilbert<sup>(38)</sup> menciona que o número de estafilococos capaz de causar intoxicação varia de  $4,8 \times 10^4$  a  $9 \times 10^9$  UFC/G de produto.

Segundo Speck<sup>(2)</sup>, a presença de um número elevado de células de estafilococos em alimentos não é causa suficiente para incriminá-lo como um vetor de envenenamento alimentar. Há necessidade de se demonstrar a enterotoxigenicidade, ou seja, a presença de

enterotoxina estafilocócica no alimento, uma vez que ela é que é responsável pela doença.

Muitas vezes em alimentos processados os *S. aureus* são destruídos pelo calor, mas a toxina sendo termoestável pode persistir e causar tóxi-infecção. Neste caso é aconselhável realizar um exame microscópico do alimento e/ou testes para a detecção de desoxiribonuclease termoestável<sup>(48, 98)</sup>.

Em alimentos cozidos ou processados, os estafilococos são excelentes indicadores das condições higiênico-sanitárias dos manipuladores os quais servem como veículo de disseminação destes organismos uma vez que os estafilococos se encontram nas fossas nasais, boca e mãos das pessoas portadoras. Desta forma pessoas com lesões nas mãos ou tossindo ou espirrando podem contaminar os alimentos<sup>(48, 98)</sup>.

#### 2.6. *Vibrio parahaemolyticus*

*Vibrio parahaemolyticus* foi identificado inicialmente no Japão por Fujino, em 1951, sendo posteriormente caracterizado morfocultural e fisiologicamente por Sakazaki em 1963<sup>(9, 30, 48, 58)</sup>.

É um microrganismo enteropatogênico, halofílico, gram negativo, anaeróbio facultativo, ocorrendo na maioria das águas marinhas do mundo<sup>(49)</sup>. É responsável no homem por gastroenterite epidêmica, podendo causar doenças em camarão<sup>(100)</sup>, Caranguejo<sup>(23, 54)</sup> e ostras<sup>(22)</sup>.

Acredita-se que estes microrganismos sejam veiculados pela água e dessa forma contaminarem os moluscos e peixes vivos. Depois da captura, estes organismos se multiplicam com muita rapidez, principalmente quando as temperaturas são altas, alcançando

em poucas horas níveis suficientes para produzir tóxi-infecção<sup>(98)</sup>.

A doença ocorre principalmente nos meses quentes de verão. O período de incubação varia de 2 a 48 horas (mais freqüentemente 14/20 horas) e normalmente começa com violenta dor epigástrica acompanhada por náusea, vômito e diarréia. Em casos mais graves, aparece nas fezes muco e sangue. Na maioria dos casos ocorre febre moderada e dor de cabeça. Devido a estes sintomas a doença é freqüentemente erroneamente diagnosticada como salmonelose ou desintéria<sup>(48, 98)</sup>.

Acredita-se que o mais importante teste de laboratório para *Vibrio parahaemolyticus* é o teste de kanagawa, cujo propósito é detectar uma hemolisina específica que está associada com a patogenicidade deste microrganismo<sup>(30)</sup>.

A maioria dos autores japoneses afirmam que organismos isolados de amostras marinhas diferem das linhagens isoladas de fezes humanas pelo fato de serem incapazes de hemolisar o sangue humano no chamado fenômeno kanagawa. Em experimentos com voluntários humanos verificou-se que *Vibrio parahaemolyticus* kanagawa negativo não causa doença típica. Contudo neste ponto não há completa unanimidade uma vez que linhagens kanagawa positiva foram isoladas de amostras marinhas e já foi registrado envenenamento alimentar por *Vibrio parahaemolyticus* kanagawa negativo<sup>(48, 46)</sup>.

Embora *Vibrio parahaemolyticus* esteja presente principalmente nas águas costeiras, sedimentos, plancton, a abundância desse organismo é estritamente sazonal<sup>(64)</sup>. Isto foi evidenciado pelos trabalhos de Miyamoto et alii<sup>(69)</sup> Baross & Liston<sup>(4, 5)</sup> Barthey & Slanetz<sup>(10)</sup> onde mostraram uma baixa incidência de *Vibrio parahaemolyticus* quando as temperaturas quentes baixavam ou em amostras coletadas em alto mar onde além da baixa temperatura o conteúdo orgânico nestas áreas está reduzido.

Em Maryland, no verão de 1971, ocorreu 4 surtos de origem alimentar causado por *Vibrio parahaemolyticus* devido ao consumo de caranguejo a vapor e salada de caranguejo<sup>(30)</sup>.

### 2.7. *Yersinia enterocolitica*

A *Y. enterocolitica* foi descoberta em 1939 nos Estados Unidos por Schleifstein & Coleman que descobriram que o novo patógeno era similar ao *Bacterium liguieri* e *Pasteurella (Yersinia) pseudo-tuberculosis* o qual denominaram *Bacterium enterocoliticum*. Em 1964, Fredericksen et alii propuseram o nome de *Yersinia enterocolitica*, dado o fato de que quando invade o organismo (humano e/ou animal) habita o intestino e cólon<sup>(97, 72)</sup>.

A *Y. enterocolitica* é um bastonete, gram negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo, e está classificado na família das *enterobacteriaceae*. As características distintas deste microrganismo são sua capacidade de crescimento em temperaturas baixas, motilidade a 25 °C e imobilidade a 37 °C, fenilalanina deaminase negativo e urease positivo<sup>(18)</sup>.

A temperatura ótima de crescimento da *Y. enterocolitica* é de 25 a 39 °C, porém os sorótipos 0:3, 0:8 e 0:9 têm a habilidade de se desenvolver e manter ativa sua toxina a 4 °C<sup>(97)</sup>. Isto cria um potencial problema de saúde pública, principalmente em alimentos refrigerados onde um pequeno número de microrganismos tem a capacidade de desenvolver um grande número de células viáveis<sup>(43)</sup>.

Não se sabe exatamente se o homem é um reservatório de *Y. enterocolitica* e se ela é transmitida por via oral ou fecal. Acredita-se que a doença seja transmitida através de alimentos conta-

minados; através do contato com animais infectados e do contato entre pessoas infectadas em uma família<sup>(93, 100, 50, 72)</sup>.

Os animais são reservatórios significativos de *Y. enterocolitica*, principalmente os suínos<sup>(96, 100)</sup>. *Y. enterocolitica* foi isolada de gatos, chinchilas, coelho, cachorro, macacos, veados<sup>(96)</sup>, leite e derivados, derivados de ovos, carnes (gado, porco e ovelha), aves domésticas e vegetais<sup>(97)</sup>.

Em 1980, Schieman<sup>(86)</sup> analisou 69 produtos suínos processados e 128 produtos suínos crus e encontrou *Y. enterocolitica* em 7% e 49%, respectivamente.

A *Y. enterocolitica* foi isolada, em várias ocasiões; em amostras de água<sup>(52)</sup>. Em novembro de 1972 um homem idoso ficou doente em um acampamento de caça e após exame clínico encontrou-se *Y. enterocolitica* serotipo 0:8 tanto no paciente como na água corrente da montanha usada para beber. Teoricamente animais infectados poderiam ter contaminado a área<sup>(52)</sup>.

Lassen<sup>(56)</sup> analisou 50 amostras de água para beber na Europa das quais 10 continuam *Y. enterocolitica*.

A *Y. enterocolitica* aparece largamente distribuída no meio ambiente e as infecções humanas tem sido reveladas em muitos países<sup>(97)</sup>.

A *Y. enterocolitica* foi isolada primeiramente em 1963 na Tchecoslováquia. Entre 1963 e 1971, 845 casos foram diagnosticados<sup>(82, 72)</sup>.

Nos anos recentes, o número de casos relatados de infecções por *Y. enterocolitica* em seres humanos tem aumentado constantemente, particularmente na Europa e Canadá<sup>(100, 101)</sup>.

Nos E.U.A., em 1966 foram registrados somente 23 casos de infecção por *Y. enterocolitica*, mas em 1970 foram registrados 642

casos. Em 1972 mais de 1.000 e em 1974 mais de 4.000 casos<sup>(101)</sup>. Em 1976, ocorreu um surto atingindo 220 crianças escolares, das quais 36 foram hospitalizadas e 16 sofreram apendicectomia. Nesse caso, foi isolado o mesmo sorotipo (0:8) de *Y. enterocolitica* tanto das crianças doentes como do leite achocolatado incriminado que elas tinham consumido<sup>(96, 102)</sup>.

O mais alto índice de infecções humanas por *Y. enterocolitica* foi registrado na Bélgica, onde em 1963 e 1965 houve 1.781 isolamentos<sup>(97)</sup>.

No Brasil, a *Y. enterocolitica* foi isolada a partir de fezes de crianças em Araraquara, São Paulo<sup>(78)</sup>, de fezes de uma criança na cidade de São Paulo<sup>(32)</sup> e em criança com diarréia crônica em Botucatu, São Paulo<sup>(25)</sup>.

Pouco se sabe a respeito de métodos para controlar a doença, mas a higiene ambiental e sanificação dos alimentos e da água deveriam ser aplicados para tal fim<sup>(72)</sup>.

A *Y. enterocolitica* pode produzir uma grande variedade de sintomas e sinais no homem<sup>(93, 101)</sup>, dependendo da linhagem, da dose, dos fatores genéticos e da idade e condições físicas do hospedeiro<sup>(15)</sup>. Crianças no primeiro ano de vida são mais suscetíveis as infecções por *Y. enterocolitica*. Gastroenterites, linfadenite mesentérica são os sintomas predominantes na infância e adolescência, desordens abdominais agudas, diarréia e artrite são manifestações que ocorrem com maior freqüência entre pessoas de 20 a 60 anos. Eritema nodoso é mais notado em pessoas com mais de 60 anos<sup>(97)</sup>.

O mecanismo para produção de patogenicidade da *Y. enterocolitica* ainda é desconhecido, não se sabe se o organismo é invasivo, produtor de toxina ou patogênico por algum outro modo.

Em um experimento envolvendo um voluntário humano foi necessário uma dose de  $3,5 \times 10^9$  organismos para produzir a infecção<sup>(72)</sup>.

Em abril de 1975, ocorreu um surto de gastroenterite febril em duas escolas de Montreal. Em uma escola, 57 crianças e 1 adulto desenvolveram sintomas entéricos e em outra escola 80 crianças também desenvolveram estes sintomas. O leite cru que havia sido consumido continha *Y. enterocolitica* serotipo 0:6,30, mas o isolado de crianças doentes foi 0:5,27. Embora não se tenha isolado o mesmo serotipo da *Y. enterocolitica* este foi o único agente patogênico identificado<sup>(96)</sup>.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Equipamentos e Vidrarias

No presente estudo, além das vidrarias e equipamentos usados rotineiramente em laboratório de microbiologia, foi utilizado para os cálculos estatísticos o computador IBM 4381.

##### 3.1.2. Meios de Cultura e Reagentes

Foram utilizados os meios de cultura da Merck do Brasil e do "Baltimore Biological Laboratory" - BBL. Além dos reagentes comumente usados foi empregado coagu-plasma-Laborclin e soro polivalente da Pimenta Abreu.

##### 3.1.3. Matéria-Prima

##### 3.1.3.1. Coleta de Amostras

O cálculo que determinou o tamanho da amostra (N) para esta pesquisa considerou 90% de confiança, um erro máximo em torno do valor médio de 0,05 (5%) e que a proporção esperada (sucesso) de peixes, com a característica a determinar na experiência, ou seja, presença de bactérias de significância a saúde pública em número igual ou inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação<sup>(26)</sup> é de 0,5 e igual a proporção de insucesso (P = 0 = 0,5). Assim, pode-se obter o número mínimo de peixes a serem estudados através da seguinte expressão:

$$N < \frac{Z \cdot P \cdot Q}{E}$$

Onde:

Z = valor da tabela da normal padrão, obtido em função do nível de confiança e que é igual a 1.645.

P = Q = 0,5

E = erro máximo permissível ou precisão que se deseja do experimento e fixado em 5% em torno do valor P.

Substituindo-se os valores na fórmula acima, obteve-se como resultado N = 270 peixes. A título de sugestão do grupo de apoio estatístico a pesquisa - GAEP, fixou-se em 6 unidades de sardinha a serem examinadas por peixaria, totalizando 45 peixarias para atingir-se o "N" determinado. De acordo com a solicitação da banca do exame de qualificação, efetuou-se a amostragem em 25 peixarias, das quais 12 localizadas na ilha e 13 no continente. De cada uma coletou-se 2 amostras de sardinha em épocas distintas, correspondendo a 1 kg cada uma, perfazendo um total de 50 amostras. A fim de se obter uma amostragem aleatória sortearam-se, por semana, duas peixarias para a coleta das amostras.

Posteriormente visitou-se 3 distribuidores de pescado localizados no continente, onde coletou-se em cada um deles, uma amostra no porão do barco, totalizando 3 amostras e, em um dos distribuidores além da amostra do porão ao barco coletou-se também uma amostra no momento da captura do pescado no mar. Este procedimento foi executado com a única intenção de comparar o grau de contaminação entre estas diferentes situações.

Assim obtivemos no resultado geral 54 amostras de sardinha coletadas em peixarias e distribuidores de pescado.

Nas peixarias, a pesquisa de microrganismos psicrófilos foi realizada nas amostras de nºs 26 a 50, pois quando se percebeu a necessidade de pesquisar este grupo de microrganismos, o tra-

balho já havia sido iniciado.

O armazenamento das sardinhas nas peixarias apresentou-se sob distintas formas: em 82,0% das peixarias as sardinhas ficavam depositadas na parte superior do balcão frigorífico (temperatura entre 2 e 8 °C) sem gelo; e em 4,0% com gelo. Em 8,0% das peixarias o pescado ficava exposto a venda em recipientes plásticos com gelo picado espalhado sob o produto e em 6,0% sem gelo. No porão do barco as sardinhas eram armazenadas em urnas, e ficavam dispostas sobre camadas alternadas de gelo.

As amostras coletadas nas peixarias foram acondicionadas em sua maioria em papel jornal, posteriormente colocadas num isopor com gelo e transportadas ao laboratório.

A amostra da captura foi coletada ainda na rede, quando da chegada ao barco e depositada num recipiente de isopor com água do mar e gelo. A mesma chegou ao laboratório após 6 horas da captura. Essas sardinhas foram capturadas com rede denominada "traineira" através do cerco do cardume em alto mar. As amostras coletadas no porão foram acomodadas em sacos plásticos e transportadas em isopor com gelo ao laboratório.

O tempo decorrido entre a chegada da amostra ao laboratório e o início das análises não excedeu a 30 minutos.

#### 3.1.3.2. Preparo das Amostras

De cada amostra retiraram-se assepticamente 6 unidades de sardinha, que foram depositadas em bandejas esterilizadas. Com o auxílio de um bisturi e uma pinça esterilizada descamaram-se as sardinhas e cortaram-se filês de músculo com pele da parte dorsal de modo a se obterem 4 alíquotas de 25 gramas cada para posterior isolamento dos microrganismos a seres pesquisados.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Preparo das Diluições e Pré-Enriquecimento das Amostras

Das 4 alíquotas de amostra obtidas no item 3.1.3.2. foram preparadas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  bem como pré-enriquecimento de acordo com as necessidades de cada determinação. A 1ª alíquota foi homogeneizada em 225 ml de água peptonada 0,1% para a contagem padrão em placas, de microrganismos mesófilos e psicrófilos; enumeração de bactérias coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli* e identificação e contagem de *Staphylococcus aureus*.

A 2ª alíquota de 25 gramas foi diluída em 225 ml de água peptonada 1,0% + NaCl 3,0% para a identificação e contagem de *Vibrio parahaemolyticus*, e a 3ª e 4ª alíquotas foram submetidas a um pré-enriquecimento pela adição de 225 ml cada de caldo lactosado e caldo sorbital sais biliares-salina tamponado para o isolamento e identificação de *Salmonella* e *Yersinia enterocolitica*, respectivamente.

Todas as alíquotas com os seus respectivos diluentes ou caldos de pré-enriquecimento foram desintegrados em um desintegrador esterilizado e homogeneizadas a uma velocidade de 15.000 RPM durante 2 minutos.

A partir destes homogeneizados prepararam-se para as alíquotas 1 e 2 diluições decimais até  $10^{-4}$  exceto para microrganismos psicrófilos cuja diluição foi até a  $10^{-7}$ . Estas diluições foram realizadas através da transferência com pipetas esterilizadas, de porções de 1,0 ml para tubos de ensaio contendo 9,0 ml do diluente correspondente a cada caso.

### 3.2.2. Contagem Padrão, em Placas, de Microrganismos Mesófilos e Psicrófilos

Seguiu-se a técnica recomendada pela ICMSF<sup>(46)</sup>, transferindo-se 1,0 ml de cada diluição para 4 placas de petri as quais foram adicionados aproximadamente 15 ml de ágar para contagem em placas (PCA) previamente resfriado a  $45 \pm 1,0$  °C. Em seguida homogeneizaram-se as placas, deixou-se solidificar o ágar e para cada diluição em duplicata, incubou-se a 35 °C por 24/48 horas a fim de se contarem os microrganismos mesófilos e a 7 °C por 10 dias para os psicrófilos.

Após o período de incubação procedeu-se as contagens das colônias de acordo com as instruções do APHA<sup>(2)</sup> e ICMSF<sup>(46)</sup> e os resultados foram registrados como "unidades formadoras de colônias" (UFC) / Grama da amostra (Figura 1).

A pesquisa de microrganismos psicrófilos foi realizada em 23 amostras. As amostras nº 26 e nº 27 não foram completadas devido um defeito no refrigerador que provocou o congelamento das placas.

### 3.2.3. Enumeração de Bactérias Coliformes

Para coliformes totais, foi seguida, a técnica do número mais provável - NMP<sup>(73, 2, 46)</sup> indicada por Thatcher & Clark<sup>(98)</sup>, utilizando-se no teste presuntivo, caldo lauril sulfato triptose (LST) com incubação a 35 °C por 24/48 horas. Tubos gás-positivos foram repicados para caldo *Escherichia coli* (EC), incubados em banho-maria a  $44,5 \pm 0,1$  °C por 24 horas para enumeração de coliformes fecais. Em seguida, procedeu-se o isolamento e identificação de *Escherichia coli* pela repicagem dos tubos gás-positivos de caldo *Escherichia coli* para placas de ágar eosina azul de metileno de Levine (EAM) com incubação a 35 °C por 24/48 horas. As

colonias suspeitas de serem *E. coli* foram repicadas para ágar nutriente (AN) incubadas a 35 °C por 24 horas e submetidas ao teste bioquímico de indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e Citrato - IMViC (Figura 1).

#### 3.2.4. Isolamento, Identificação e Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para a enumeração de *S. aureus* foi seguida a técnica recomendada pela FDA<sup>(33)</sup> e ICMSF<sup>(46)</sup>. Foram inoculadas as diluições 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> em placas de petri contendo ágar Baird & Parker (BP) e incubadas a 35 °C por 24/48 horas. Em seguida, procedeu-se a contagem das colonias suspeitas, ou seja, colonias negras, brilhantes com e sem halo claro em seu redor e, retirou-se um número representativo de colonias, na maioria das vezes um número igual a raiz quadrada do total de colonias encontradas, e repicou-se para caldo infusão cérebro e coração (BHI), incubando-se a 35/37 °C durante 20-24 horas. Desta suspensão transferiu-se uma alíquota para ágar nutriente (AN) para se realizar a coloração de gram e fermentação do manitol e a suspensão restante foi destinada aos testes complementares de identificação, ou seja, teste de coagulação e nucleases.

O teste de coagulase foi efetuado conforme as recomendações citadas no ICMSF<sup>(46)</sup>. Transferiu-se 0,1 ml da suspensão desenvolvida no caldo BHI para tubos contendo 0,3 ml de plasma liofilizado de coelho e incubou-se a 35 °C. As culturas foram examinadas em 1, 2, 3, 4, e 24 horas sendo considerado reação positiva qualquer grau de coagulação do plasma.

Para a pesquisa de nuclease utilizou-se a técnica indicada por Lachica et alii<sup>(55)</sup> empregando-se o meio azul de orto-toluidina-DNA (TBD) solidificado em lâminas de microscópio onde foram

efetuados orifícios dispostos em dupla fileira. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur inoculou-se a suspensão da cultura em caldo BHI nos orifícios inferiores e nos superiores inoculou-se a mesma suspensão submetida a aquecimento em banho-maria fervente por quinze minutos. Após a inoculação as lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas a 35/37 °C por 24 horas (Figura 1).

Colônias com características de *S. aureus* foram transportadas ao laboratório de microbiologia da UNICAMP e submetidas ao teste de produção de enterotoxina. Foi empregado o método de celofane sobre ágar para a produção de toxina<sup>(47)</sup> e o método de "optimum sensitivity plate" (Ouchterlorey modificado, OSP) para a identificação da toxina B<sup>(85)</sup>.

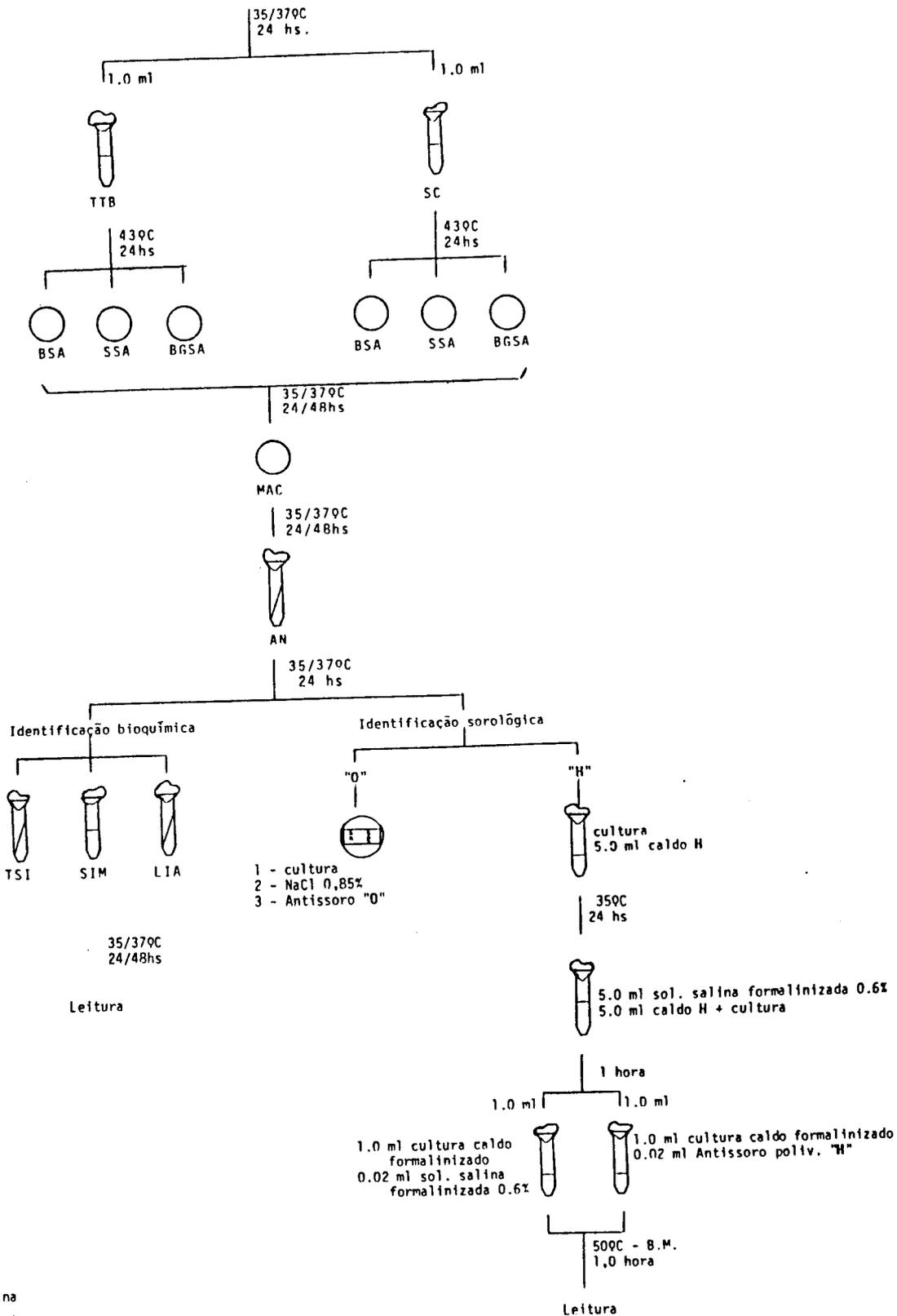
### 3.2.5. Isolamento e Identificação de *Salmonella* sp.

Empregou-se a metodologia recomendada por Thatcher & Clark<sup>(98)</sup>. A partir do pré-enriquecimento com caldo lactosado (CL) conforme mencionado no item 3.2.1, procedeu-se um enriquecimento seletivo com caldo tetracionato (TTB) e caldo selenito cistina (SC) com incubação a 43 °C por 24 horas. A seguir, efetuou-se o plaqueamento em ágar *Salmonella Shigella* (SSA), ágar sulfito de bismuto (BSA) e ágar sulfadiazina verde brilhante (BGSA), com incubação a 35 °C por 24 a 48 horas. Colônias suspeitas de *Salmonella* foram estriadas em ágar Mac Conkey (MC), incubadas a 35 °C por 24/48 horas e submetidas a testes bioquímicos, ágar tríplice açúcar ferro (TSI), ágar lisina ferro (LIA), ágar sulfito indol motilidade (SIM) e testes sorológicos onde utilizou-se o soro polivalente H "flagelar" e soro polivalente o "somático" (Figura 2).





75 g de sardinha  
225 ml de caldo lactosado



**LEGENDA:**

- TTB - Caldo tetrionato
- SC - Caldo selenito cistina
- BSA - Agar sulfito de bismuto
- BGSA - Agar sulfadiazina verde brilhante
- SSA - Agar *Salmonella-Shigella*
- MAC - Agar Mac Conkey
- AN - Agar nutriente
- TSI - Agar triplice açúcar ferro
- SIM - Agar sulfito indol motilidade
- LIA - Agar lisina ferro

Figura 2 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella*

### 3.2.6. Isolamento, Identificação e Contagem de *Vibrio parahaemolyticus*

A metodologia usada foi a sugerida pela ICMSF<sup>(46)</sup>, onde empregou-se a técnica do número mais provável - NMP, usando-se 4 séries de três tubos de caldo polimixina sal (SP) com incubação a 35/37 °C por 24 horas. Após selecionou-se as diluições mais altas que apresentaram turvação e procedeu-se o estriamento em ágar tiossulfato citrato sais biliares sacarose - (TCBS). Colônias suspeitas foram isoladas em ágar soja tripticase NaCl 3% (TS NaCl 3%), incubadas a 35 °C por 24 horas e submetidas a microscopia, coloração de gram e aos seguintes testes bioquímicos: TSI NaCl 3%, ágar para teste de motilidade NaCl 3%, teste de halofiliolismo (0,6,8,10% NaCl), VMVP NaCl 3% e teste Hugh-Leifson Glicose (Figura 3).

### 3.2.7. Isolamento e Identificação de *Yersinia enterocolitica*

Conforme mencionado no item 3.2.1 realizou-se o enriquecimento da amostra com caldo sorbitol - sais biliares-salina tamponada com incubação a 4 °C por 15 a 20 dias. Posteriormente fez-se o tratamento da mesma com solução de KOH 0,5% + NaCl 0,5% e plaqueamento em ágar MC e ágar SSA com incubação a 26 °C por 48 horas. As colônias suspeitas foram submetidas aos testes bioquímicos de fermentação de açúcares (TSI), descarboxilação da lisina (LIA), produção de urease, motilidade e descarboxilação da Arginina e ornitina (Figura 4).

### 3.2.8. Análises Estatísticas

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o SPSS "Statistical Package for the Social Sciences" do Núcleo de Pro-

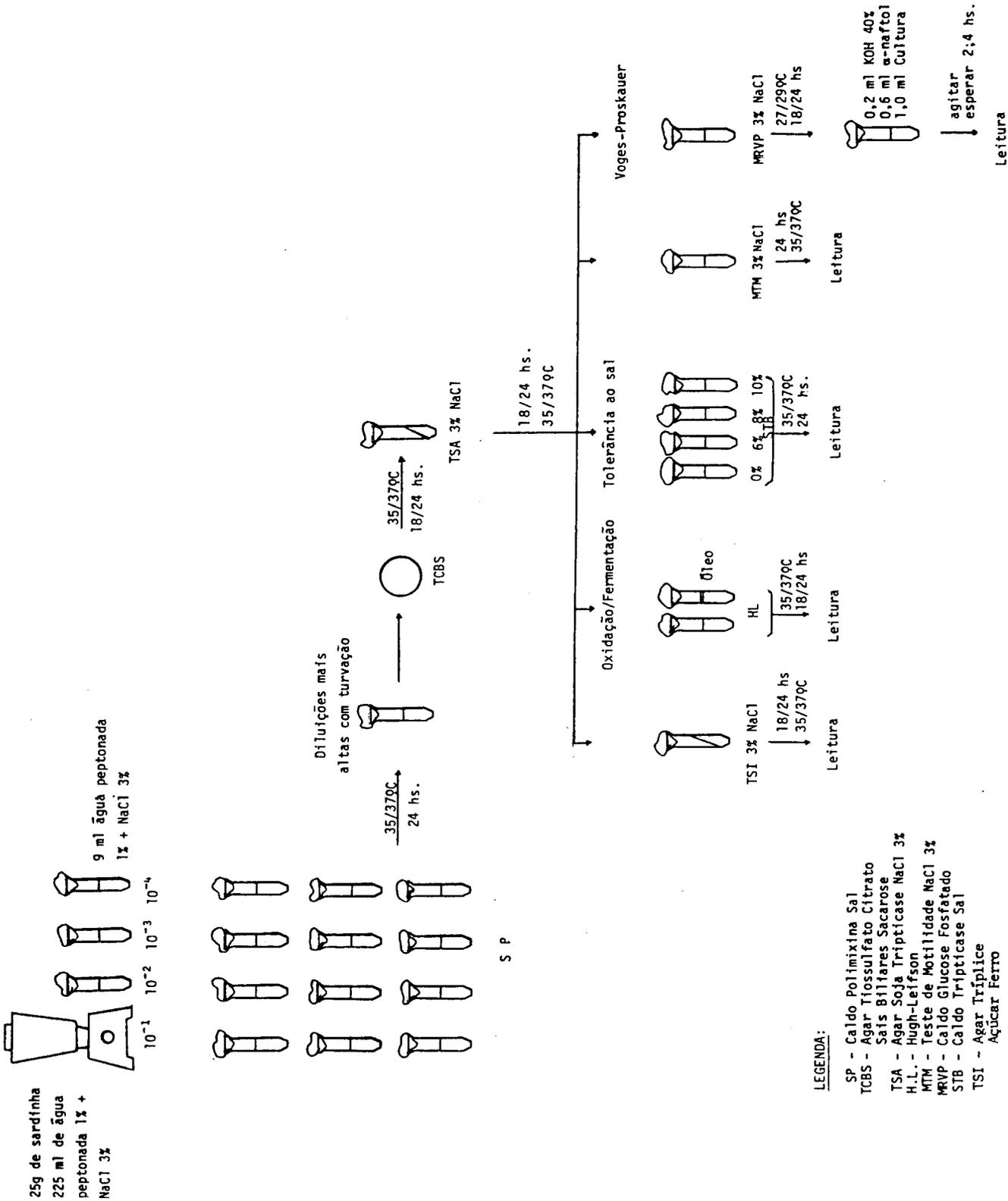


Figura 3 - ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM DE *Vibrio parahaemolyticus*

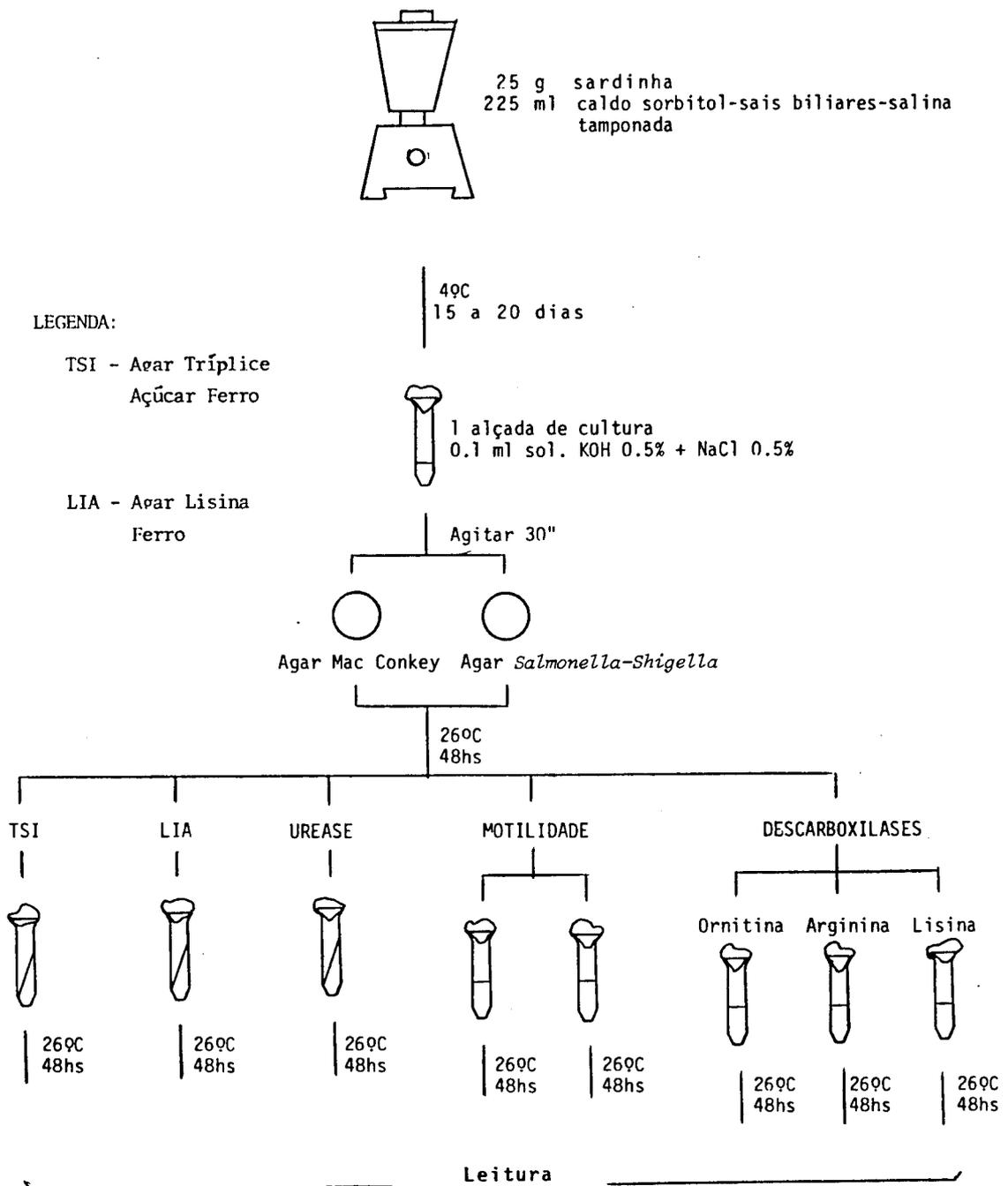


Figura 4 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Yersinia enterocolitica*

cessamento de Dados da Universidade Federal de Santa Catarina, através do qual determinamos a média, desvio padrão, erro padrão e moda.

Utilizou-se o teste t de "student" para a verificação do nível de contaminação das amostras. Verificou-se também a existência ou não de correlação entre os diferentes microrganismos pesquisados.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos

Pela Tabela 1, verificamos que, todas as amostras das peixarias, bem como as dos distribuidores apresentaram microrganismos mesófilos.

De acordo com os dados da Tabela 2, das 50 amostras coletadas em peixarias, 2 (4,0%) apresentaram valores entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/G; 24 (48,0%) apresentaram valores entre  $10^4$  e  $10^5$  UFC/G; 19 (38,0%) entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/G e 5 (10,0%) entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/G. Entre os distribuidores, 2 (66,6%) apresentaram valores entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/G e 1 (33,3%) entre  $10^6$  e  $10^7$ .

Segundo a Tabela 3, a contagem de microrganismos mesófilos variou de  $3,4 \times 10^3$  a  $1,9 \times 10^6$  UFC/G com contagem média de  $3,1 \times 10^5$  UFC/G nas amostras provenientes de peixarias e  $1,2 \times 10^5$  a  $3,3 \times 10^6$  UFC/G com contagem média de  $1,7 \times 10^6$  UFC/G nas amostras coletadas nos distribuidores de pescado.

Brandão et alii<sup>(16)</sup> pesquisando sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) evisceradas e decapitadas comercializadas em feiras livres do município de São Paulo constataram que a contagem de bactérias aeróbias ou facultativas mesófilas variaram de  $7,90 \times 10^3$  a  $4,60 \times 10^6$  UFC/G.

No Brasil, Watanabe<sup>(105)</sup> pesquisou em feiras livres, peixarias e supermercados a contaminação em pele de pescado, e obteve na contagem total em placas a 25 °C os valores de  $4,20 \times 10^6$  UFC/CM<sup>2</sup>,  $2,50 \times 10^6$  UFC/CM<sup>2</sup> e  $2,30 \times 10^6$  UFC/CM<sup>2</sup>, respectivamente.

Leon et alii<sup>(63)</sup> analisando o pescado comercializado nos mercados e supermercados da cidade de Guatemala, obtiveram em 72%

das amostras contagens de bactérias aeróbias acima de  $10^6$  UFC/G.

Na cidade de São Paulo, Lopes<sup>(65)</sup>, analisando amostras de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) e pescada branca (*Microdon acylodon*) coletadas na companhia de entrepostos e armazéns gerais do Estado de São Paulo - GEASP, encontrou na contagem padrão de bactérias mesófilas, com incubação a  $25^{\circ}\text{C}$  por 72 horas, valores que variaram de  $7,60 \times 10^4$  a  $5,00 \times 10^6$  UFC/G para as amostras de sardinha e  $7,60 \times 10^4$  a  $7,00 \times 10^7$  UFC/G para pescada branca.

No Rio de Janeiro, Barros et alii<sup>(8)</sup>, analisando amostras de camarão congelado encontraram uma média de mesófilos de  $4,2 \times 10^6$  UFC/G. O mesmo autor<sup>(7)</sup> examinando filê de pescado congelado observou que na contagem total de mesófilos, realizada a  $30^{\circ}\text{C}$  por 72 horas, 29,40% das amostras apresentaram valores de  $10^3$  a  $10^5$  UFC/G, 35,28% de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/G e a mesma porcentagem para as diluições de  $10^6$  a  $10^8$ .

Nos E.U.A., Foster, J.F. et alii<sup>(34)</sup>, pesquisando a qualidade microbiológica de quatro produtos do mar congelados e sete frescos verificaram que a média geométrica da contagem aeróbia, em placa, variou de  $3,5 \times 10^3$  UFC/G a  $9,3 \times 10^4$  UFC/G para os produtos congelados e de  $7,8 \times 10^4$  UFC/G a  $2,7 \times 10^8$  UFC/G para produtos frescos.

No presente estudo os resultados da contagem média de microrganismos mesófilos revelam que, as amostras dos distribuidores apresentaram maior contaminação do que as amostras das peixarias. Estas, por sua vez, apresentaram menos contaminação que as amostras pesquisadas por Watanabe<sup>(105)</sup> e Leon et alii<sup>(63)</sup>.

Pela Tabela 4 verificou-se que, para microrganismos mesófilos as amostras obtidas de um mesmo distribuidor, no momento da captura e no porão do barco apresentaram os valores  $3,9 \times 10^3$  e

$1,2 \times 10^5$  UFC/G, respectivamente. Podemos observar que a amostra coletada no porão do barco apresentou um aumento de dois ciclos logarítmicos em relação a amostra coletada no momento da captura. Isto pode ser devido a má distribuição do gelo a bordo e insuficiência na massa do pescado, permitindo uma maior proliferação de bactérias mesófilas bem como a manipulação inadequada do produto a bordo e condições higiênico-sanitárias deficientes<sup>(38)</sup>.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, 10% das amostras coletadas em peixarias e 33,3% das amostras coletadas em distribuidores de pescado, apresentaram na contagem total de mesófilos valores acima de  $10^6$  UFC/G, mas se considerarmos a contagem média das amostras coletadas em peixarias (Tabela 3), verificamos que a mesma apresenta valores abaixo de  $10^6$  UFC/G de sardinha, enquanto que a contagem média das amostras dos distribuidores é superior a este valor.

A portaria nº 001 de janeiro de 1987<sup>(26)</sup>, embora seja a mais recente em relação a padrões microbiológicos para alimentos, não apresenta, para pescados crus, frescos e refrigerados, limite máximo para contagem padrão em placas. Deste modo, utilizamos o padrão fixado pela Resolução Nº 13/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA<sup>(24)</sup> que estabelece como limite máximo:  $10^6$  UFC/G.

Elliot & Michener<sup>(26)</sup> estabelecem como limite máximo para mesófilos  $10^5$  UFC/G. Segundo eles, acima de  $10^6$  UFC/G pode se detectar a decomposição da maioria dos alimentos pelo odor, sabor ou aparência. Este pensamento está de acordo com Frazier<sup>(34)</sup>, 'Comite del Codex Alimentarius'<sup>(68)</sup> e com os padrões bacteriológicos de alimentos portugueses, descritos por Ribeiro<sup>(72)</sup>.

Shewan<sup>(91)</sup> através de um levantamento em relação aos padrões microbiológicos para peixe e produtos de pescado, sugeriu para

contagem total de bactérias viáveis a 35 °C, o limite máximo de  $2,5 \times 10^5$  UFC/G.

Considerando, para pescado cru, o padrão máximo de  $10^5$  UFC/G, verifica-se que 24 (48,0%) das amostras provenientes de peixarias e todas as amostras provenientes dos distribuidores de pescado apresentam valores acima do recomendado por estes autores.

Segundo Speck<sup>(2)</sup>, na maioria dos produtos marinhos crus frescos, a contagem aeróbia, em placa, a 35 °C deveria ser 1/10 da contagem a 20 °C. Contagens equivalentes em 20 e 35 °C sugerem erros de manipulação e contaminação por fontes humanas ou por animais de sangue quente. De acordo com o mesmo autor, pescado de boa qualidade deve apresentar, a 20 °C contagens menores que  $10^5$  UFC/CM<sup>2</sup> ou G. Pescado de qualidade aceitável até  $10^6$  UFC/G, apresentando contudo, uma vida de prateleira limitada, e contagens acima de  $10^6$  UFC/G podem evidenciar uma deterioração incipiente do pescado.

Aplicando-se os conceitos de Speck<sup>(2)</sup> para a nossa pesquisa, verifica-se que, das 50 amostras coletadas em peixarias, 26 (52,0%) são de boa qualidade e 24 (48,0%) são de qualidade aceitável bem como todas as amostras provenientes dos distribuidores. É interessante lembrar que a temperatura de incubação utilizada nesta pesquisa é diferente da sugerida pelo autor.

A contagem total de microrganismos mesofílicos deixa de ser eficiente quando se quer avaliar um alimento conservado em refrigeração, dado que em temperaturas entre 15 e 5 °C, ou mais baixas, a maioria dos microrganismos mesófilos morrem<sup>(68)</sup>. Para este fim é preferível a contagem de microrganismos psicrófilos a uma temperatura de 0 a 5 °C.

#### 4.2. Contagem Padrão de Microrganismos Psicrófilos

Verificamos, pela Tabela 1, que todas as amostras das peixarias e dos distribuidores apresentaram microrganismos psicrófilos.

Conforme Tabela 2, das 23 peixarias pesquisadas, 3 (13,0%) apresentaram contagem entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/G; 8 (34,8%) entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/G; 10 (43,5%) entre  $10^7$  e  $10^8$  UFC/G e 2 (8,7%) entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/G. Entre os distribuidores 1 (33,3%) apresentou valores entre  $10^4$  e  $10^5$  UFC/G e 2 (66,6%) entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/G.

As contagens de psicrófilos variaram entre  $1,4 \times 10^5$  e  $2,0 \times 10^8$  UFC/G com contagem média de  $1,5 \times 10^7$  UFC/G em amostras de peixarias e entre  $8,2 \times 10^4$  e  $9,3 \times 10^6$  UFC/G com contagem média de  $5,3 \times 10^6$  UFC/G em amostras de distribuidores o que pode ser verificado pela Tabela 3.

Fajardo et alii<sup>(28)</sup> ao examinar a flora do pescado capturado em águas tropicais, encontrou na contagem de bactérias psicrófilas realizada a  $10^\circ\text{C}$  por 7 dias, uma variação de  $10^3$  a  $10^7$  bactérias por grama.

Brandão et alii<sup>(16)</sup> investigando a qualidade microbiológica de sardinhas comercializadas em feiras livres e mercados obtiveram na contagem de psicrófilos uma variação de  $3,0 \times 10^3$  a  $3,52 \times 10^6$  ORG/G.

Pelo presente estudo verificamos, que as amostras de peixarias apresentaram microrganismos psicrófilos em números superiores a pesquisa de Fajardo<sup>(28)</sup> e Brandão<sup>(16)</sup>. A presença de elevado número de bactérias psicrófilas é de grande importância em alimentos armazenados sob refrigeração, visto que estes microrganismos desempenham um papel relevante no processo de deterioração, provocando desta forma uma diminuição da vida útil do pro-

duto.

Através da análise da Tabela 4 pode-se observar que os valores  $7,3 \times 10^5$  e  $8,2 \times 10^4$  UFC/G encontrados na contagem de bactérias psicrófilas correspondiam as amostras provenientes de um mesmo distribuidor, coletadas no momento da captura e no porão do barco, respectivamente.

A amostra da captura apresentou um ciclo logarítmico acima daquela coletada no porão do barco. Conforme mencionado anteriormente a contagem padrão de mesófilos das amostras deste mesmo distribuidor apresentaram uma redução de dois ciclos logarítmicos na captura em relação ao porão.

Segundo Shewan<sup>(91)</sup> a flora do pescado imediatamente após o resfriamento no porão do navio irá diferir qualitativa e quantitativamente do pescado não gelado, eviscerado e recém capturado. Desde a captura até o porto o pescado pode sofrer alterações, cuja extensão depende de muitos fatores, como exemplo: o tempo de transporte e a temperatura de armazenamento. Assim em regiões onde a pesca é próxima do porto o tempo entre a captura e o desembarque pode variar de poucas horas a 1 ou 2 dias. A temperatura do pescado durante o trajeto para o porto pode variar, dependendo da eficiência do gelo no porão do barco, a presença ou ausência de isolamento no porão, o mar externo e a temperatura do ar.

Acreditamos que, em nossa pesquisa, a redução do número de microrganismos psicrófilos após a captura do pescado, ou seja, no porão do barco, seja devido as condições inadequadas da temperatura de armazenamento no porão, como por exemplo, insuficiência de gelo, o que por sua vez, permitiu um aumento de bactérias mesófilas.

Nas peixarias observamos que a contagem média de microrga-

nismos psicrófilos atingiu valores superiores a contagem dos mesófilos (Tabela 3).

Leitão et alii<sup>(62)</sup> estudando as transformações microbiológicas, químicas e organolépticas de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) armazenadas sob refrigeração, evidenciaram que a microflora mesófila do pescado apresentou pouca ou nenhuma alteração durante o armazenamento, ou seja, variou no máximo de um ciclo logarítmico enquanto que a microflora de bactérias psicrófilas aumentou de 2 a 3 ciclos logarítmicos. Estes resultados indicam que a contagem de mesófilos tem pouco valor na avaliação da qualidade do pescado armazenado sob refrigeração, embora tenha grande importância quando se deseja pesquisar bactérias potencialmente patogênicas ao homem.

Devido a inexistência na Portaria nº 001 de 28/01/87 do Ministério da Saúde<sup>(26)</sup> de padrões para psicrófilos no pescado, tomou-se como referência o limite máximo de  $10^6$  UFC/G, valor este empregado pela APHA<sup>(2)</sup> e Ribeiro<sup>(84)</sup> como padrão para organismos psicrófilos.

Através dos resultados demonstrados na Tabela 1, podemos observar que das 23 amostras coletadas em peixarias, 20 (87,0%), apresentaram microrganismos psicrófilos acima de  $10^6$  UFC/G bem como 2 (66,6%) amostras provenientes dos distribuidores. Isto é confirmado pela contagem média destes microrganismos (Tabela 3).

#### 4.3. Enumeração de Bactérias Coliformes

De acordo com os dados da Tabela 1 das 53 amostras analisadas, 51 (96,2%) apresentaram coliformes totais; 21 (39,6%) apresentaram coliformes fecais e 9 (16,9%) apresentam *E. coli*, onde de 19 cepas isoladas 13 (68,4%) foram positivas para *E. coli* (Ta-

bela 5). Nas peixarias, das 50 amostras pesquisadas 48 (96,0%) evidenciaram bactérias coliformes totais: 19 (38,0%) coliformes fecais e 9 (18,0%) *E. coli*. Em relação aos distribuidores de pescado, todos apresentaram coliformes totais; 2 (66,6%) apresentaram coliformes fecais e em nenhuma amostra foi evidenciado *E. coli* (Tabela 1 e Figura 6).

Verificando a Tabela 2 observa-se que 5 (10,0%) das peixarias apresentaram valores de coliformes totais menor que  $10^1$ ; 18 (36,0%) entre  $10^1$  e  $10^2$  NMP/G; 22 (44,0%) entre  $10^2$  e  $10^3$  NMP/G e 3 (6,0%) entre  $10^3$  e  $10^4$  NMP/G. Todos os distribuidores apresentaram coliformes totais entre  $10^2$  e  $10^3$  NMP/G.

Pela Tabela 3 notamos que nas peixarias, os valores encontrados variaram entre 0,0 e  $2,4 \times 10^3$  NMP/G, com contagem média de  $3,8 \times 10^2$  NMP/G para coliformes totais; entre 0,0 e  $9,3 \times 10^1$  NMP/G com média de  $0,8 \times 10^1$  NMP/G para coliformes fecais e entre 0,0 e  $9,3 \times 10^1$  NMP/G com média de  $0,2 \times 10^1$  NMP/G para *E. coli*. Nos distribuidores os valores variam entre  $2,1 \times 10^2$  NMP/G e  $9,3 \times 10^6$  NMP/G e com contagem média de  $4,6 \times 10^2$  NMP/G para coliformes totais; entre 0,0 e  $7,5 \times 10^1$  NMP/G com contagem média de  $2,8 \times 10^1$  para coliformes fecais e em nenhuma das amostras foi verificado a presença de *E. coli*.

Na Inglaterra, Appleman, M.D. et alii<sup>(3)</sup> encontraram bactérias coli-aerogenas em todas as amostras de bolo de pescado congelado por ele pesquisado, onde 14% foi *E. coli* I e 6% *E. coli* II e em amostras de bolo de pescado não congelado 25% de *E. coli* I e 12% de *E. coli* II.

Nos E.U.A., Foster, J.F. et alii<sup>(34)</sup>, observaram que para organismos coliformes a média geométrica variou de 1,0 para 7,7 NMP/G para produtos do mar congelados e de 7,8 para  $4,8 \times 10^3$  NMP/G para alimentos frescos do mar. Das 597 unidades analisadas 4,7%

foram positivas para *E. coli*, das quais duas (4,0%) tinham valores de *E. coli* acima de 400 NMP/G.

Raj et alii<sup>(79, 80, 81)</sup>, encontraram um número bastante elevado de coliformes fecais particularmente enterococos, em produtos de pesca, não encontrando *Salmonella* nesses produtos.

Varga & Anderson<sup>(104)</sup>, pesquisaram coliformes e enterococos em filês de pescado e carne de lagosta e verificaram que estes microrganismos originaram-se de superfícies de trabalho sanitizadas inadequadamente, o que permitiu a sobrevivência e multiplicação dos mesmos. Portanto, os autores concluíram que a presença de coliformes e enterococos em filês de pescado e carne de lagosta reflete a qualidade da sanitização da indústria de pesca e não uma poluição fecal direta desses produtos. Nestes mesmos produtos os autores não encontraram *Salmonella* o que indica que houve uma contaminação mínima desses produtos com matéria fecal humana.

De 163 amostras testadas por Raj & Liston<sup>(80)</sup>, entre bacalhau, hipoglosso, ostra e outros, 48 apresentaram teste positivo em *Escherichia coli* medium, mas somente 16 (33,0%) das amostras continham *E. coli*.

No presente trabalho a contagem média de bactérias coliformes totais nas amostras de peixarias e nas amostras de distribuidores (Tabela 3) apresentaram relativamente o mesmo nível de contaminação. Já em relação aos coliformes fecais as amostras dos distribuidores mostraram-se levemente mais contaminadas que as das peixarias. A variação da contagem de coliformes totais das amostras das peixarias corresponde a encontrada por Foster<sup>(34)</sup> em produtos do mar frescos. No entanto, este último obteve menor contaminação por *E. coli* do que nas amostras de peixarias. Considerando-se a pesquisa de Appleman<sup>(3)</sup> em bolo de pescado não conge-

lado, verificamos que as peixarias apresentaram menor contaminação por *E. coli* I, que a encontrada pelos referidos autores.

Conforme o resultado apresentado na Tabela 4 as amostras de um mesmo distribuidor coletadas na captura apresentaram para coliformes totais  $4,3 \times 10^1$  NMP/G e as coletadas no porão do barco apresentaram para coliformes totais  $2,1 \times 10^2$  NMP/G. Nenhuma destas amostras apresentaram coliformes fecais nem *E. coli*.

O aumento de um ciclo logarítmico na amostra do porão do barco pode ser devido a manipulação inadequada ou contaminação localizada no barco de pesca.

Segundo Varga & Anderson<sup>(104)</sup> peixe de alto mar capturados em áreas não poluídas, não apresentam contaminação por coliformes fecais nem por enteropatógenos nem por *S. aureus*. No entanto, através do manuseio, do contato com o gelo e com equipamentos, é freqüente a contaminação por esses microrganismos.

Leitão et alii<sup>(62)</sup> estudando as transformações microbiológicas, químicas e organolépticas da sardinha armazenada sob refrigeração obteve no tempo zero, dias de armazenamento, os valores 1,5 e 2,9 coliformes totais/G de sardinha integral e 9,3 e 1,5 coliformes totais/G de sardinha eviscerada e descabeçada. Nesta mesma pesquisa não foi encontrado em nenhuma amostra coliformes fecais. Segundo os autores, coliformes fecais raramente são constatados em pescado capturados em águas não contaminadas, e sua ausência pode ser atribuída a este fator, uma vez que as sardinhas são geralmente capturadas em pontos afastados da costa.

Da mesma forma que para os microrganismos psicrófilos, não existe limite para os microrganismos coliformes totais em pescado - Portaria Nº 001 de 28/01/87 do Ministério de Saúde<sup>(26)</sup>. Desta forma tomou-se como referência nesta pesquisa o limite máximo

fixado por aquele mesmo órgão, para a enumeração de bactérias coliformes fecais, ou seja,  $10^2$  NMP/G.

Analisando a Tabela 1 constata-se que 25 (50,0%) das amostras coletadas em peixarias e todas coletadas nos distribuidores apresentam coliformes totais acima de  $10^2$  NMP/G. Nenhuma das amostras coletada nas peixarias bem como a coletada nos distribuidores apresentaram coliformes fecais acima de  $10^2$  NMP/G. No entanto 1 (2,0%) amostra coletada em peixaria apresentou *E. coli* em 0,1G.

O "Comite del Codex Alimentarius"<sup>(70)</sup> e ICMSF<sup>(46)</sup> estabelece para pescado fresco o limite máximo de  $2 \times 10^2$  coliformes totais/G e  $1 \times 10^2$  coliformes fecais/G.

Analisando os valores encontramos no presente trabalho (Tabela 2) constatamos que 25 (50,0%) das amostras coletadas em peixarias e todas as amostras dos distribuidores ultrapassam o limite para coliformes totais. As amostras das peixarias bem como as dos distribuidores apresentaram coliformes fecais dentro do valor permitido. Esses valores são inferiores aos encontrados por Haida<sup>(42)</sup>.

Segundo Ribeiro<sup>(84)</sup> o pescado cru apresenta ausência de bactérias coliformes em 0,01G de amostra e ausência de *E. coli* em 0,1G. Através da Tabela 1 observa-se que somente 1 (2,0%) amostra excedeu o valor estabelecido para *E. coli*.

#### 4.4. Isolamento, Identificação e Contagem de *Staphylococcus aureus*

Pela Tabela 1 verifica-se que das 53 amostras coletadas nas peixarias e distribuidores, 13 (24,5%) apresentaram *S. aureus*; das

quais 12 (24,0%) pertenciam a peixarias, e 1 (33,3%) pertencia a um distribuidor de pescado. Nas amostras de peixarias foram isoladas 35 cepas das quais 22 (63,0%) foram positivas para *S. aureus* e nas amostras dos distribuidores as duas cepas isoladas confirmaram ser *S. aureus* (Tabela 5).

Somente em 1 (2,0%) amostra proveniente de peixaria isolou-se cepa produtora de enterotoxina do tipo B.

Segundo a Tabela 2 e Figura 5, nas peixarias, 7 (14,0%) amostras apresentaram contagem em  $10^3$  e  $10^4$  UFC/G; 4 (8,0%) entre  $10^4$  e  $10^5$  e 1 (2,0%) entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/G; e nos distribuidores somente 1 (33,3%) apresentou *S. aureus* com contagem entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/G.

Nas peixarias a contagem de *S. aureus* variou de 0,0 a  $1,2 \times 10^5$  UFC/G, com média de  $6,0 \times 10^3$  UFC/G e nos distribuidores variou de 0,0 a  $3,1 \times 10^3$  UFC/G, com média de  $1,0 \times 10^3$ , segundo dados anotados na Tabela 3.

Haida<sup>(42)</sup> pesquisando a contaminação de sardinha comercializada em supermercados, feiras livres e peixarias, encontrou em 42,72% das amostras analisadas *S. aureus* em número superior a  $10^3$  UFC/G.

Appleman, M.D. et alii<sup>(3)</sup> encontraram estafilococos coagulase positivo em três de seis amostras de filês de bacalhau sem pele, em 60% de bolo de pescado não congelado e em 40% do mesmo congelado.

Foster, J.F. et alii<sup>(34)</sup> verificaram que de 597 unidades analisadas distribuídas entre produtos do mar frescos e congelados, 7,9% foram positivas para *S. aureus*, embora nenhuma delas tenham excedido o limite recomendado pela ICMSF.

Pela análise da Tabela 4, as amostras de um mesmo distribuidor coletadas no momento da captura e no porão não apresentaram

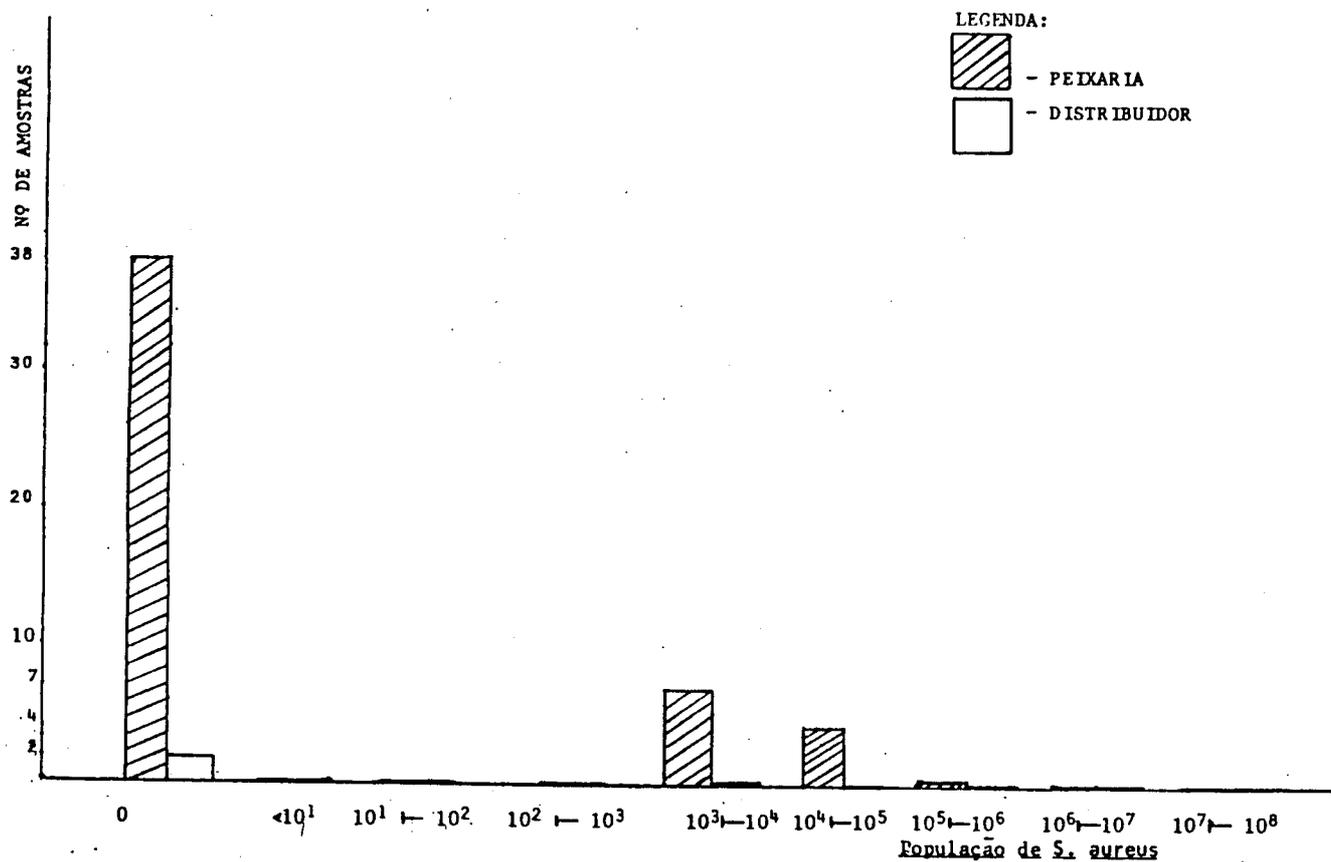


FIGURA 5 - Frequência de *Staphylococcus aureus* em amostras de Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) de peixarias e distribuidores de pescado da Grande Florianópolis.

*S. aureus*. O pescado recém capturado está normalmente isento de *S. aureus*, mas se as condições higiênico-sanitárias dos barcos, portos e pessoal for deficiente poderá ocorrer um sensível aumento na microflora.

A Tabela 1 mostra que 12 (22,6%) amostras provenientes de peixarias e 1 (33,3%) proveniente de distribuidor apresentaram *S. aureus* em valores superiores a  $10^3$  UFC/G, limite máximo permitido pela Portaria Nº 001 de 28/01/87 do Ministério da Saúde<sup>(26)</sup>.

Comparando os dados obtidos no presente estudo com os dados de autores anteriormente citados, verificamos que os valores por nós encontrados são inferiores aos citados por Haida<sup>(42)</sup> e Appleman<sup>(3)</sup>, e embora estejam acima do padrão estabelecido pela Portaria Nº 001 do Ministério da Saúde<sup>(26)</sup> apresentam valores satisfatórios de *S. aureus* em relação a outras pesquisas. Isto não justifica a carência de cuidados higiênico-sanitários, principalmente no manuseio do pescado, uma vez que os manipuladores são a principal fonte de contaminação.

#### 4.5. Isolamento e Identificação de *Salmonella* sp.

Segundo a Tabela 1 e a Figura 6 somente 1 (2,0%) das amostras provenientes das peixarias apresentou *Salmonella* sp. em 25G de pescado. Na análise da Tabela 5 constatou-se que de 5 cepas isoladas, 3 (60,0%) foram positivas para *Salmonella* sp.

Nenhuma das amostras dos distribuidores de pescado e nem a amostra da captura, apresentaram *Salmonella* sp. Normalmente o pescado não apresenta esta bactéria, mas pode ser adquirida através de operações de manipulação, transporte ou processamento quando esses são executados sob condições sanitárias inadequadas ou

ainda quando os peixes são capturados em águas poluídas<sup>(90)</sup>.

Gulasekharam, J. et alii<sup>(41)</sup>, mencionam que a maioria dos organismos patogênicos encontrados no pescado cru seriam destruídos durante o processo de cozimento normal, mas é possível que um número significativo possa sobreviver a outras formas de preparação do produto para o consumo humano. O perigo mais importante, contudo, parece estar situado na manipulação do pescado cru e o descarte durante a sua limpeza e preparação na cozinha. Os dedos do cozinheiro ou utensílios poderiam ser contaminados e o organismo ser transferido para outros pratos prontos os quais podem atuar como excelente meio de cultura e permitir a multiplicação de *Salmonella* em quantidade suficiente para manifestar surtos de envenenamento alimentar.

Nos climas mais quentes onde existe uma intensa contaminação ambiental com excrementos animais e humanos o risco de infecção por *Salmonella* é grande e aumenta quando os pescados são lavados em águas contaminadas<sup>(29)</sup>.

Barros et alii<sup>(8)</sup> avaliando a qualidade higiênico-sanitária de camarão descascado, descabeçado e congelado não encontrou *Salmonella* em nenhuma das amostras.

Steiniger<sup>(95)</sup> encontrou diferentes espécies de *Salmonella* nas águas do porto e Barcelona e sua vizinhança.

Em Paris, na água de mar que recebia água de esgoto não tratada Buttiaux & Leurs<sup>(21)</sup> encontraram *S. montevideo* em número de 10 a 20 e sua contagem não diminuiu consideravelmente quando a água foi mantida +4 °C nas garrafas. Isto indica que não é excepcional encontrar *Salmonella* viável em água do mar contaminada por água poluída.

Appleman, M.D. et alii<sup>(3)</sup>, verificaram que de 58 amostras

de bolo de peixe congelado, somente uma apresentou *Salmonella*. Segundo esses autores é muito remota a probabilidade da *Salmonella* ser um perigo potencial associado ao consumo de pescado e produtos de pesca, como o é para produtos animais, uma vez que o pescado, pelo menos o de origem marinha, não carregam esses microrganismos como flora nativa, mas como um contaminante casual presente em áreas poluídas.

Nos E.U.A., Foster, J.F. et alii<sup>(33)</sup> pesquisando a qualidade microbiológica de 597 unidades de alimentos do mar congelados e frescos não encontrou *Salmonella* em nenhuma das amostra testadas.

#### 4.6. Isolamento, Identificação e Contagem de *Vibrio parahaemolyticus*

Pela Tabela 1 e Figura 6 podemos verificar que nenhuma das amostras pesquisadas apresentaram *Vibrio parahaemolyticus*.

Johnson et alii<sup>(47)</sup>, isolaram *Vibrio parahaemolyticus* de uma grande variedade de alimentos marinhos tais como, pescado, moluscos e crustáceos coletados nas costas do oceano atlântico e pacífico.

No Brasil esta bactéria foi isolada em ostras na Baía de Sepetiba<sup>(4)</sup>, na região litorânea de São Paulo<sup>(60)</sup> e em águas da Baía de Guanabara<sup>(9)</sup>.

O *Vibrio parahaemolyticus* é geralmente encontrado em ambiente marinho, principalmente nos meses de verão e embora as análises microbiológicas tenham sido realizadas de março a dezembro, ou seja, em diferentes épocas do ano, não se detectou a presença desta bactéria. O mesmo ocorreu no trabalho desenvolvido por Foster et alii<sup>(34)</sup>. Esses resultados contrariam as pesquisas de Barros<sup>(6)</sup> e Leitão et alii<sup>(61)</sup>.

#### 4.7. Isolamento, Identificação e Contagem de *Yersinia enterocolitica*

A *Yersinia enterocolitica* foi isolada em diversos alimentos, como leite e derivados, ovos, carnes, aves, vegetais<sup>(97)</sup> e pescado<sup>(50)</sup>.

Kapperud & Jonsson<sup>(50)</sup> investigaram a presença de *Y. enterocolitica* em 20 trutas marrom (*Salmo trutta L.*) da área de Noruega ocidental e isolaram três linhagens de três destas trutas.

Peixoto et alii<sup>(75)</sup> pesquisaram *Y. enterocolitica* em 45 amostras de ostra, 50 de camarão e 58 de caranguejo azul coletadas na costa do Golfo do Texas e isolaram o referido microrganismo em 6 (13%) amostras de ostras, 2 (4%) de camarão e 12 (21%) de caranguejo azul.

Embora a *Yersinia enterocolitica* já tenha sido encontrada em pescado<sup>(50)</sup> no presente estudo não encontramos o referido microrganismo.

#### 4.8. Avaliação Estatística do Grau de Contaminação das Amostras de Peixarias

Pelos resultados apresentados na Tabela 6 verifica-se que:

(1) para microrganismos mesófilos, coliformes fecais e *E. coli* o valor médio encontrado ( $3,1 \times 10^5$  UFC/G,  $0,8 \times 10^1$  NMP/G e  $0,2 \times 10^1$  NMP/G), em relação ao valor médio esperado ( $1 \times 10^6$  UFC/G,  $1 \times 10^2$  NMP e  $1 \times 10^1$  UFC/G) e os valores calculados de T (-10,6, -30,6 e -4,0) comparando com o T tabelado (1,68) nos leva a aceitar a hipótese de que a contagem dos microrganismos mesófilos, coliformes fecais e *E. coli* é menor ou igual ao limite máximo permitido. (2) Para microrganismos psicrófilos, coliformes totais e *S.*

*aureus*, o valor médio encontrado foi ( $1,5 \times 10^7$  UFC/G,  $3,8 \times 10^2$  NMP/G e  $6,0 \times 10^3$  UFC/G) em relação ao valor médio esperado ( $1 \times 10^6$  UFC/G;  $1 \times 10^2$  NMP/G e  $1 \times 10^3$  UFC/G) e valores calculados de T (2,5; 4,0 e 2,0) comparando com o T tabelado (1,71 para psicrófilos e 1,68 para coliformes totais e *S. aureus*), nos leva a rejeitar a hipótese de que a contagem média dos microrganismos psicrófilos, coliformes totais e *S. aureus* é menor ou igual ao limite máximo permitido, ou seja, a quantidade de microrganismos excede o limite máximo estabelecido, ocorrendo uma diferença significativa em relação a este limite, indicando uma alta contaminação das amostras em análise.

Não houve correlação entre os diferentes microrganismos, exceto entre coliformes fecais e *E. coli* onde verificou-se uma média correlação ( $r = 0,64$ ) a nível de 0,05 entre estes números o que significa que a medida que aumenta o número de coliformes fecais, aumenta a probabilidade de se encontrar *E. coli*.

#### 4.9. Considerações Gerais sobre os Resultados

O elevado índice de microrganismos psicrófilos, *S. aureus*, *E. coli* e a presença de *Salmonella* sp. nas peixarias, indica que, embora as sardinhas estejam sendo armazenadas em temperaturas adequadas, estão sofrendo contaminação adicionais devido a condições higiênico-sanitárias precárias, tanto do estabelecimento de venda do produto como do pessoal envolvido na sua comercialização.

A presença do elevado número de microrganismos mesófilos e coliformes fecais nas amostras dos distribuidores em relação as amostras das peixarias mostram que o armazenamento das sardinhas no porão dos barcos esta sendo inadequado, bem como, condições

higiênico-sanitárias deficientes, uma vez que as sardinhas se encontram contaminadas por matéria-fecal.

O elevado número de microrganismos psicrófilos em relação a mesófilos na amostra da captura do pescado no mar e o elevado número de microrganismos mesófilos em relação a psicrófilos na amostra do porão do barco, nos permite confirmar que, nos distribuidores, as sardinhas estão sendo armazenadas sob condições inadequadas.

Os resultados gerais desta pesquisa mostram que as sardinhas comercializadas na região da grande Florianópolis não apresentaram microrganismos potencialmente patogênicos em quantidade significativa para criar um problema de saúde pública. Necessita-se no entanto adotar melhores condições de armazenamento do pescado e práticas higiênico-sanitárias mais rígidas, tanto nas peixarias como nos distribuidores de pescado, particularmente no que se refere a higienização do pessoal operário e limpeza e desinfecção dos barcos de pesca.

TABELA 1 - Frequência de amostras positivas e acima do padrão microbiológico em Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) coletada em peixarias e distribuidores de pescado da Grande Florianópolis.

MICROORGANISMOS	TOTAL						PEIXARIAS						DISTRIBUIDORES									
	POSITIVAS		ACIMA DO PADRÃO		POSITIVAS		ACIMA DO PADRÃO		POSITIVAS		ACIMA DO PADRÃO		POSITIVAS		ACIMA DO PADRÃO							
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%						
Mesófilos (UFC/g)*	53	100,0	06	11,3	50	100,0	05	10,0	03	100,0	01	33,3	26	100,0	22	84,6	23	100,0	03	100,0	02	66,6
Psicrófilos (UFC/g)***	51	96,2	28	52,8	48	96,0	25	50,0	03	100,0	03	100,0	21	39,6	00	0,0	19	38,0	02	66,6	00	0,0
Coliformes Totais (NMP/g)****	09	16,9	01	1,9	09	18,0	01	2,0	00	0,0	01	11,1	09	16,9	01	1,9	09	18,0	00	0,0	00	0,0
Coliformes Fecais (NMP/g)**	13	24,5	13	24,5	12	24,0	12	24,0	01	33,3	01	33,3	13	24,5	13	24,5	12	24,0	01	33,3	01	33,3
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)*****	01	1,9	01	1,9	01	2,0	01	2,0	00	0,0	00	0,0	01	1,9	01	1,9	01	2,0	00	0,0	00	0,0
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)**	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0
<i>Salmonella</i> (em 25 g)**	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (NMP/g)**	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0
<i>Yersinia enterocolitica</i> (em 25 g)	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0	00	0,0

LEGENDA: \*

- Resolução nº 13 de 03/78 - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA.

\*\* - Portaria nº 001 de 28/01/87 - Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos - DINAL - Ministério da Saúde.

\*\*\* - Como referência para Psicrófilos, utilizou-se o limite máximo para Mesófilos =  $10^6$  UFC/g.

\*\*\*\* - Para Coliformes Totais, empregou-se o limite máximo estabelecido para Coliformes Fecais =  $10^2$  NMP/g.

\*\*\*\*\* - Como limite máximo para *Escherichia coli*, empregou-se o valor estabelecido por Ribeiro (84), ou seja, ausência em 0,1g.

TABELA 2 - Distribuição do número e percentagem das amostras segundo o tipo e contagem de microrganismos em amostras de Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) coletadas em peixarias e em distribuidores de pescado da Grande Florianópolis.

MICROORGANISMOS	Procedência	Total de Amostras	D I S T R I B U I Ç Ã O													
			<10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup> - 10 <sup>9</sup>					
		Nº %	Nº %	Nº %	Nº %	Nº %	Nº %	Nº %	Nº %	Nº %	Nº %	Nº %				
Mesófilos (UFC/g)	P	50	-	-	-	02	4,0	24	48,0	19	38,0	05	10,0	-	-	-
	D	03	-	-	-	-	-	-	-	02	66,66	01	33,33	-	-	-
Psicrófilos (UFC/g)	P	23	-	-	-	-	-	-	-	-	03	13,04	08	34,8	10	43,5
	D	03	-	-	-	-	-	01	33,33	-	-	02	66,66	-	-	-
Colliformes Totais (NMP/g)	P	50	02	4,0	18	36,0	22	44,0	03	6,0	-	-	-	-	-	-
	D	03	-	-	-	-	03	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Colliformes Fecais (NMP/g)	P	50	31	62,0	10	20,0	09	18,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	03	01	33,3	01	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	P	50	41	82,0	08	16,0	01	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	03	03	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	P	50	38	76,0	-	-	-	07	14,0	04	8,0	01	2,0	-	-	-
	D	03	02	66,6	-	-	-	01	33,3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (NMP/g)	P	50	50	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	03	03	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> (em 25g)	P	50	50	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	03	03	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> (em 25g)	P	50	50	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	03	03	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LEGENDA: P = Peixaria  
D = Distribuidor

TABELA 3 - Variação da contagem e contagem média de microrganismos em amostras de Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) de peixarias e distribuidores de pescado.

MICROORGANISMOS	Contagem (Peixaria)		Contagem (Distribuidor)	
	Variação	Média	Variação	Média
Mesófilos (UFC/g)	$3,4 \times 10^3 - 1,9 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5 - 3,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
Psicrófilos (UFC/g)	$1,4 \times 10^5 - 2,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$8,2 \times 10^4 - 9,3 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$
Coliformes Totais (NMP/g)	0,0 - $2,4 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2 - 9,3 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$
Coliformes Fecais (NMP/g)	0,0 - $9,3 \times 10^1$	$0,8 \times 10^1$	0,0 - $7,5 \times 10^1$	$2,8 \times 10^1$
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	0,0 - $9,3 \times 10^1$	$0,2 \times 10^1$	0,0 - 0,0	0,0
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	0,0 - $1,2 \times 10^5$	$6,0 \times 10^3$	0,0 - $3,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$

TABELA 4 - Número de microrganismos encontrados em Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) coletada na captura e no porão do mesmo barco.

MICROORGANISMOS	P R O C E D Ê N C I A	
	Captura	Porão
Mesófilos (UFC/g)	$3,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5$
Psicrófilos (UFC/g)	$7,3 \times 10^5$	$8,2 \times 10^4$
Coliformes Totais (NMP/g)	$4,3 \times 10^1$	$2,1 \times 10^2$
Coliformes Fecais (NMP/g)	0,0	0,0
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	0,0	0,0
<i>Salmonella</i> (em 25 g)	Ausente	Ausente
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (NMP/g)	0,0	0,0
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	0,0	0,0
<i>Yersinia enterocolitica</i> (em 25g)	Ausente	Ausente

TABELA 5 - Relação entre cepas isoladas e cepas positivas de diferentes microrganismos em amostras de Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) de peixarias e distribuidores de pescado.

MICRORGANISMOS	Proce- dência	Total de amostras positivas	C E P A S			
			Isoladas		Positivas	
			Nº	%	Nº	%
<i>Escherichia coli</i>	P	09	19	38,0	13	68,4
	D	00	0	0,0	0	0,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	P	12	35	70,0	22	63,0
	D	01	02	66,6	02	100,0
<i>Salmonella</i> sp	P	01	05	10,0	03	60,0
	D	00	0	0,0	0	0,0

LEGENDA: P = Peixarias

D = Distribuidores

TABELA 6 - Avaliação estatística de amostras de Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) de peixarias da Grande Florianópolis.

MICROORGANISMOS	Conta-gem Média	Padrão Microbiológico	Erro Padrão	Desvio Padrão	Moda	T Tabe-lado	T Calculado	Hipótese $\alpha = 0,05$
Mesófilos (UFC/g)	$3,1 \times 10^5$	$10^6$	$6,5 \times 10^4$	$4,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	1,68	-10,6	Aceita A
Psicrófilos (UFC/g)	$1,5 \times 10^7$	$10^6$	$5,5 \times 10^6$	$3,9 \times 10^7$	0,0	1,71	2,5	Rejeitada B
Coliformes Totais (NMP/g)	$3,8 \times 10^2$	$10^2$	$7,7 \times 10^1$	$5,5 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	1,68	4,0	Rejeitada C
Coliformes Fecais (NMP/g)	$0,8 \times 10^1$	$10^2$	$0,3 \times 10^1$	$1,9 \times 10^1$	0,0	1,68	-30,6	Aceita D
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	$0,2 \times 10^1$	$10^1$	$0,2 \times 10^1$	$1,3 \times 10^1$	0,0	1,68	- 4,0	Aceita E
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	$6,0 \times 10^3$	$10^3$	$2,9 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$	0,0	1,68	2,0	Rejeitada F

LEGENDA:

- A = Hipótese Nula  $\leq 10^6$  UFC/g
- B = Hipótese Nula  $\leq 10^6$  UFC/g
- C = Hipótese Nula  $\leq 10^2$  NMP/g
- D = Hipótese Nula  $\leq 10^2$  NMP/g
- E = Hipótese Nula  $\leq 10^1$  UFC/g
- F = Hipótese Nula  $\leq 10^3$  UFC/g

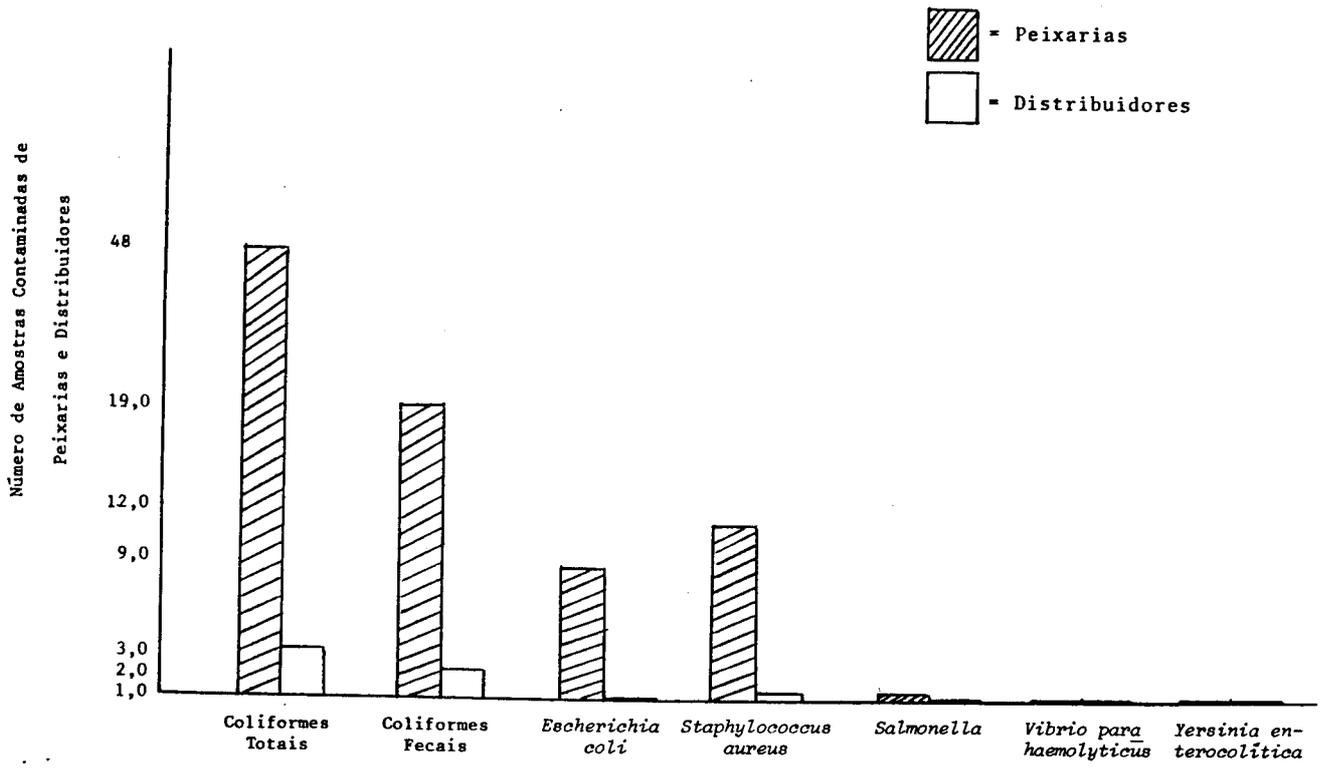


FIGURA 6 - Frequência dos microrganismos encontrados em amostras de Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) de peixarias e distribuidores de pescado da Grande Florianópolis.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitiram chegar as seguintes conclusões:

1) De acordo com a contagem média, as amostras de peixarias apresentaram microrganismos mesófilos, coliformes fecais e *E. coli* dentro do limite máximo permitido, enquanto que a contagem de microrganismos psicrófilos, coliformes totais e *S. aureus* encontraram-se acima de seus respectivos limites. *Salmonella* sp., foi encontrada em uma amostra e, em nenhuma amostra encontrou-se *Vibrio parahaemolyticus* nem *Yersinia enterocolitica*.

2) As amostras dos distribuidores apresentaram na contagem média, microrganismos mesófilos, microrganismos psicrófilos, coliformes totais e *S. aureus*, acima do limite máximo estabelecido, enquanto que coliformes fecais e *E. coli* estão de acordo com os limites pré-estabelecidos. *Salmonella* sp., *Vibrio parahamolyticus* e *Yersinia enterocolitica* não foram encontrados em nenhuma das amostras.

3) As amostras de peixarias apresentaram maior contaminação por microrganismos psicrófilos, *S. aureus* e *E. coli* do que as amostras dos distribuidores. Estas, por sua vez, apresentaram maior contaminação que as peixarias quanto a microrganismos mesófilos e coliformes fecais. Quanto a coliformes totais, verificamos o mesmo nível de contaminação em ambas amostras.

4) A amostra coletada na captura do pescado em alto mar apresentou maior contaminação por microrganismos psicrófilos que a amostra do porão do mesmo barco. Por outro lado, a amostra do porão mostrou-se mais contaminada por microrganismos mesófilos e coliformes totais que a amostra de captura. Em nenhuma das si-

tuações foram encontrados coliformes fecais, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., *Vibrio parahaemolyticus* nem *Yersinia enterocolitica*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, R.; FARBER, L. and LERKE, P. Bacteriology of spoilage of fish muscle. II. Incidence of during spoilage. *Appl. Microbiol.*, 12(3):277-9, 1964.
2. APHA & INTERSOCIETY/AGENCY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL METHODS FOR FOOD. In: SPECK, M.L., ed. *Compedium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, 1976. 701p.
3. APPLEMAN, M.D.; NORA, B. and SHEWAN, J.M. A study of some organisms of public health significance from fish and fishery products. *J. of Appl. Bact.*, 27(1):69-77, 1964.
4. BAROSS, J. and LISTON, J. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the Northwest Pacific. *Nature*, 217:1263-1264, 1968.
5. BAROSS, J. and LISTON, J. Ocurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related hemolytic vibrios in marine environments of Washington State. *Appl. Microbiol.*, 20:179-186, 1970.
6. BARROS, G.C. *Vibrio parahaemolyticus: Isolamento e identificação em crustáceos e moluscos da Baía de Sepetiba*. Tese apresentada a Universidade Federal Fluminense para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária área de Ciência, Higiene e Tecnologia de Alimentos, p.70, 1977.
7. BARROS, G.C. & ROBBS, P.G. Bacteremia e colorimetria de filés de pescado congelados coletados no Rio de Janeiro. *Pesqui. Agropecu. Bras., Ser. Vet.*, Rio de Janeiro, 10:69-73, 1975.
8. BARROS, G.C.; ROBBS, P.G. & SOARES, L.C. Estudo microbiológico em camarão descascado e congelado, destinado ao consumo no Rio de Janeiro. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 19:203-208, 1977.

9. BARROS, G.C.; VIANNI, M.C.E. *Vibrio parahaemolyticus*: isolamento e identificação em águas da Baía de Guanabara. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 22:163-169, 1980.
10. BARTLEY, C.O. and SLANET, L.W. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine waters and oysters of New Hampshire. *Appl. Microbiol.*, 21:965-966, 1971.
11. BERG, R.W. & ANDERSON, A.W. Salmonellae and *Edwardsiella tarda* in gull feces: a source of contamination in fish processing plants. *Appl. Microbiol.*, 24(3):501-3, 1972.
12. BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: MONTIE, T.C.; KADIS, S.; AJL, S.J. eds. *Microbial toxins*. New York, Academic Press, V.3, p.265-326, 1970.
13. \_\_\_\_\_ The enterotoxins. In: COHEN, J.O., ed. *The Staphylococci*. New York, John Wiley, p.301-31, 1972.
14. BERTULLO, V.H. *Tecnología de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustáceos*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina, 1975. 538p.
15. BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: A panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC. Critical Reviews in Microbiology*, 5:211-241, 1977.
16. BRANDÃO, M.L.C.C.; FURNALETTO, S.M.P. Determinação quantitativa de alguns grupos de microrganismos em sardinhas (*Sardinella aurita*), vendidas em mercados e feiras livres do município de São Paulo, 1978. *Cienc. Tecnol. Alimentos*, 4(2): 158-180, 1984.
17. BROWN, L.D. & DORN, C.R. Fish, shellfish, and human health. *J. Ed Prot.*, 40(10):712-7, 1977.
18. BUCHMAN, R.E. & GIBBONS, N.E. (eds.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8.ed. Baltimore, William & Wilkins,

1974, 1246p.

19. BURGESS, G.H.O.; CUTTING, C.L.; LOVERN, J.A. & WATERMAN, J.J.  
*El pescado y las industrias derivadas de la pesca*. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1965, 392p.
20. BUTTIAUX, R. Salmonella problems in the sea. In: BORGSTROM, G., ed. *Fish as Food*. New York, Academic Press, 1962, v.2. p.503-19.
21. BUTTIAUX, R. and LEURS, T. Survie des *Salmonella* dans l'eau de mer. *Bull acad. natl. méd.* (Paris), 137:457-460, 1953.
22. CHORDASH, R.A.; INSALATA, N.F. Incidence and Pathological Significance of *Escherichia coli* and other sanitary indicator organisms of food and water. *Food Technology*, 32(10): 54-62, 1978.
23. COLWELL, R.R. et alii. *Vibrio parahaemolyticus* - isolation, identification, classification, and ecology. *J. Milk Food Technol.*, 36(4):202-213, 1973.
24. COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS. Resolução nº 13 de março de 1978. *Diário Oficial da União*, 25 de julho de 1978. p.11616-11617.
25. DECARLIS, R.M.S.T.; FALCÃO, D.P.; MAFFEI, H.V.L. & PAVAN, C. *Yersinia enterocolitica* isolada de criança com diarréia crônica, em Botucatu, São Paulo. *Rev. de Microbiol.*, 13(1):50-52, 1982.
26. DIVISÃO NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE ALIMENTOS - DINAL. Portaria nº 001, de 28 de janeiro de 1987, do Ministério da Saúde. *Diário Oficial da União*, 12/02/87.
27. ELLIOTT, R.P. & MICHENER, H.D. Microbiological standards and handling codes for chilled and frozen foods. *Appl. Microbiol.*, 9:452-68, 1961.

28. FAJARDO, L.R.L. & MARTH, E.H. Bacterial flora of fish from tropical sea water. *J. Food Protec.*, Annes, 42:724-728, 1979.
29. FAO/OMS - *Higiene del Pescado y los Mariscos*. Roma, 1975. 70p.
30. FISHBEIN, M. and WENTZ, B. *Vibrio parahaemolyticus* methodology for isolation from seafoods and epidemic specimens. *J. Milk Food Technol.*, 36(2):118-123, 1973.
31. FLOYD, F.M. & JONES, G.B. Isolation of *Shigella* *Salmonella* organisms from Nile fish. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 3: 475-480, 1954.
32. FONTES, C.F.; TOLEDO, M.R.F.; REIS, M.H.L.; MURAHOUSCHI, J. & TRABULSI, L.R. Isolamento de uma amostra de *Yersinia enterocolitica* das fezes de uma criança na cidade de São Paulo. *Rev. de Microbiol.*, 9(3):167-168, 1978.
33. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. *Bacteriological Analytical Manual for Foods*. Washington, D.C., 1973.
34. FOSTER, J.F. et alii. A microbial survey of various fresh and frozen seafood products. *J. Food Prot.*, 40(5):300-3, 1977.
35. FRAZIER, W.C. *Microbiología de los alimentos*. 2.ed. Zaragoza, Acribia, 1976. 512p.
36. GELDRICH, E.E.; CLARK, H.F.; KABLER, P.W.; HUGG, C.R. & BORDER, R.H. The coliform group. II. Reactions in E.C. Medium at 45 °C. *Appl. Microbiol.*, 6:347-348, 1958.
37. GEORGALA, D.L. The bacterial flora of the skin of North Sea cod. *J. Gen. Microbiol.*, 18:84-91, 1958.
38. GEROMEL, E.J.; FORSTER, R.J. Princípios fundamentais em tecnologia de pescados. *Tecnologia Agroindustrial*, nº 11, 127p.

39. GILBERT, R.J. Staphylococcal food poisoning and botulism. *Postgrad. Med. J.*, 50:603-611, 1974.
40. GRIFFITHS, F.P. A review of bacteriology of fresh marine fishery products. *Food Res.*, 2:121-134, 1937.
41. GULASEKEHARAM, J. et alii. The isolation of *Salmonella* organisms from fresh fish sold in a Colombia fish market. *J. Hyg.*, 54:581-584, 1956.
42. HAIDA, K.S. *Estudo bacteriológico da sardinha (Sardinella aurita) "in natura" consumida na cidade de Londrina, Paraná.* Tese de mestrado apresentada ao Curso de Ciências de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, PR, 1981.
43. HANNA, M.O.; STEWART, J.C.; ZINK, D.L.; CARPENTER, Z.L. and VANDERZANT, C. Development of *Yersinia enterocolitica* on raw cooked beef and pork at different temperatures. *Journal of Food Science*, 42(5):1180-1184, 1977.
44. INSALATA, N.F. Enteropathogenic *E. coli* - A new problem for the food industry. *Food Technology*, 27(5):56-58, 1973.
45. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS - ICMSF. *Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications.* Toronto, University of Toronto Press, v.2, 1978. 7213p.
46. \_\_\_\_\_. *Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration.* Toronto, University of Toronto Press, 1978. 433p.
47. JARVIS, A.W. & LAWRENCE, R.C. Production of high liters of enterotoxins for the routine testing of staphylococci. *Appl. Microbiol.*, 19(4):689-699, 1970.
48. JAY, J.M. *Microbiologia moderna de los alimentos.* Zaragoza, Acribia, 1973. 319p.

49. JOHNSON, H.C.; BAROSS, J.A. & LISTON, J. *Vibrio parahaemolyticus* and its importance in seafood hygiene. *Jour. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 159:1470-1473, 1971.
50. KAPPERUD, G. & JONSSON, B. *Yersinia enterocolitica* in brown trout from Norway. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B* 84, 66-68, 1976.
51. KAWABATA, T. Fish borne food poisoning in Japan. In: BORGSTROM, G., ed. *Fish as Food*. New York, Academic Press, v.2, p.467-79, 1961.
52. KEET, E.E. *Yersinia enterocolitica* septicemia. New York, State. *J. Med.*, 74:226, 1974.
53. KIETZMANN, U.; PRIEBE, K.; RAKOW, D. & REICHSTEIN, K. *Inspección veterinaria de pescados*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1974. 326p.
54. KRANTZ, G.E.; COLWELL, R.R. and LOVELACE, E. *Vibrio parahaemolyticus* from blue crab, *Callinectes sapidus* in Chesapeake Bay. *Science*, 164:1286-1287, 1969.
55. LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGISZ, C.; HOEPRICH, P.D. Metachromatic Agar Diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585-587, 1971.
56. LASSEA, J. *Yersinia enterocolitica* in drinking-water. *Scand. J. Infect. Dis.* 4:125, 1972.
57. LEIGUARDA, R.H. et alii. Bacterias del contenido intestinal de algunos peces del Rio de la Plata. *Rev. obras sanit.nacion.*, 14:2-8, 1950.
58. LEITÃO, M.F.F. *Vibrio parahaemolyticus*: características e importância em alimentos. *Bol. Inst. Tecn. Alim.*, 24:1-16, 1970.
59. LEITÃO, M.F.F. Microbiologia do pescado e controle sanitário r.

- no processamento. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, nº 50, 1-33, 1977.
60. LEITÃO, M.F.F.; DELAZARI, I. & MORAES, C. Microbiologia do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis*) congelado. *Col. do Inst. Tecnol. de Alimentos*, 5:17-34, 1973/74.
61. LEITÃO, M.F.F.; ARIMA, H.K. & KAI, M. *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do estado de São Paulo. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, 7:181-190, 1976.
62. LEITÃO, M.F.F.; FALOMIR, C.O.; SANTOS, L.C.; MYIA, E.E.; SHIROSE, I. & KAI, M. Transformações microbiológicas, químicas e organolépticas em sardinhas (*Sardinella aurita*) armazenadas sob refrigeração. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, 7:117-137, 1976.
63. LEON, E. et alii. Calidad microbiologica de pescado em venta en la Ciudad de Guatemala. *Rev. Biol. Trop.*, San Jose, 26: 153-63, 1978.
64. LISTON, J. and BAROSS, J. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the natural environment. *J. Milk Food Technol.*, 36 (2):113-117, 1973.
65. LOPES, C.A.M. Contribuição ao estudo da flora bacteriana de sardinha (*Sardinella aurita*) e de pescada branca (*Mycrodon ancylodon*). Tese de doutoramento - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 1972.
66. MATCHES, J.R. & LISTON, J. Low temperature growth of *Salmonella*. *J. Food Sci.*, 33:641-5, 1968b.
67. MAYOU, J. MPN - Most Probable Number. In. SPECK, M.L., ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, American Public Health Association, 1976, 70lp.

68. MICHENER, H.D. ELLIOT, R.P. Minimum growth temperatures for food-poisoning, fecal-indicator, and psychrophilic microorganisms. *Advan. Food Res.*, 13:349, 1964.
69. MYAMOTO, Y.; NAKAMURA, K. & TAKIZAWA, T. Seasonal distribution of *Oceanomonas* spp. halophilic bacteria in the coastal sea. Its significance in epidemiology and marine industry. *Japan J. Microbiol.*, 6:141-158, 1962.
70. MONTES, A.L. *Microbiologia de los alimentos*. São Paulo, Resenha Universitária, V.1, p.34-36, 451-72, 1972.
71. \_\_\_\_\_ *Microbiologia de los alimentos*. São Paulo, Resenha Universitária, V.2, p.135-67, 1972.
72. MORRIS, G.K. & FELLE, J.C. 1976. *Yersinia enterocolitica*: A review of its role in food hygiene. *Bull. World Health Organ*, 54:79-85.
73. OBLINGER, J.L. and KOBURGER, J.A. Understanding and teaching the Most Probable Number Technique. *J. Milk Food Technol.*, 38(9):540-545, 1975.
74. ORLOB, 1956. In: MONTES, A.L., ed. *Microbiologia de los alimentos: Curso teorico y practico*. São Paulo, Ed. Resenha Universitária, v.1, p.456, 1977.
75. PEIXOTO, S.S.; FINNE, G.; HANNA, M.O. & VANDERZANT, C. Presence, growth and survival of *Yersinia enterocolitica* in oysters, shrimp and crab. *Journal of Food Protection*, 42: 974-981, 1979.
76. PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. São Paulo, Mc Graw-Hill do Brasil, sv.1, 1981.
77. PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. São Paulo, Mc Graw-Hill do Brasil, v.2, 1981.

78. PIZZOLITTO, A.C.; FALCÃO, D.P.; SHIMIZU, M.T.; GALVÃO, S.H.M. & GIRALDINI, W. The first isolation of human *Yersinia enterocolitica* in Brazil case report. In: *Contributions to Microbiology and Immunology*. v.5, *Yersinia enterocolitica: Biology, Epidemiology and Pathology*, p.169-173. Basel: Karger, 1979.
79. RAJ, H. & BERGDOLL, M.S. Survey of bacteria of public health significance in frozen seafoods, *Food Technol.*, 15:429-33, 1961.
80. RAJ, H. & LISTON, J. Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen seafoods. I. *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol.*, 9(2):171-7, 1961.
81. RAJ, H.; WIEBE, W.J. & LISTON, J. Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. II. Enterococci. *Appl. Microbiol.*, 9:295-303, 1961.
82. RAKOVSKY, J.; PAUCKOVA, V. & ALDOVA, E. Human *Yersinia enterocolitica* infections in Czechoslovakia. In: *Contributions to Microbiology and Immunology*, v. 2, p.93-98. Basel, Karger, 1973.
83. REIS, M.H.L.; VASCONCELOS, J.C. and TRABULSI, L.R. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw food from animal origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(1):270-271, 1980.
84. RIBEIRO, A.M.R. Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. *Rev. Microbiol.*, 5(11):17-25, 1974.
85. ROBBINS, R.N.; GOULD, S. & BERGDOLL, M.S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, 28(6):946-950, 1974.

86. SCHIEMANN, D.A. Isolation of toxigenic *Yersinia enterocolitica* from retail pork products. *Journal of Food Protection*, 43:360-365, 1980.
87. SEPLO - SECRETARIA DE PLANEJAMENTO E ORÇAMENTO, SUDEPE - SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DA PESCA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Controle de desembarque pesqueiro. *Anuário estatístico*, 1986.
88. SHAW, B.G. & SHEWAN, J.M. Psychrophilic spoilage bacteria of fish. *J. Appl. Bac.*, 31:89-96, 1968.
89. SHEWAN, J.M. The microbiology of sea-water fish. In: BORGSTROM, G., ed. *Fish as Food*. New York, Academic Press, 1961, v.1, p.487-559.
90. SHEWAN, J.M. Food poisoning caused by fish and fishery products. In: BORGSTROM, G., ed. *Fish as Food*. New York, Academic Press, 1962, v.2, p.446-8.
91. SHEWAN, J.M. Bacteriological standards for fish and fishery products. *Reprinted from Chemistry and Industry*, 193-199, 1970.
92. SHEWAN, J.M. The microbiology of fish and fishery products. A progress report. *J. Appl. Bacteriol.*, 34:299-315, 1971.
93. SONNENWIRTH, A.C. and WEAVER, R.E. *Yersinia enterocolitica*. *New Engl. J. Med.*, 283:1468, 1970.
94. SPENCER, R. The sanitation of fish boxes. I. Quantitative and qualitative bacteriology of commercial wooden fish boxes. *J. Appl. Bacteriol.*, 22:73-84, 1959.
95. STEINIGER, F. Zur Freilandbiologie der Salmonellen im Bereich des westlichen Mittelmeeres. In: BORGSTROM, G., ed. *Fish as food*. New York, Academic Press, 1961, v.2, p.503-519.

96. STERN, N.J. & PIERSON, M.D. *Yersinia enterocolitica*: a review of the psychrotrophic water and food borne pathogen. *J. Food Sci.*, 44(6):1736-42, 1979.
97. SWAMINATHAN, B.; HARMON, M.C. & MEHLMAN, I.J. A review *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Applied Bacteriology*, 52:151-183, 1982.
98. THATCHER, F.S. & CLARK, D.S. *Analisis microbiologico de los alimentos*. Zaragoza, Acribia, 1973. 271p.
99. TODD, E.C.D. Foodborne disease in six countries - a comparison. *J. Food Prat.*, 41(7):559-65, 1978.
100. TOMA, S. and DREIDRICK, V.R. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from swine. *J. Clin. Microbiol.*, 2:478-481, 1975.
101. TOMA, S. and LAFLEUR, L. Survey on the incidence of *Yersinia enterocolitica* infection in Canada. *Appl. Microbiol.*, 28:469-473, 1974.
102. UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. *Yersinia enterocolitica* outbreak. New York, *Norbidity and Nortality*, 26:53-54, 1977.
103. VANDERZANT, C.R.; NICKELSON, RN and PARKER, J.C. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from gulf coast shrimp. *J. Milk Food Technol.*, 33:161-162, 1970.
104. VARGA, S. & ANDERSON, G.W. Significance of coliformes and enterococci in fish products. *Appl. Microbiol.*, 16:193-196, 1968.
105. WATANABE, K. Technological problems of handling and distribution of fresh fish in Southern Brazil. In: KREUZER, R. *The technology of fish utilization*. London, Fishing News, 1965. p.44-6.

**A N E X O S**



FOTO Nº 1 - Barco de pesca "Traineira".



FOTO Nº 2 - *Sardinella brasiliensis*.



FOTO Nº 3 - Início da operação de embalagem da Sardinha em Peixaria.



FOTO Nº 4 - Término da operação de embalagem da Sardinha em Peixaria.



FOTO Nº 5 - Corte da Sardinha, em filês, para a realização das análises microbiológicas.