

# ESTUDO BACTERIOLÓGICO DA SARDINHA (*SARDINELLA AURITA*) "IN NATURA" COMERCIALIZADA EM LONDRINA, PARANÁ<sup>1</sup>.

KIMIYO SHIMOMURA HAIDA<sup>2</sup>  
ERNST ECHEHARDT MULLER<sup>3</sup>

## RESUMO

Foram examinadas 110 amostras de sardinha (*Sardinella aurita*) coletadas em peixarias, supermercados e feiras-livres de Londrina, Paraná, quanto à contaminação por microrganismos psicotrópicos, mesófilos, coliformes fecais (NMP), *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*. Destas amostras, 30(27,28%) e 68(61,86%) apresentaram contagem de microrganismos psicotróficos e mesófilos, respectivamente, superior a  $10^6$  UFC/g. Um número de coliformes fecais acima de 100/g foi evidenciado em 36(32,73%) das amostras. Em 47(42,72%) exemplares foi isolado *S. aureus* em número superior a  $10^3$  UFC/g, sendo que em nenhuma amostra foi isolada *Salmonella*.

## PALAVRAS-CHAVES:

Sardinha, Microbiologia, *S. aureus*

## 1. – INTRODUÇÃO

Dentre os produtos de origem animal, os peixes são os mais susceptíveis à autólise, oxidação e ação dos microrganismos<sup>8, 10, 17, 20</sup>. A flora microbiana se constitui em importante fator de alteração do produto<sup>2,3</sup> e determinadas espécies bacterianas, em agentes de infecções e intoxicações alimentares no homem<sup>11</sup>.

A microflora natural do pescado é constituída predominantemente pelos gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, corineformes e outros<sup>10</sup>. Bactérias indicadoras de contaminação fecal e mesmo patogênicas são raramente constatadas no pescado recém-capturado, a não ser que seja proveniente de águas poluídas<sup>4</sup>. Imediatamente após a captura, o produto pode sofrer intensas variações na sua composição bacteriana, devido à manipulação, contato com o gelo, equipamento, embalagem e outros<sup>4, 9</sup>. Nessas condições, bactérias patogênicas (*S. aureus*, *Salmonella sp.*), bactérias indicadoras de contaminação fecal e ainda microrganismos deterioradores não patogênicos, podem ser acrescidos à microflora<sup>9,14</sup>.

A determinação do número de microrganismos psicotróficos, além de indicar uma provável contaminação do produto na origem também é importante pelas atividades bioquímicas indesejáveis que as mesmas podem exercer no pescado refrigerado<sup>10</sup>. A contaminação do produto

por mesófilos pode indicar matéria prima contaminada, deficiência de manipulação, processamento, armazenamento e transporte, assim como uma possível contaminação por agentes patogênicos<sup>9, 14</sup>.

A presença de coliformes fecais, pode indicar deficiência de manipulação, contato com gelo e equipamentos contaminados e a possível presença de outras enterobactérias patogênicas entre elas a *Salmonella*<sup>5, 9, 28</sup>. Anualmente milhões de pessoas são vítimas de intoxicação alimentar resultante da ingestão de enterotoxina estafilocócica<sup>21</sup>. A ocorrência de *S. aureus* em alimentos, indica geralmente contaminação a partir de fossas nasais, boca e pele de portadores<sup>1,2</sup> que no ato da filetagem pode contaminar o produto. Os diferentes produtos da pesca, entre eles a sardinha, são considerados importantes fontes de intoxicação alimentar estafilocócica para o homem<sup>14, 25, 31</sup>.

Tendo em vista o grande consumo de sardinha na região de Londrina e sua localização distante do litoral, procurou-se estimar a contaminação bacteriana da sardinha no que se refere a microrganismos psicotróficos, mesófilos, coliformes fecais *S. aureus* e *Salmonella*.

## 2. – MATERIAIS E MÉTODOS

Foram examinadas 110 amostras de sardinhas (*Sardi-*

<sup>1</sup> Parte de dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos intitulada: Estudo Bacteriológico da Sardinha (*Sardinella aurita*) "in natura" consumida na cidade de Londrina, Paraná.

<sup>2</sup> Ex-aluna do Curso de Mestrado em Ciências de Alimentos da UEL.

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária – Centro de Ciências Agrárias – Universidade Estadual de Londrina.

*nella aurita*) refrigeradas, coletadas em peixarias (fonte I) e supermercados e feiras-livres (fonte II, 46).

As técnicas utilizadas na coleta, transporte e preparo das amostras, assim como a contagem de psicotróficos, mesófilos, *S. aureus*, número mais provável de coliformes fecais e isolamento de *Salmonella*, obedeceram essencialmente à metodologia recomendada pelo Comitê Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos, descritas por THATCHER & CLARK<sup>2,9</sup> e pela Associação Americana de Saúde Pública<sup>2,7</sup>.

Para as contagens, 50g de cada amostra constituída de 5 porções de 10g coletadas de 5 diferentes exemplares, foram homogeneizadas em 450ml de água peptonada a 0,1%.

Esta diluição inicial foi usada para o preparo de diluições decimais.

A determinação do número de microrganismos psicotróficos e mesófilos foi efetuada em agar padrão de contagem (MERCK). Para os psicotróficos, as placas foram incubadas a 7°C por 7 dias e para os mesófilos a 35°C por 48 horas.

Para a determinação do número mais provável de coliformes fecais foi utilizado o caldo verde brilhante bile 2% lactose (Difco) a temperatura de incubação de 35°C e 44,5°C. Para a identificação foram empregados o agar eosina azul de metileno (MERCK) e as provas do indol, vermelho de metila, Voges Proskauer e citrato.

A contagem de estafilococos foi efetuada em agar Baird-Parker (MERCK) a 35°C por 48 horas e a identificação do *S. aureus* pela prova do coagulase e termonuclease<sup>1,5</sup>.

Para o isolamento de *Salmonella*, 2 porções de 25 g da amostra foram diluídas, respectivamente, em 225ml de caldo tetracionato (MERCK) e 225ml de caldo selenito cistina (Difco). Após 24 horas a 35°C foram feitos repiques para agar *Salmonella-Shigella* (Merck) e agar verde brilhante (Difco). Das placas, colônias típicas foram submetidas a provas bioquímicas e sorológicas com soro polivalente.

Os dados obtidos foram analisados através do teste do X<sup>2</sup>.

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 verifica-se que 20 (31,25%) das amostras da fonte I e 10 (21,74%) da fonte II apresentaram uma contagem de microrganismos psicotróficos superior a 10<sup>6</sup> UFC/g. Este limite foi adotado baseado nos padrões estabelecidos para microrganismos mesófilos, já que a maioria das entidades oficiais<sup>3, 13, 12</sup> não fixa limites para psicotróficos e porque números iguais ou superiores a 10<sup>6</sup> UFC/g podem indicar início de deterioração do produto<sup>2,7</sup>. A alta porcentagem de psicotróficos encontrados neste trabalho, indica um reduzido tempo de prateleira do produto. Pela análise estatística observa-se que as sardinhas da fonte I apresentaram contaminação superior as da fonte II.

Em relação aos microrganismos mesófilos, (tabela 2), constata-se que 44 (68,75%) amostras da fonte I e 24 (52,18%) da fonte II mostraram valores superiores a 10<sup>6</sup> UFC/g, limite padrão estabelecido pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA<sup>3</sup> e American Public Health Association (APHA)<sup>2,7</sup> para pescado cru, fresco e refrigerado. ANDREWS et alii<sup>1</sup> analisando peixe fresco e congelado e SILVERMANN et alii<sup>2,5</sup> camarão cozido, verificaram valores inferiores aos deste trabalho. No Brasil, WATANABE<sup>3,0</sup> investigando a pescada branca, encontrou valores que variaram de 4,5 x 10<sup>5</sup> a 4,2 x 10<sup>6</sup>. LOPES<sup>1,8</sup> em São Paulo examinando 100 amostras de sardinhas, obteve valores mínimos, médios e máximos de 7,6 x 10<sup>4</sup>, 2,8 x 10<sup>6</sup> e 5 x 10<sup>7</sup> por grama, valores inferiores aos deste trabalho. No tocante às duas fontes estudadas não houve diferença significativa a nível de p ≤ 0,01 no grau de contaminação. Na tabela 3 os números referentes a coliformes fecais mostram que 24(37,50%) amostras da fonte I e 12(26,09%) da fonte II ultrapassaram o padrão de 100/g (NMP), diferença esta não significativa a nível de p ≤ 0,01. Os padrões empregados para os coliformes fecais são os indicados pelo CNNPA<sup>3</sup>. ANDREWS et alii<sup>1</sup>, LOVELL e BARKATE<sup>1,9</sup> citam valores próximos a estes enquanto que LICCIARDELLO & HILL<sup>1,6</sup> valores inferiores. WATANABE<sup>3,0</sup> comparando trabalhos realizados no Brasil com os de outros países

TABELA 1 – Distribuição dos resultados da contagem padrão em placas de microrganismos psicotróficos isolados a partir de sardinhas

Procedência	UFC/g	No. de amostras	0 → 10 <sup>6</sup>		> 10 <sup>7</sup>	
			No.	%	No.	%
Fonte I(d)		64	44	68,75	20	31,25
Fonte II(e)		46	36	78,26	10	21,74
Total		110	80	72,72	30	27,28

d = Peixarias

e = Supermercados e feiras-livres

TABELA 2 – Distribuição dos resultados de contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos isolados a partir de sardinhas.

Procedência \ UFC/g	No. de amostras	0 - 10 <sup>6</sup>		>10 <sup>7</sup>	
		No.	%	No.	%
Fonte I(d)	64	20	31,25	44	68,75
Fonte II(e)	46	22	47,83	24	52,18
Total	110	42	38,18	68	61,82

d = Peixarias

e = Supermercados e feiras-livres

TABELA 3 – Distribuição da estimativa dos coliformes fecais (NMP)\* em sardinhas

Procedência \ UFC/g	No. de amostras	0 - 100		>100	
		No.	%	No.	%
Fonte I(d)	64	40	62,50	24	37,50
Fonte II(e)	46	34	73,91	12	26,09
Total	110	74	67,27	36	32,73

\*NMP = Número mais provável

d = Peixarias

e = Supermercados e feiras-livres

TABELA 4 – Distribuição da contagem de *S. aureus* em sardinhas

Procedência \ UFC/g	No. de amostras	≤10 <sup>2</sup>		10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup>		>10 <sup>3</sup>	
		No.	%	No.	%	No.	%
Fonte I(d)	64	13	20,30	22	34,40	29	45,30
Fonte II(e)	46	13	28,26	15	32,61	18	39,13
Total	110	26	23,64	37	33,64	47	42,72

d = Peixarias

e = Supermercados e feiras-livres

constatou que os peixes comercializados no Brasil apresentam um número de coliformes significativamente superior. Os dados deste trabalho são superiores aos de WATANABE.

Na tabela 4 verifica-se que 29 (45,30%) amostras da fonte I e 18 (29,13%) da fonte II apresentaram uma contagem de *S. aureus* superior a 10<sup>3</sup>UFC/g, padrão estabelecido pela CNNPA<sup>3</sup> diferença esta não significativa a nível de  $p \leq 0,01$ . Analisando estes dados frente aos de SILVERMANN et alii<sup>25</sup> no exterior e LOPES<sup>18</sup> no Brasil, verifica-se que os índices de contaminação da sardinha examinada neste trabalho foram bem superiores, comprovando as péssimas condições higiênicas do produto, já que a presença de *S. aureus* em alimentos normalmente está associada à manipuladores portadores sãos ou mesmo com infecção clínica e além disso processamento inadequado. Baseado

na estimativa de BERGDOLL<sup>2</sup> de que pelo menos 50% das cepas de *S. aureus* são produtoras de enterotoxina e o número de estafilococos encontrados neste trabalho, as sardinhas pesquisadas se constituem em fonte potencial de intoxicação alimentar.

Em nenhuma das amostras estudadas foi possível detectar a presença de *Salmonella* o que está de acordo com os diferentes padrões<sup>3, 6, 7, 24</sup>.

Já em 1965, WATANABE<sup>30</sup> citava que a denominação de "peixe fresco" usualmente conferida ao produto "in natura" comercializado no Brasil não reunia condições de ser definido como tal, devido aos baixos níveis sanitários do produto e o primarismo de sua manipulação e distribuição.

A análise global dos dados obtidos demonstra o alto grau de contaminação das sardinhas estudadas indicando

condições higiênicas sanitárias de captura, manipulação, refrigeração, transporte e comercialização inadequadas.

#### ABSTRACT

Frequency of contamination by psychrotrophs, mesophiles, fecal coliforms, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* was investigated in 110 samples of commercially available sardines (*Sardinella aurita*) in the city of Londrina, Paraná. Of the populations sampled, the psychrotrophs and mesophiles in the counts of above  $10^6$ /g were present in 30(27,28%) and 68(61,68%), respectively. Fecal coliforms above 100/g were obtained in 36(32,73%) samples. While, *S. aureus* in counts of above  $10^3$ /g was isolated from 47(42,72%) of the samples; the presence of *Salmonella* could be demonstrated through the experimental method used.

Key-Words: Sardine, Microbiology, *S. aureus*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, W.H.; WILSON, C.R.; POELHA, P.L e ROMERO, A. Bacteriological survey of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) at the retail level. *J. Fd. Sci.*, 42(2): 359-63, 1977.
- BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: Montie, T.C.; Kadis, S.; Ajc, S.J. *Microbial Toxins*. New York, Academic Press, 1970. V. 3, p. 265-326.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução n. 13 78 de 31 de março de 1978. *Diário Oficial*, Brasília, 25 de julho 1978. p. 11616-17.
- BUTTIAUX, R. *Salmonella* problems in the sea. In: BORGSTROM, G., ed. *Fish as food*. New York, Academic Press, 1962. v. 2. p. 503-119.
- CHORDASH, R. A & INSALATA, N.F. Incidence and pathological significance of *Escherichia coli* and other sanitary indicator organisms in food and water. *Fd. Technology.*, 32(10): 54-62, 1978.
- DACK, G.M. Evaluation of microbiological standards for foods. *Fd. Technology*, 10(11), 507-09, 1956.
- ELLIOT, R.P. & MITCHENER, H.D. Microbiological standards and handling codes for chilled and frozen foods. *Appl. Microbiol.*, 9: 452-68, 1961.
- FRAZIER, W.C. & WESTHOFF, D.C. *Food Microbiology*. 3. ed. New York, Mc Graw-Hill, 1978. p. 419-53.
- FREITAS LEITÃO, M.F. Microbiologia do pescado e controle sanitário no processamento. *Bol. Ins. Tecn. Alim.*, 50: 1-35, 1977.
- FREITAS LEITÃO, M.F.; FALOMIR, C.O.; SANTOS, L.C.; MIYA E.E.; KAI, I.S.M. Transformações microbiológicas químicas e organolépticas em sardinhas (*Sardinella aurita*) armazenadas sob refrigeração. *Bol. Inst. Tecn. Alim.*, 7: 117-34, 1976.
- HIGIENE DEL PESCADO Y LOS MARISCOS. O.M.S., 1975. 62. p. (Série Inf. Tecn. 550).
- IARIA S.T. *Staphylococcus aureus* em doces vendidos em padarias e confeitarias do município de São Paulo. Produção de enterotoxina estafilocócica e fagotipagem a partir das cepas isoladas. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Tese (Liv. Doc.) Inst. Ciênc. Bioméd., USP.
- INTERNACIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. *Sampling for Microbiological Analyses: principles and specific applications*. Toronto, University of Toronto Press, 1978. 213 p.
- JAY, J.M. *Microbiologia Moderna de Los Alimentos*. Zaragoza, Acribia, 1973. p. 40-55.
- LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGISZ, C.; HOEPRICH, P.D. Metachromatic agar diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21: 585-587, 1971.
- LICCIARDELLO, J.J. & HILL, E.S. Microbiological quality of commercial frozen minced fish blocks. *J. Fd. Prot.*, 41(12): 948-52, 1978.
- LOBBEN, J.C. & LEE, J.S. Roles of microorganisms in the deterioration of rockfish. *Appl. Microbiol.*, 16(9): 1320-5, 1968.
- LOPES, C.A.M. *Contribuição ao estudo da flora bacteriana da sardinha (sardinella aurita) e de pescada branca (Microdon ancylodon)*. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 1972. Tese (Dout.) Inst. Ciênc. Bioméd., USP.
- LOVELL, R.T. & BARKATE, J.A. Incidence and growth of some health related bacteria in commercial freshwater crayfish (Genus *Procambarus*). *J. Fd. Sci.*, 34: 268-71, 1969.
- MARTIN, R.E.; GRAY, R.J.H.; PIERSSON, M.D. Quality assesment of fresh fish and the role of the naturally occurring microflora. *Fd. Technol.*, 32(5): 188-191, 1978.
- MINOR, T.E. & MARTH, E.H. Staphylococcal food poisoning. I. Characteristics and isolation of staphylococci properties of enterotoxin, and epidemiology of staphylococcal intoxication. *Ind. J. Nutr. Dietetic.*, 9: 161-86, 1972.
- MONTES, A.L. *Microbiologia de Los Alimentos*. São Paulo Resenha Universitária, 1972. v. 1, p. 34-66, v. 2, p. 135-167.
- REAY, G.A. & SHEWAN, J.M. The spoilage of fish and its preservation by chilling. *Adv. Fd. Res.*, 2: 343-99, 1949.
- RIBEIRO, M.R. Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. *Rev. Microbiol.*, 5(1): 17-25, 1974.
- SILVERMANN, G.J.; NICKERSON, J.T.R.; DUNCAN, D.W.; DAVIS, N.S.; SCHACHTER, J.S.; JOSELOW, M.M. Microbial analyses of frozen raw and cooked shrimps. I. General results. *Fd. Technol.*, 15: 455-58, 1961.

26. SIVEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6. ed. Ames, Iowa State University Press, 1967. 593 p.
27. SPECK, M.L., ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, American Public Health Association, 1976. 701 p.
28. TAYLOR, W.I. & SILLIKER, J.H. Isolation of *Salmonella* from food samples. In: Comparison of methods of enrichment. *Appl. Microbiol.*, 9(6): 484-86, 1961.
29. THATCHER, F.S. & CLARK, D.S. *Analysis microbiológico de los alimentos*. Zaragoza, Acribia, 1973. 271 p.
30. WATANABE, K. Technological problems of handling and distribution of fresh fish in southern Brazil. In: KREUZER, R., ed. *The Technology of fish utilization*. London, Fishing News, 1965. p. 44-6.
31. WOODWARD, W.E.; ARMSTRONG, R.A.; GANGAROSA, E.L. Foodborne disease surveillance in the United States 1967. *Am. Pub. Hlth. Assoc.*, 98. *Proceedings*. 1968. p. 170.

**Nas infecções, quando a  
identificação da causa é problemática...**

# **Amplacilina\* veterinária**

**garantia de mais rápida atividade  
bactericida contra gram+ e gram—.**

- É um antibiótico de amplo espectro, de ação imediata contra germens gram-positivos e gram-negativos causadores da maioria das enfermidades dos animais.
- AMPLACILINA\* combate rapidamente os processos infecciosos, restabelecendo prontamente a vida normal dos animais.
- AMPLACILINA\* propicia níveis bactericidas imediatos, controlando eficazmente as infecções pneumoentéricas, sem problemas de toxicidade.

#### INDICAÇÕES:

Infecções produzidas por germens sensíveis à ampicilina, principalmente infecções pneumoentéricas e geniturinárias.

São sensíveis à AMPLACILINA\* os seguintes germens: pneumococo, estreptococo, estafilococo, Haemophilus, Escherichia, Proteus, Salmonella, Shiguelia, Pseudomonas e Vibrio, entre outros.

#### APRESENTAÇÕES:

Injetável: frasco-ampola contendo 2 g de ampicilina sob a forma de sal sódico.

Pó para reconstituição: frasco contendo 1,5 g de ampicilina anidra para reconstituição com água limpa até a marca do rótulo (60 ml).



\* Marca Registrada, autorizada a  
Indústrias Farmacêuticas  
Fontoura-Wyeth S.A.  
Divisão Agro-Pecuária  
Rua Caetano Pinto, 129  
Caixa Posta 7156  
03041 - São Paulo, SP