



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VANESSA GOMES DA SILVA

**PESQUISA DE MICRORGANISMOS INDICADORES E
PATOGENICOS NO FILÉ DE TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) E EM DIFERENTES PONTOS
DA PLANTA DE PROCESSAMENTO**

Londrina
2008

VANESSA GOMES DA SILVA

**PESQUISA DE MICRORGANISMOS INDICADORES E
PATOGÊNICOS NO FILÉ DE TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) E EM DIFERENTES PONTOS
DA PLANTA DE PROCESSAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal – Área de concentração Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ernst Ekehardt Müller.

Londrina
2008

VANESSA GOMES DA SILVA

**PESQUISA DE MICRORGANISMOS INDICADORES E
PATOGÊNICOS NO FILÉ DE TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) E EM DIFERENTES PONTOS
DA PLANTA DE PROCESSAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal – Área de concentração Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ernst Ekehardt Müller
Depto. Medicina Veterinária Preventiva,
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Vanerli Belloti
Depto. Medicina Veterinária Preventiva,
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Márcia de Aguiar Ferreira Barros
Universidade de Brasília

Londrina, 28 de fevereiro de 2008.

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas e Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Ernst Eckehardt Müller.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

1. CAPES:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC

2. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI

3. SEAB: Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Prof. Dr. Ernst Eckehardt Müller pela oportunidade e confiança nesses 6 anos de microbiologia.

À Lucienne, que sempre teve mais certeza do que eu mesma de que eu estava no caminho certo e sem a qual este trabalho não teria sido realizado.

À Cláudia por ter sido mais que uma estagiária e se tornado uma amiga.

Ao Ronaldo e à Lívia por metade do meu trabalho, sem vocês eu estaria diluindo amostras até hoje.

Aos membros do “trio maravilha”, Kledir e Lívia (ela de novo), por terem entrado na minha vida e serem meus melhores amigos. Adora nossa turminha.

Aos técnicos e estagiários do Laboratório de Microbiologia e LIPOA por ajudarem na realização do trabalho, nos happy-hours e nos intervalos intermináveis.

Ao Médico Veterinário, Roberto Moreira da SEAB, pelo apoio financeiro para a realização do projeto.

SILVA, Vanessa Gomes da. **Pesquisa de microrganismos indicadores e patogênicos no filé de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e em diferentes pontos da planta de processamento**. 2008. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) destaca-se como uma das mais importantes espécies de peixe cultivadas devido à sua adaptabilidade em diversas condições de criação, excelente textura e sabor de sua carne. Entretanto, ainda não existem grandes frigoríficos de processamento de peixe cultivado no Brasil porque a produção ainda é pequena e os pesqueiros absorvem quase tudo. O objetivo deste trabalho foi realizar a pesquisa de microrganismos indicadores por meio da contagem de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli*, estafilococos coagulase positiva (ECP) e dos patógenos *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. em filés de tilápia e na planta de processamento de três frigoríficos do Paraná. Para as análises de microrganismos indicadores foi utilizado o Sistema Petrifilm™ AC, EC e STX e para os microrganismos patogênicos a metodologia preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. As médias logarítmicas das contagens de AM e CT em equipamentos foram 3,77 e 0,68 UFC/cm², em instalações 3,71 e 0,56 UFC/cm², mãos de manipuladores 4,88 e 1,79 UFC/superfície e filé 3,95 e 2,69 UFC/g, respectivamente. *E. coli* e ECP foram encontrados em cinco e quatro amostras oriundas da planta de processamento, respectivamente. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes setores do frigorífico nas contagens de AM e CT, exceto na contagem de coliformes totais na água de abastecimento e em uso e nas instalações nos setores de evisceração, *toilet* e embalagem. *Salmonella* spp. não foi encontrada em nenhuma amostra de filé. *Listeria* spp. foi isolada em 5/291 amostras analisadas, sendo um isolado de *L. innocua* 6b e quatro de *L. monocytogenes* 1/2c. As contagens de microrganismos indicadores nas plantas de processamento sugerem falhas de higienização e sanitização e a presença de *L. monocytogenes* pode representar risco à saúde do consumidor.

Palavras-chave: Pescado. Tilápia do Nilo. Frigorífico. Microrganismos indicadores. *Listeria* spp. *Salmonella* spp.

SILVA, Vanessa Gomes da. **Research of indicator and pathogenic microorganisms in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) filets and in different sites in the processing plant.** 2008. 58p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the most important species for aquaculture because of its easily adaption to farming in different production systems, delicate taste and texture. However, there are not many slaughterhouses for Nile tilapia in Brazil because the production is still small and targeted mainly to local trade. The purpose of this study was to search for indicator and pathogenic microorganisms in tilapia filets and in the processing plants in three slaughterhouses in Paraná, Brazil. The study comprised counts of aerobic mesophilic bacteria (AM), total coliforms (TC), *Escherichia coli*, coagulase-positive staphylococci (CPS) and the detection of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. Petrifilm™ plate system and the methodology recommended by the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento was employed to make the analyses. The means of contamination for AM and TC in equipments were 3,77 CFU/cm² and 0,68 CFU/cm², in installations were 3,71 CFU/cm² and 0,56 CFU/cm², in workers' hands were 4,88 CFU/surface and 1,79 CFU/surface and in final product were 3,95 CFU/g and 2,69 CFU/g, respectively. *E. coli* and CPS were detected in five and four samples, respectively, collected during processing. There was no statistical difference ($p > 0,05$) among the different areas in the slaughterhouses for AM and TC counts but in total coliforms counts for water and installation sites (gutting, filleting and packaging areas). *Salmonella* spp. were not detected in any filet samples. *Listeria* spp. were detected in 5/291 samples analyzed, one *L. innocua* 6b and four *L. monocytogenes* 1/2c. The results for indicator microorganisms in the processing plants suggest faults in cleaning procedures and the presence of *L. monocytogenes* may pose risk to consumers' health.

Keywords: Fish. Nile tilapia. Slaughterhouse. Indicator microorganisms. *Listeria* spp. *Salmonella* spp.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção da aqüicultura, segundo principais espécies de água doce no estado do Paraná, em 2004.....	12
Tabela 2 – Sorovares do gênero <i>Listeria</i> spp.....	23
Tabela 3 – Médias logarítmicas das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos em amostras de equipamentos, instalações, manipuladores, água, matéria-prima e produto final colhidas nos diferentes setores de três frigoríficos de peixes localizados no Paraná, Brasil.....	50
Tabela 4 – Médias logarítmicas das contagens de coliformes totais em amostras de equipamentos, instalações, manipuladores, água, matéria-prima e produto final colhidas nos diferentes setores de três frigoríficos de peixes localizados no Paraná, Brasil.....	51
Tabela 5 – Médias dos principais pontos de contaminação por microrganismos aeróbios mesófilos e coliformes totais em equipamentos e instalações nos diferentes setores de plantas de processamento de três frigoríficos de peixes localizados no Paraná, Brasil.....	52
Tabela 6 – Sorovares de <i>Listeria</i> spp. identificados em amostras obtidas de diferentes setores de plantas de processamento e no filé embalado de três frigoríficos de peixes localizados no Paraná, Brasil.....	52

SUMÁRIO

REVISÃO DE LITERATURA: MICROBIOTA, QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E ABATE DO PESCADO	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 TILÁPIA DO NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>)	13
3 O ABATE DO PESCADO	14
4 MICROBIOTA DO PESCADO	17
4.1 TRANSFORMAÇÕES BIOQUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS <i>POST MORTEM</i> NA CARNE DO PESCADO	17
4.2 MICRORGANISMOS INDICADORES E PATOGÊNICOS EM ALIMENTOS	18
REFERÊNCIAS	25
OBJETIVOS	32
OBJETIVO GERAL	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO: PESQUISA DE MICRORGANISMOS INDICADORES E PATOGÊNICOS NO FILÉ DE TILÁPIA DO NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>) E EM DIFERENTES PONTOS DA PLANTA DE PROCESSAMENTO	33
Resumo	34
Abstrac	35
1 Introdução	36
2 Material e métodos	38
2.1 Locais de coleta	38
2.2 Pontos de coleta	38
2.3 Análises microbiológicas	39
2.3.1 Preparo das amostras	39

2.3.2 Enumeração de microrganismos indicadores.....	39
2.3.3 Detecção de microrganismos patogênicos.....	40
2.3.3.1 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	40
2.3.3.2 Pesquisa de <i>Listeria</i> spp.	40
2.4 Análise estatística	41
3 Resultados e Discussão	42
4 Conclusão	53
5 Referências	54

REVISÃO DE LITERATURA

MICROBIOTA, QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E ABATE DO PESCADO

1 INTRODUÇÃO

O termo “pescado” é utilizado para designar peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada, usados na alimentação humana (BRASIL, 1952). Segundo a Portaria nº 185 (BRASIL, 1997), peixes são animais aquáticos de sangue frio, excluindo-se os mamíferos aquáticos, os animais invertebrados e os anfíbios. Peixe fresco também é definido como aquele conservado somente pelo resfriamento, a uma temperatura (-2°C) próxima a do ponto de fusão do gelo.

O pescado além de ser um alimento rico em proteínas, contendo os aminoácidos considerados essenciais, é também altamente digerível. Sua composição química varia de acordo com a espécie, idade, sexo, meio ambiente, época do ano, entre outros fatores. A composição do músculo do pescado pode variar em: 16% a 21% de proteínas, 0,2% a 25% de lipídios, menos de 0,5% de carboidratos, 1,2% a 1,5% de substâncias inorgânicas e 66% a 81% de água (HUSS, 1995). Sendo, a carne do pescado importante para dietas de baixa caloria e com alto valor nutricional, e com a crescente conscientização pela qualidade de vida através da alimentação, justifica-se o interesse global por esse tipo de comércio (SEAP-PR, 2007). Entretanto, o consumo de carne de peixes no Brasil é incipiente, na faixa de 7,0 kg/habitante/ano, estando bem abaixo da média mundial (19,0 kg/habitante/ano) e do consumo nacional de carnes de frango (23,3 kg/habitante/ano) e bovina (34,2 kg/habitante/ano) (HILSDORF; PEREIRA; RIBEIRO, 1999).

O sistema de produção que mais cresce mundialmente é a aquicultura, com índices médios anuais de crescimento de 8,8%, comparados com apenas 1,2% na pesca extrativa e 2,8% na produção de animais terrestres, sendo a piscicultura de água doce a atividade mais próspera no setor (FAO, 2007).

A China é o maior produtor, com 69,6% do volume e 51,2% em termos de valor comercializado. A América Latina apresentou uma taxa de crescimento anual médio de 9,6% entre 2002 e 2004 (FAO, 2006).

O potencial do Brasil para o desenvolvimento da aquicultura é enorme. Constituído por 8.400 km de costa marítima, 5.500.000 hectares de reservatórios de águas doces, aproximadamente 12% da água doce disponível no

planeta, clima extremamente favorável para o crescimento dos organismos cultivados, terras disponíveis e ainda relativamente baratas na maior parte do país, mão-de-obra abundante e crescente demanda por pescado no mercado interno (SEAP-PR, 2007).

Segundo o IBAMA (2005), em 2004, a aqüicultura produziu 269.697,5 toneladas, representando 26,5% da produção pesqueira nacional. Dessa produção, cerca de 67% provém da água doce. E, na aqüicultura de água doce, os principais estados produtores são Rio Grande do Sul (14,33%), São Paulo (11,54%) e Santa Catarina (10,49%). O estado do Paraná ocupa a sexta posição, com uma produção de 16.558 t (9,16%), dos quais 11.921,5 t são de tilápias (Tabela 1). A tilapicultura continua em ascensão nas regiões Sudeste e Nordeste.

Tabela 1 – Produção da aqüicultura, segundo principais espécies de água doce no estado do Paraná, em 2004.

PRINCIPAIS ESPÉCIES	QUANTIDADE (t)
Bagre-americano	496,5
Carpas	2.152,5
Tilápia	11.921,5
Truta	83,5
Outras espécies	1.904,0
Crustáceos	0,0
Moluscos	0,0
Anfíbios	0,0
TOTAL GERAL	16.558,0

Fonte: IBAMA, 2005, adaptado.

2 TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Por serem consideradas espécies de grande importância para a aquicultura mundial, as tilápias são freqüentemente indicadas para a criação intensiva (KUBITZA, 2000).

Na década de 80 as tilápias foram divididas em três grupos de acordo com seu comportamento reprodutivo: as que incubam seus ovos no substrato, *Tilapia* spp., as que realizam incubação oral dos ovos pelas fêmeas, *Oreochromis* spp., e o grupo no qual o macho ou o casal realiza a incubação oral dos ovos, *Sarotherodon* spp. (POPMA; LOVSHIN, 1996).

Todas as tilápias comercialmente importantes pertencem ao gênero *Oreochromis* e mais de 90% das tilápias cultivadas fora da África são tilápia do Nilo. Com menor destaque na aquicultura tem-se ainda a tilápia de Zanzibar (*Oreochromis urolepis hornorum*), a tilápia azul (*Oreochromis aureus*) e a tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) (POPMA; MASSER, 1999). Segundo Fitzsimmons (2000), a criação de tilápias encontra-se amplamente distribuída no mundo inteiro, podendo atingir uma produção mundial de 1.500.000 t em 2010.

A tilapicultura no Brasil iniciou com a introdução de alguns exemplares no Nordeste, procedentes da Costa do Marfim, em 1971 (CASTAGNOLLI; CYRINO, 1986). Uma das tilápias mais procuradas no Brasil para cultivo é a chitralada, conhecida principalmente como tailandesa, linhagem desenvolvida no Japão e melhorada no Palácio Real de Chitral na Tailândia. Esta linhagem foi introduzida no Brasil em 1996 a partir de alevinos doados pelo Asian Institute of Technology e, vem sofrendo contínuo processo de melhoramento genético em nosso país (ZIMMERMANN, 2000).

A tilápia do Nilo destaca-se como uma das mais importantes, devido a sua alta taxa de crescimento, adaptabilidade em diversas condições de criação e boa aceitação pelo consumidor, principalmente pela excelente textura e sabor de sua carne e ausência de espinhos intramusculares (KUBITZA, 2000; BOSCOLO; HAYASHI; SOARES, 2001).

3 O ABATE DO PESCADO

Quando o peixe atinge o peso ideal para abate é realizada a despesca e este segue para os tanques de depuração (Figura 1). Não há uma padronização quanto ao processamento do pescado, nem tampouco quanto ao peso ideal para o abate. Souza e Maranhão (2001) obtiveram maior rendimento de carcaça quando os peixes apresentavam peso em torno de 400 a 500g.

A despesca deve ser realizada no início da manhã ou no final da tarde quando as temperaturas estão mais amenas a fim de não estressar os peixes. O estresse acelera a instalação do *rigor mortis* o que compromete a qualidade do produto final (MACEDO-VIÉGAS; SOUZA, 2004).

Na indústria, os peixes passam por uma seleção de acordo com seu estado de saúde, peso, ausência de ferimentos e manchas, e nadadeiras intactas.

A depuração pode variar de 2 a 16 dias dependendo da espécie, do tamanho do peixe e do teor de gordura. No entanto, a perda de peso é muito grande se o período de depuração for igualmente prolongado, acarretando perdas importantes para a indústria (YAMPRAYOON; NOOMHORM, 2000; BIATO, 2005; PINHEIRO et al., 2006). Durante a depuração, os peixes permanecem em reservatórios de alvenaria sob circulação contínua de água e em jejum para que o trato digestório se esvazie. Os objetivos desse procedimento são eliminar o *off-flavor* característico de peixes criados em sistemas intensivos, assim como minimizar a carga microbiana que poderá contaminar a carne durante o processamento (MACEDO-VIÉGAS; SOUZA, 2004). O *off-flavor* se caracteriza por odores ou sabores desagradáveis no filé do pescado. A maior causa para seu aparecimento é a geosmina, substância que é excretada na água por algas azuis, verdes e actinomicetos (BIATO, 2005).

Vários métodos de insensibilização já foram descritos, sendo o choque térmico e o choque elétrico menos danosos à qualidade da carne (MARX et al., 1997; van de VIS et al., 2003). O método mais comum tem sido o choque térmico que consiste em colocar os peixes em um recipiente com água e gelo, na proporção 1:1, por tempo variável dependendo da espécie. No entanto, o peixe pode ficar imóvel sem que tenha realmente perdido a consciência. Após alguns minutos em imersão, enguias apresentaram atividade cardíaca irregular, assim como atividade

corporal que são indicadores de estresse (LAMBOOIJ et al., 2002a; LAMBOOIJ et al., 2002b; van de VIS, 2003).

Atordoamento por percussão é um método bastante utilizado no qual o peixe é atingido por um golpe na cabeça. Na prática, apenas um golpe não é suficiente para o completo atordoamento do animal (WALL, 2001). Pode-se ainda realizar o corte das guelras sem atordoamento prévio ocorrendo a morte por isquemia e conseqüente anoxia (van de VIS, 2003).

Após esse processo tem início a evisceração, importante na eliminação de bactérias e enzimas digestivas que poderiam contaminar a sua musculatura. A evisceração deve ser rápida e ocorrer na primeira ou, no máximo, na segunda hora após o abate. Em seguida processa-se a decapitação que tem como objetivo remover as brânquias que são consideradas importantes fonte de contaminação microbiana. Após a evisceração e decapitação, o pescado deve ser lavado com água clorada (5 ppm) para eliminação de restos de sangue e muco que são excelentes substratos para microrganismos (MACEDO-VIÉGAS; SOUZA, 2004).

O próximo passo é a filetagem cujo rendimento depende da espécie, sexo, tamanho e condição corporal do peixe. A tilápia do Nilo vem sendo comercializada na forma de filé sem pele para exemplares maiores que 350g. Pinheiro et al. (2006) relataram rendimento médio de filé de 31% para tilápia tailandesa (*Oreochromis spp.*) e Souza e Maranhão (2001) relataram rendimento médio de filé de 36,84% para categorias de peso de 400-500g de peixe vivo para tilápia do Nilo.

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) indica que o pescado refrigerado deve ser devidamente acondicionado em gelo e mantido a uma temperatura entre -0,5°C e -2,0°C (BRASIL, 1952).

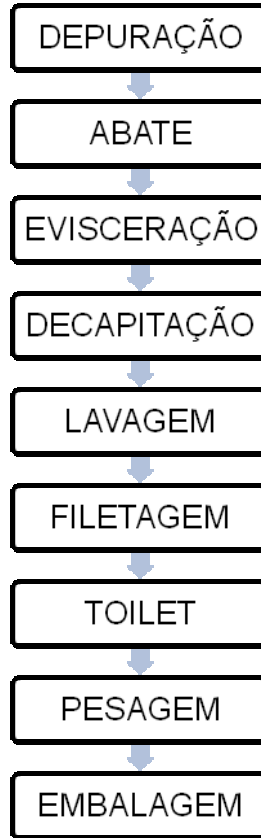


Figura 1 – Fluxograma do processamento do pescado fresco.

4 MICROBIOTA DO PESCADO

A microbiota do peixe está relacionada, quantitativa e qualitativamente, com o ambiente. Imediatamente após a captura, a microbiota apresenta-se restrita ao muco superficial, brânquias e trato intestinal e ausente no músculo (HUSS, 1995; JAY, 2000). Segundo Ogawa e Maia (1999), Mahmoud et al. (2004) e ICMSF (2005), a população microbiana pode variar de 10^2 - 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC)/cm² de superfície corporal, 10^3 - 10^6 UFC/g nas brânquias e 10^3 - 10^8 UFC/mL no trato intestinal.

De acordo com Nedoluha e Westhoff (1997) e ICMSF (2005), as bactérias predominantes em peixes de águas temperadas são Gram negativas como *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Cytophaga* e *Vibrio/Aeromonas*. Em peixes de águas tropicais, as bactérias Gram positivas, *Micrococcus*, *Corynebacterium* e *Bacillus* spp. correspondem a até 60% da microbiota. Os peixes de água doce apresentam microbiota semelhante às anteriores, no entanto não se observa a presença de *Vibrio* spp. e sim *Aeromonas* spp. Além de bactérias, leveduras como *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Candida* spp. e raramente alguns fungos podem estar presentes.

Após a morte do peixe, a penetração dos microrganismos nos músculos ocorre via tecidos vasculares das brânquias, ao longo da veia caudal, através da pele, pelos orifícios da linha lateral e via intestinal (LEITÃO, 1988; JAY, 2000).

4.1 TRANSFORMAÇÕES BIOQUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS POST MORTEM NA CARNE DO PESCADO

O pescado é altamente suscetível à deterioração microbiana devido à sua alta atividade de água, composição química, teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, ao pH próximo da neutralidade (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Inicialmente ocorre autólise da musculatura pela ação do suco

gástrico. Após a morte do peixe, as enzimas proteolíticas atravessam a parede intestinal e atuam decompondo a musculatura da região. Promovendo a disseminação dos microrganismos presentes no trato intestinal. Essas enzimas também atuam nas vísceras, acelerando sua deterioração (JAY, 2000).

Com a autólise dos tecidos do pescado há a produção de vários compostos nitrogenados não-protéicos, sendo os mais freqüentes a trimetilamina, a amônia e os ácidos voláteis, que funcionarão como substrato para os microrganismos. Os principais organismos envolvidos nesse processo são *Pseudomonas fluorescens* e *Shewanella putrefaciens*, não só pela sua característica psicrotrófica e proteolítica, mas também pela capacidade de utilizar esses substratos e produzirem alterações organolépticas que levarão, eventualmente, a rejeição do pescado para o consumo humano (LEITÃO, 1988; HUSS, 1993; HUSS, 1995; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A velocidade com que estas alterações ocorrem depende de fatores como a espécie do peixe, o tamanho, o teor de gordura, situação do trato digestório no momento da captura, tipo de microbiota e temperatura de estocagem (AUBOURG et al., 2007).

4.2 MICRORGANISMOS INDICADORES E PATOGÊNICOS EM ALIMENTOS

Os alimentos são meios de cultura ideais para o desenvolvimento de microrganismos. Os microrganismos patogênicos, ao contaminarem o alimento podem causar danos à saúde de quem o ingere. Outros, não causam doenças aos seres humanos, mas são indícios de problemas de higienização durante o beneficiamento do produto (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002; BASTI et al., 2006).

As carnes, vermelhas e brancas, são consideradas como deterioradas se alterações organolépticas as tornam inaceitáveis para o consumo. Em geral os efeitos da deterioração em carnes tornam-se evidentes quando o número de microrganismos presentes na superfície atinge 10^6 UFC/cm², já com a presença de odores desagradáveis e na contagem de 10^7 UFC/cm² é possível detectar os primeiros sinais de formação de limo (FRANCO; LANDGRAF, 1996;

JACKSON et al., 1997; GILL, 1998).

Os microrganismos indicadores de qualidade, ou os seus metabólitos, quando presentes no alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de indicarem condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Microrganismos aeróbios mesófilos apresentam crescimento ótimo entre 20°C e 45°C. Todas as bactérias que afetam a qualidade do alimento se multiplicam nesta faixa de temperatura. Os patógenos, em sua maioria, são mesófilos (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002; USDA, 2005). Sua contagem fornece uma estimativa da população microbiana total. São empregados para indicar a qualidade sanitária do alimento e, portanto dependendo das quantidades demonstram a insalubridade deste (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Os microrganismos psicotróficos são capazes de crescer em temperaturas semelhantes àquelas dos microrganismo mesófilos, mas podem se multiplicar lentamente em temperaturas de refrigeração (0°C e 7°C). São, portanto, juntamente com os fungos, os principais responsáveis pela deterioração de alimentos refrigerados (JAY, 2000; PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002).

Sob refrigeração, os psicotróficos geralmente apresentam fase lag mais curta e velocidade de crescimento mais rápida do que os patógenos, fazendo com que os peixes se deteriorem antes que os patógenos se multipliquem em níveis consideráveis (ICMSF, 2005).

Bolores e leveduras podem predominar em alimentos se houver condições favoráveis como pH ácido, atividade de água inferior a 0,94, temperatura entre 25-28°C e substrato rico em carboidratos. Os vegetais são seu habitat preferencial, por serem ricos em carboidratos, mas podem ainda ser encontrados em solo, poeira, água e insetos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Bolores e leveduras ao deteriorarem o alimento provocam alterações facilmente perceptíveis como produção de muco, surgimento de pigmentos na superfície, fermentação de açúcares que produzem ácidos, gases ou álcoois ou o desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis. A presença destes microrganismos pode representar risco à saúde pública, já que os bolores são capazes de produzir micotoxinas. Em alimentos frescos e refrigerados, baixas

contagens de bolores e leveduras são normais (FRANCO; LANDGRAF, 1996; HUIS in't VELD, 1996).

Fungos desenvolvem-se facilmente nas instalações de plantas de processamento, como paredes e teto, onde a umidade é alta e há considerável condensação. Podem se desenvolver até em refrigeradores, já que toleram o frio melhor que o calor (USDA, 2005).

Coliformes são membros da Família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram negativos e não esporogênicos capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37°C, por 48 horas. São representantes deste grupo *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*, não sendo todos exclusivamente de origem fecal (JAY, 2000).

Distribuídos amplamente na natureza, esses microrganismos são encontrados no solo, água, plantas e no trato intestinal de seres humanos e animais e indica possível contaminação por enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 1996; JAY, 2000). Sua presença em água e alimentos não representa, necessariamente, contaminação fecal, mas em alimentos processados indica contaminação pós-sanitização ou pós-processamento, sugerindo higienização insatisfatória na planta de processamento (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

Coliformes termotolerantes, anteriormente denominados de “coliformes fecais”, são microrganismos da família *Enterobacteriaceae* que fermentam a lactose com produção de gás quando incubadas a 44-45,5°C. Aproximadamente 90% das culturas de *E. coli* são positivas, enquanto entre os demais gêneros, apenas algumas cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* possuem essa característica (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Segundo Franco e Landgraf (1996), enquanto *Klebsiella* e *Enterobacter* são encontrados em vegetais e solos, *E. coli* é o único coliforme que tem o trato intestinal do homem e de animais como habitat primário. Por essa razão, sua enumeração em água e alimentos é mais representativa como indicação de contaminação fecal. A principal origem é água contaminada e mãos de manipuladores mal higienizadas (FAO, 2004). Conseqüentemente, a presença de coliformes termotolerantes é muito mais significativa do que a presença de coliformes totais (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

Os estafilococos pertencem à família *Staphylococcaceae*, são cocos Gram positivos que tendem a formar grupamentos em forma de cacho de uva,

anaeróbico facultativo e produtores de catalase. Amplamente distribuídos na natureza têm habitat primário na pele, garganta e mucosa de animais e seres humanos (VIEIRA, 2004).

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* em alimentos pode ser feita tanto para confirmar um surto de intoxicação alimentar como para avaliar a qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, já que *S. aureus* age como indicador de contaminação pós-processamento (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

S. aureus causa intoxicação devido à ingestão da enterotoxina pré-formada no alimento. Menos de 1,0 µg da toxina pode ser suficiente para gerar os sintomas de intoxicação estafilocócica. Este nível é alcançado quando a população microbiana excede 10⁵ UFC/g de alimento. Os sintomas mais comuns são náusea, vômito, dor abdominal e, às vezes, diarreia. (USFDA, 1992a; FAO, 2004).

As enterotoxinas estafilocócicas são classificadas sorologicamente em SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ (CARMO et al., 2002). Novas enterotoxinas estão sendo estudadas como a SEK (ORWIN et al., 2001), SEL (ORWIN et al., 2003), SEM, SEN, SEO (LOIR; BARON; GAUTIER, 2003) e SEU (LETERTRE et al., 2003).

A presença de estafilococos coagulase positiva em alimentos indica a possível presença de enterotoxina, entretanto, a ausência ou presença de pequeno número deste microrganismo, sobretudo em alimentos processados submetidos a tratamento térmico não indica que estes produtos não possam causar intoxicação (CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002).

A ocorrência de *S. aureus* em alimentos manipulados é comum, sendo que a contaminação geralmente se origina no manipulador ou pela contaminação cruzada devido ao contato com equipamentos mal higienizados (HERRERA, 2006).

Salmonelas apresentam-se como bastonetes curtos, Gram negativos, não esporulados, são geralmente móveis por flagelos peritríquios e poucas linhagens fermentadoras de lactose são encontradas. Possuem metabolismo aeróbico ou anaeróbico facultativo (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002).

Salmonelose é a maior causa de doença entérica em humanos e animais (BRENNER et al., 2000). A nomenclatura para o gênero é complexa. A classificação atual segue o esquema de Kauffmann-White, descrito por Popoff

(2001), no qual o gênero *Salmonella* está dividido em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a primeira ainda é subdividida em seis subespécies: *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. As subespécies são adicionalmente qualificadas pelo sorotipo, tendo uma designação final, por exemplo, *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium. O gênero apresenta 2501 sorovares (POPOFF, 2001) e embora todos sejam considerados potencialmente patogênicos para o homem, cerca de 200 estão mais freqüentemente relacionados com doença humana (BAIRD-PARKER, 1990). Os sorovares Enteritidis, Typhi e Typhimurium estão incluídos na espécie entérica, na qual se encontram a maioria dos sorovares patogênicos.

O pH ótimo para a multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0 sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. Dependendo da natureza do ácido utilizado para a redução de pH, o valor mínimo pode subir para 5,5. As salmonelas não toleram concentrações superiores a 9% NaCl e a temperatura ideal para essas bactérias encontra-se na faixa de 35 a 37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima de 47°C (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Salmonella spp. têm sido freqüentemente associada ao trato intestinal de animais de sangue quente, mas também isolada em animais de sangue frio. Na Arábia Saudita, este microrganismo foi isolado do trato intestinal de tilápias cultivadas em tanques escavados durante o inverno (AL-HARBI; UDDIN, 2004).

No Brasil, são poucos os estudos envolvendo a pesquisa de *Salmonella* em peixes. Langoni et al. (2000) avaliaram a microbiota do conteúdo intestinal de 221 peixes de água doce, sendo 77 criados em sistema extensivo e 144 em sistemas intensivos. No sistema extensivo os peixes eram alimentados com fezes de suínos e aves, enquanto que no sistema intensivo eram alimentados com ração comercial. Foram isolados diferentes microrganismos do grupo das enterobactérias, entre eles a *Salmonella* Typhimurium em 2,28% dos peixes criados no sistema extensivo e em 2,11% no sistema intensivo.

A resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001) define os critérios e padrões microbiológicos para alimentos destinados à venda e à exportação, estabelecendo para pescados *in natura*, resfriados ou congelados a ausência de *Salmonella* spp. em 25g e máximo de 10³ UFC/g para estafilococos coagulase positiva.

Os membros do gênero *Listeria* são bastonetes Gram positivos, não esporogênicos, catalase positivos e não produtores de H₂S. Crescem numa ampla faixa de temperatura (3-45°C), com ótimo entre 30-37°C, contudo, possuem a capacidade de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, já foram encontradas inclusive em refrigeradores (AZEVEDO et al., 2005). Apresentam motilidade a 20-25°C, com movimentos característicos de tombamento, mas são imóveis quando cultivadas a 37°C. São anaeróbios facultativos, fermentando a glicose com produção de ácido láctico, sem produção de gás (FRANCO; LANDGRAF, 1996; SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001; CLIVER; RIEMANN, 2002).

Atualmente o gênero é constituído de seis espécies: *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. gruyi*, que são consideradas apatogênicas, *L. monocytogenes*, patogênica para humanos e animais e *L. ivanovii*, patogênica para ruminantes (JAY, 2000; RAMASWAMY et al., 2007). Baseado no reconhecimento de antígenos de superfície por anticorpos específicos, o gênero pode ainda ser dividido em 16 sorovares e 13 desses sorovares já foram verificados na espécie *L. monocytogenes* (FRANCO; LANDGRAF, 1996; JAY, 2000). Aproximadamente 98% das cepas isoladas em humanos pertencem aos sorovares 4b, 1/2a, e 1/2b. O sorovar 4b é encontrado na maioria dos surtos alimentares enquanto que os sorovares 1/2a, 1/2b e 1/2c estão associados a casos esporádicos. Os sorovares 4a e 4c são raramente encontrados em surtos da doença (LIU, 2006). As cepas de *L. monocytogenes* isoladas de casos de encefalite em ovinos geralmente pertencem aos sorovares 1/2b ou 4b, e os isolados de casos de septicemia e aborto são predominantemente do sorovar 1/2a (LOW; DONACHIE, 1997).

Tabela 2 – Sorovares do gênero *Listeria*.

<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.ivanovii</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.welshimeri</i>	<i>L.gruyi</i>
1/2a, 1/2b, 1/2c		1/2a, 1/2b, 1/2c		1/2a	
3a, 3b, 3c			3		
4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e		4b, 4c, 4d	4ab	4c	
	5				
		6b	6a, 6b	6a, 6b	
7		NT	NT	NT	E

NT: não-tipável; E: específico.

Fonte: Swaminathan et al. (1995).

L. monocytogenes está difundida no meio ambiente, fato que explica a facilidade com que é encontrada em alimentos, desde a produção até o consumo. Desde 1980 que *L. monocytogenes* é reconhecida como um patógeno alimentar (FRANCO, LANDGRAF, 1996). É uma bactéria ubíqua, com capacidade de se desenvolver em condições inóspitas para outros microrganismos patogênicos. Pode ser encontrada no intestino de humanos, animais e aves por longos períodos sem causar doença.

A ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* é particularmente perigosa para gestantes, recém-nascidos e imunocomprometidos de forma geral (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Nos indivíduos dos grupos de risco 20 a 30 % dos casos de listeriose de origem alimentar podem ser fatais. Os sintomas de listeriose incluem septicemia, meningite (ou meningoencefalite), encefalite, vômito e diarreia. Pode ocorrer gastroenterite em adultos, principalmente pelo uso contínuo de antiácidos e cimetidina. Em gestantes a doença pode resultar em aborto, prematuridade e bebês fracos já que a *L. monocytogenes* é uma das bactérias que ultrapassam a barreira placentária (USFDA, 1992b).

O período de incubação deste patógeno varia de um dia a algumas semanas e a dose infectante de *L. monocytogenes* permanece desconhecida, mas acredita-se que esta seja cepa e hospedeiro dependente. A dose de 100 UFC/g já foi encontrada em surtos esporádicos de listeriose (CLIVER; RIEMANN, 2002). *L. monocytogenes* já foi isolada de uma grande variedade de alimentos crus e prontos para o consumo como carne, frango, frutos do mar (GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004), pescado (MIETTINEN; WIRTANEN, 2005), laticínios (FELDHUSEN, 2000) e vegetais (de CURTIS, M. L.; FRANCESCHINI, O.; DE CASTRO, N. 2002).

Com o incremento da aquicultura, consumo de pescado processado ou mesmo cru, pesquisas sobre a qualidade microbiológica do pescado devem ser intensificadas visando à segurança do consumidor.

REFERÊNCIAS

- AL-HARBI, A. H.; UDDIN, N. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 229, n. 1-4, p. 37-44, jan. 2004.
- AUBOURG, S; QUITRAL, V.; LARRAÍN, M. A.; RODRÍGUEZ, A.; GÓMEZ, J.; MAIER, L.; VINAGRE, J. Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage. **Food Chemistry**, Londres, v. 104, n. 1, p. 369-375, jan. 2007.
- AZEVEDO, I.; REGALO, M.; MENA, C.; GONÇALO, A.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. **Food Control**, Guildford, Inglaterra, v. 16, n. 2, p. 121–124, fev. 2005.
- BAIRD-PARKER, A. C. Foodborne illness: foodborne salmonellosis. **The Lancet**, Inglaterra, v. 336, n. 17, p. 1231-1235, 1990.
- BASTI, A. A.; MISAGHI, A.; SALEHI, T. Z.; KAMKAR, A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. **Food Control**, Guildford, Inglaterra. v. 17, n. 3, p. 183–188, mar. 2006.
- BIATO, Denise Oliveira. **Detecção e controle do off flavor em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio de depuração e defumação**. 2005. Dissertação em Ciências - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, EUA, v. 38, n. 7, p. 2465–2467, jul. 2000.
- BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M. et al. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, set./out. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº30691 de 29 de março de 1952. Aprova o novo regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 de jul 1952, Seção 1, p.10785. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/riispoa.htm#decreto30691>>. Acesso em: 26 abr. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº185, de 13 de maio de 1997. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 maio 1997. Seção I, p.10282.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, Inglaterra, v. 19, n. 1, p. 9-14, fev. 2002.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J. E. P. **Piscicultura nos trópicos**, 1986.

CLIVER, D.O.; RIEMANN H.P. **Foodborne diseases**. 2nd ed. Barcelona: Elsevier Science, 2002, 411 p.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 263-271, set-dez. 2002.

de CURTIS, M. L.; FRANCESCHINI, O.; DE CASTRO, N. *Listeria monocytogenes* em vegetables minimally processed. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, Venezuela, v. 52, n. 3, p. 282-288, set. 2002.

FAO. Fisheries Technical Paper, nº444. **Assessment and management of seafood safety and quality**. Food and agriculture organization of the United Nations. Roma, p. 230, 2004.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. FAO Fisheries Department. Food and agriculture organization of the united nations. Roma, p. 180, 2006.

FAO, Fisheries and Aquaculture Department. **Cultured Aquatic Species Information Programme: *Oreochromis niloticus***. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus, Acesso em: 17 set. 2007.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, Paris, França, v. 2, n. 13, p. 1651-1660, nov. 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu. 1996. 182p.

GILL, C. O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A; BOARD, R. **The Microbiology of Meat and Poultry**, London: ed. Blackie Academic and Professional, p. 118-157, 1998.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M.-L.; GUSTAVSSON, P.; THORKELSSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A.-M.; NICLASEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, Inglaterra, v. 21. n. 2, p. 217–225, abr. 2004.

HERRERA, F. C.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCIA-LÓPEZ, M. L. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, Inglaterra, v. 100, n. 3, p. 527-536, mar. 2006.

HILSDORF, A.; PEREIRA, J.L; RIBEIRO, M. A. **Perfil do consumo de pescado em restaurantes industriais da região do Vale do Paraíba**. ed. 53, 1999. Disponível em:<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/53/PerfildeConsumo.asp>. Acesso em: 17 jan. 2008.

HUIS in't VELD, J.H. J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p.1-18, nov. 1996.

HUSS, H. H. **Assurance of seafood quality**. FAO Fisheries technical paper n° 334, Roma, FAO. 1993.169p.

HUSS, H. H. **Quality and quality changes in fresh fish**. FAO Fisheries technical paper n° 348, Roma, 1995.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca 2004**: Brasil – grandes regiões e unidades da federação. Tamandaré: IBAMA, 2005.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods: microbial ecology of foods commodities**. Gaithersburg, Maryland: Chapman & Hall, 2005, 2ed., 763p.

JACKSON, T. C.; ACUFF, G. R.; DICKSON, J. S. **Meat, Poultry and Seafood**. In: DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTEVILLE, L. *Food Microbiology*, 1997. P.83-99.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6ed. Aspen Publishers. 2000. 635p.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitza, 2000.

LAMBOOIJ, E.; van de VIS, J.W.; KLOOSTERBOER, R.J.; PIETERSE, C. Welfare aspects of live chilling and freezing of farmed eel (*Anguilla anguilla* L.): neurological and behavioural assessment. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 210, n. 1, p. 159–169, jul. 2002a.

LAMBOOIJ, E.; van de VIS, J.W.; KUHLMANN, H.; MÜNKNER, W.; OEHLENSCHLÄGER, J.; KLOOSTERBOER, R.J.; PIETERSE, C.. A feasible method for humane slaughter of eel (*Anguilla Anguilla* L.): electrical stunning in fresh water prior to gutting. **Aquaculture Research**, Oxford, Inglaterra, v. 33, n. 9, p. 643–652, jul. 2002b.

LANGONI, H.; NAPOLITANO, G. F.; PEZATTO, L. E.; BARROS, M. M.; CANTELMO, O. A. Avaliação da microbiota intestinal de peixes alimentados com duas dietas diferentes. **Boletim Técnico do CEPTA – IBAMA**, Pirassununga, v. 13, p. 37-45, 2000.

LEITÃO, M. F. de F. Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial e marinha. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE DO PESCADO. Santos, 1988. **Anais**. Santos: Editora Leopoldina/Edições Loyola, 1988. p. 40-58.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by egc cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, Inglaterra, v. 95, n. 1, p. 38-43, jan. 2003.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, Londrs, Inglaterra, v. 55, n. 6, p. 645-659, jun. 2006.

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 63-76, 2003.

LOW, J. C.; DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. **Veterinarian Journal**, v. 153, n. 1, p. 9-29, jan. 1997.

MACEDO-VIÉGAS, E. M.; SOUZA, M. L. R. Pré-processamento e conservação do pescado produzido em piscicultura. In: CYRINO, José Eurico Possebon et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Tecart, 2004. 405-480.

MAHMOUD, B. S. M.; YAMAZAKI, K.; MIYASHITA, K.; IL-SHIK, S.; DONG-SUK, C.; SUZUKI, T. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. **Food Microbiology**, Inglaterra, v. 21, n. 6, p. 657-666, dez. 2004.

MARX, H.; BRUNNER, B.; WEINZIERL, W.; HOFFMANN, R.; STOLLE, A. Methods of stunning freshwater fish: impact on meat quality and aspects of animal welfare. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A**, v. 204, p. 282-286, 1997.

MIETTINEN, H.; WIRTANEN, G. Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 104, n. 2, p. 135-143, out. 2005.

NEDOLUHA, P. C.; WESTHOFF, D. Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. **Food Microbiology**, Inglaterra, v. 14, n. 3, p. 255-264, jun. 1997.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de Pesca: Ciência e Tecnologia do Pescado**. São Paulo: Varela, 1999.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. L.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, Washington, EUA, v. 69, n. 1, p. 360-366, jan. 2001.

ORWIN, P. M.; FITZGERALD, J. R.; LEUNG, D. Y. M.; GUTIERREZ, J. A.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. **Infection and Immunity**, Washington, EUA, v. 71, n. 5, p. 2916-2919, maio 2003.

PINHEIRO, L.M.S.; MARTINS, R.T.; PINHEIRO, L.A.S.; PINHEIRO, L.E.L. Rendimento industrial de filetagem da tilápia tailandesa (*Oreochromis* spp.). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 58, n. 2, p. 257-262, abr. 2006.

POPOFF, M. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars**. 8. ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, 2001.

POPMA, T. e MASSER, M. **Tilapia: life history and biology**. Southern Regional Aquaculture Center. nº 283, mar. 1999.

POPMA, T. J. e LOVSHIN, L. L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia**. Research and Development series nº41. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments. Department of Fisheries and Applied Aquacultures Auburn University, Alabama. Mar., 1996.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 5.ed. The McGraw-Hill Companies, 2002.

RAMASWANY, V.; CRESENCE, V. M.; REJITA, J. S.; LEKSHMI, M. U.; DHARSANA, K. S.; PRASAD, S. P.; VIJILA, H. M. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis, **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, Taiwan, v. 40, n. 1, p. 4-13, fev. 2007.

SEAP-PR. **Aqüicultura no Brasil**. Disponível em: http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/aqui/. Acesso em: 11 set. 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SOUZA, M. L. R. e MARANHÃO, T. C. F. Rendimento de carcaça, filé e subprodutos da filetagem da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L), em função do peso corporal. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 897-901, 2001.

SWAMINATHAN, B.; ROCOURT, J.; BILLE, J. *Listeria*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TERNOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. ASM Press Washington, DC, pp. 341–348, 1995.

USDA. Food Safety Regulatory Essentials. **Microbiology of thermally processed commercially sterile and shelf-stable meat and poultry products**. Itália, jun. 2005. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/FSIS_Employees/Food_Safety_Regulatory_Essentials/index.asp. Acesso em: 18 out. 2007.

USFDA. Center for food safety and applied nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook – Bad Bug Book. **Staphylococcus aureus**. Estados Unidos, jan, 1992. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html>. Acesso em: 18 nov. 2007.

USFDA. Center for food safety and applied nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook – Bad Bug Book. **Listeria monocytogenes**. Estados Unidos, jan., 1992. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap6.html>. Acesso em: 29 nov. 2007.

van de VIS, H.; KESTIN, S.; ROBB, D.; OEHLenschLÄGER, J.; LAMBOOIJ, B.; MÜNKNER, W.; KUHLMANN, H.; KLOOSTERBOER, K.; TEJADA, M.; HUIDOBRO, A.; OTTERA, H.; ROTH, B.; SØRENSEN, N. K.; AKSE, L.; BYRNE, H.; NESVADBA, P. Is humane slaughter of fish possible for industry? **Aquaculture Research**, Oxford, Inglaterra, v. 34, n. 3, p. 211-220, fev. 2003.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**: teoria e prática. São Paulo: Livraria Varela, 2004.

WALL, A. J. Ethical considerations in the handling and slaughter of farmed fish. In: **Farmed Fish Quality**. 2001.

YAMPRAYOON, J.; NOOMHORM, A. Geosmin and *off-flavor* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, Canadá, v. 9, n. 2, p. 29-41, jan. 2000.

ZIMMERMANN, S. O bom desempenho das Chitraladas no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 60, p.15-19, jul./ago. 2000.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Pesquisar microrganismos indicadores e patogênicos no filé de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e em diferentes pontos do processamento no frigorífico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a contaminação em filés de tilápia (*O. niloticus*) e na planta de processamento por microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes totais, *E. coli* e estafilococos coagulase positiva.

Identificar os principais pontos de contaminação na planta de processamento.

Detectar a presença de *Salmonella* spp. no filé de tilápia.

Realizar o isolamento, identificação e caracterização sorológica de *Listeria* spp. em diferentes pontos na planta de processamento e no produto final.

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

MICROORGANISMOS INDICADORES E PATOGÊNICOS NO FILÉ DE TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) E EM DIFERENTES PONTOS DA PLANTA DE PROCESSAMENTO.

SILVA, Vanessa Gomes da. **Pesquisa de microrganismos indicadores e patogênicos no filé de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e em diferentes pontos da planta de processamento**. 2008. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

A qualidade e a segurança dos alimentos podem ser avaliadas através da pesquisa e enumeração dos microrganismos existentes no alimento. O objetivo deste trabalho foi realizar a pesquisa de microrganismos indicadores e patogênicos em filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e na planta de processamento de três frigoríficos localizados no Paraná. Foi efetuada a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli*, estafilococos coagulase positiva (ECP) e a pesquisa de *Salmonella* spp e *Listeria* spp. Foram coletadas amostras do setor de descamação, evisceração, *toilet*, embalagem e de filés, totalizando 292 amostras. Para as análises de microrganismos indicadores foi utilizado o Sistema Petrifilm™ AC, EC e STX e para os microrganismos patogênicos a metodologia preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. As médias logarítmicas da contagem por AM e CT foram de 3,77 e 0,68 UFC/cm² em equipamentos, 3,71 e 0,56 UFC/cm² nas instalações, 4,88 e 1,79 UFC/superfície em mãos de manipuladores e 3,95 e 2,69 UFC/g no filé. *E. coli* e ECP foram encontrados em cinco e quatro amostras provenientes da planta de processamento, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os diferentes setores do frigorífico ($p>0,05$), exceto na contagem de coliformes totais na água de abastecimento e em uso e nas instalações dos setores de evisceração, *toilet* e embalagem. *Salmonella* spp. não foi encontrada em nenhuma amostra de filé. *Listeria* spp. foi isolada em 5 amostras, sendo um isolado de *L. innocua* 6b e quatro de *L. monocytogenes* 1/2c. As contagens de microrganismos indicadores nas plantas de processamento sugerem falhas de higienização e sanitização e a presença de *L. monocytogenes* pode representar risco à saúde do consumidor.

Palavras-chave: Pescado. Tilápia do Nilo. Frigorífico. Qualidade microbiológica. *Salmonella* spp. *Listeria* spp.

SILVA, Vanessa Gomes da. **Research of indicator and pathogenic microorganisms in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) filets and in different sites in the processing plant.** 2008. 58p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The research of microorganisms may be employed to reflect the microbiological quality of foods or their safety concerning foodborne pathogens. The purpose of this study was to search for indicator and pathogenic microorganisms in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) filets and in the processing plants in three slaughterhouses in Paraná, Brazil. The study comprised counts of aerobic mesophilic bacteria (AM), total coliforms (TC), *Escherichia coli* (EC), coagulase-positive staphylococci (CPS) and the detection of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. Samples from stunning and scaling area, gutting, filleting, packaging and final products were collected, totalizing 291 samples. Petrifilm™ plate system and the methodology recommended by the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento was employed to make the analyses. The means of contamination for AM and TC in equipments were 3,77 CFU/cm² and 0,68 CFU/cm², in installations were 3,71 CFU/cm² and 0,56 CFU/cm², in workers' hands were 4,88 CFU/surface and 1,79 CFU/surface and in final product were 3,95 CFU/g and 2,69 CFU/g, respectively. *E. coli* and CPS were detected in five and four samples, respectively, collected during processing. There was no statistical difference ($p > 0,05$) among the different areas in the slaughterhouses for AM and TC counts but in total coliforms counts for water and installation sites (gutting, filleting and packaging areas). *Salmonella* spp. were not detected in any filet samples. *Listeria* spp. were detected in 5/291 samples analyzed, one *L. innocua* 6b and four *L. monocytogenes* 1/2c. The results for indicator microorganisms in the processing plants suggest faults in cleaning procedures and the presence of *L. monocytogenes* may pose risk to consumers' health.

Key words: Fish. Nile tilapia. Slaughterhouse. Microbiological quality. *Salmonella* spp. *Listeria* spp.

1 INTRODUÇÃO

Segundo Fitzsimmons (2000), a criação de tilápias encontra-se amplamente distribuída no mundo, podendo atingir uma produção mundial de 1.500.000 t em 2010. Todas as tilápias comercialmente importantes pertencem ao gênero *Oreochromis* e mais de 90% das tilápias cultivadas fora da África são tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (POPMA; MASSER, 1999). No Brasil, em 2004, a aquicultura de água doce produziu 180.730,5 t. O estado do Paraná ocupa a sexta posição nacional, com uma produção de 16.558 t (9,16%), dos quais 11.921,5 t são de tilápias (IBAMA, 2005).

A tilápia do Nilo destaca-se como uma das mais importantes, devido à sua alta taxa de crescimento, adaptabilidade em diversas condições e sistemas de criação e boa aceitação pelo consumidor, principalmente pela excelente textura, pelo sabor de sua carne e ausência de espinhos intramusculares (KUBITZA, 2000; BOSCOLO; HAYASHI; SOARES, 2001).

O pescado é considerado um alimento facilmente digerível sendo que sua composição química varia de acordo com a espécie, idade, sexo, meio ambiente, época do ano, entre outros fatores. A composição do músculo do pescado pode variar em: 16% a 21% de proteínas, 0,2% a 25% de lipídios, menos de 0,5% de carboidratos, 1,2% a 1,5% de substâncias inorgânicas e 66% a 81% de água (HUSS, 1995).

Devido à sua alta atividade de água, composição química, teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, ao pH próximo da neutralidade, o pescado torna-se bastante suscetível à deterioração microbiana, sendo considerado um excelente meio de cultura para o desenvolvimento bacteriano (FRANCO; LANDGRAF, 1996; PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002).

Com a morte do peixe a autólise da musculatura é iniciada pela ação do suco gástrico (JAY, 2000). Em seguida há a produção de vários compostos nitrogenados não-protéicos, sendo os mais freqüentes a trimetilamina, a amônia e os ácidos voláteis, que funcionarão como substrato para os microrganismos (HUSS, 1993; HUSS, 1995). Segundo Aubourg et al. (2007), a velocidade com que estas alterações ocorrem depende da espécie do peixe, do tamanho, do teor de gordura, da situação do trato digestório no momento da captura, do tipo de microbiota e da temperatura de estocagem. A atividade bacteriana é o fator que mais intensamente

influencia a qualidade do pescado. (GRAM; HUSS, 1996).

Microrganismos indicadores fornecem informações sobre a presença de microrganismos patogênicos e deteriorantes assim como sobre as condições sanitárias durante o processamento, produção ou armazenamento do alimento (FRANCO; LANDGRAF, 1996; JAY, 2000).

As carnes, vermelhas e brancas, são consideradas como deterioradas se alterações organolépticas as tornam inaceitáveis para o consumo. Em geral os efeitos da deterioração em carnes se tornam evidentes quando o número de microrganismos mesófilos presentes na superfície atinge 10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/cm², já com a presença de odores desagradáveis e com uma contagem de 10^7 UFC/cm² é possível detectar os primeiros sinais de formação de limo (FRANCO; LANDGRAF, 1996; JACKSON et al., 1997; GILL, 1998).

A enumeração de coliformes é utilizada como indicador de contaminação ambiental e possíveis contaminações por microrganismos entéricos. Aeróbios mesófilos, psicrotróficos, bolores e leveduras têm importante influência sobre a vida de prateleira dos alimentos sendo considerados os principais indicadores de deterioração (AL-MOHIZEA et al., 1994). A contagem de estafilococos é mais importante em alimentos manipulados caracterizando falhas nessa etapa (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

L. monocytogenes já foi isolada de uma variedade de alimentos crus e processados como carne bovina, suína, de frango, de cavalo, em pescado e frutos do mar (IIDA et al., 1998; GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004), laticínios (FELDHUSEN, 2000) e vegetais (de CURTIS et al., 2002).

A resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001) define os critérios e padrões microbiológicos para alimentos destinados à venda e à exportação, estabelecendo para pescados *in natura*, resfriados ou congelados a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g e contagem máximo de 10^3 UFC/g para estafilococos coagulase positiva.

No Brasil, são poucos os estudos sobre a ocorrência de microrganismos indicadores e patogênicos em planta de processamento de tilápia do Nilo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições higiênico-sanitárias das plantas de processamento de tilápia do Nilo por meio da pesquisa de microrganismos indicadores e patogênicos no pescado, nos equipamentos, nas instalações, nos manipuladores e na água de abastecimento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAIS DE COLETA

Foram realizadas três coletas, no período de julho de 2006 a setembro de 2007, em três frigoríficos processadores de tilápias, localizados no estado do Paraná. O frigorífico A situa-se na região oeste do estado e possui Serviço de Inspeção Federal (SIF). Os frigoríficos B e C situam-se na região norte do estado e possuem Serviço de Inspeção Municipal (SIM).

As coletas foram realizadas durante o processamento do pescado e as análises microbiológicas efetuadas no Laboratório de Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas e no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

2.2 PONTOS DE COLETA

Os estabelecimentos foram divididos conforme a área do processamento em setores de descamação, evisceração, *toilet* e embalagem. Em cada um desses setores foram coletadas amostras de equipamentos, instalações, mãos de manipuladores, água, matéria-prima e produto final.

No setor de descamação, presente apenas no Frigorífico A, era realizada a insensibilização do peixe por choque térmico, corte das guelras para a sangria e retirada das escamas. Nos Frigoríficos B e C, os peixes eram abatidos na área de evisceração por corte nas guelras e não era realizada a descamação.

Os equipamentos amostrados foram: cubas de aço inoxidável, caixas plásticas, equipamento de filetagem, descamador, balança, mesas, facas e alicates, totalizando 103 amostras. De instalações foram amostrados câmaras de gelo, paredes, pisos e ralos, totalizando 77 amostras. Essas amostras foram compostas por dois ou três pontos distintos de superfície (dois pontos de 30cm² ou três de 20 cm²), totalizando 60 cm², exceto facas e alicates que foram amostrados em toda a sua superfície.

De manipuladores foram coletadas 41 amostras de toda superfície das mãos e 22 amostras de água de abastecimento e água em uso, sendo cada

amostra de 100 mL.

Dos peixes vivos foram coletadas 12 amostras e dos filés antes da embalagem, nove. Para a coleta foi realizado esfregação de superfície, em áreas de 50cm² em dois pontos distintos de 25 cm². Do filé embalado destinado ao consumo foram coletadas 27 amostras e mantidas em sua embalagem original.

A coleta das amostras de superfície foi efetuada, segundo recomendação da ABNT (1998), com *swabs* e moldes estéreis, exceto as facas e alicates que foram amostrados apenas com *swab*. Ainda, nos frigoríficos as amostras coletadas de superfície foram diluídas em 30 mL de água peptonada estéril 0,1% (Biobrás[®]).

Todas as amostras foram encaminhadas aos laboratórios em recipientes isotérmicos com gelo reciclável.

2.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

2.3.1 Preparo das amostras

Das amostras de superfície, diluídas em água peptonada e das amostras de água foram realizadas diluições decimais em salina estéril 0,85% para enumeração de microrganismos indicadores. Do produto final coletou-se 25 ± 0,5g (pool de três filés) que foram diluídos em 225 mL de água peptonada (Biobrás[®]) e homogeneizadas em stomacher (ITR[®]) e igualmente realizadas diluições decimais em salina estéril 0,85% para enumeração de microrganismos indicadores.

Para a detecção de *Salmonella* spp. no produto final as amostras foram diluídas e homogeneizadas em água peptonada tamponada (Acumedia[®]). Para a pesquisa de *Listeria* spp. foram utilizados 5 mL das amostras de superfície e água e 5 g (pool de três filés) do produto final diluídos e homogeneizados em 45 mL do caldo de enriquecimento primário Universidade de Vermont modificado (UVM) (Oxoid[®]).

2.3.2 Enumeração de microrganismos indicadores

Para a enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos (AM) utilizou-se o Sistema Petrifilm[™] AC, para coliformes totais e *E. coli*, o Sistema Petrifilm[™] EC e para estafilococos coagulase positiva, o Sistema Petrifilm[™] STX, sendo inoculados

1 mL de cada diluição e incubadas conforme indicação do fabricante.

As contagens obtidas foram padronizadas de acordo com a diluição empregada e a área amostrada e expressas em log UFC/mL, log UFC/cm², log UFC/g ou log UFC/superfície.

2.3.3 Detecção de microrganismos patogênicos

2.3.3.1 Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada em 27 amostras do filé embalado pronto para comercialização.

As amostras, diluídas em água peptonada tamponada foram incubadas a 35°C ± 2°C por 20 a 24h. O enriquecimento seletivo foi realizado transferindo-se 0,5 mL de água peptonada tamponada para 10 mL de Caldo Tetrionato (Acumedia[®]) e 0,1 mL para 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis modificado (Acumedia[®]), simultaneamente. Ambos foram então incubados por 18 a 24 horas em banho-maria a 42°C. Para o isolamento, alíquotas dos meios de enriquecimento seletivo foram semeadas em Ágar Verde Brilhante Sulfa (Acumedia[®]) e Ágar XLT4 (Acumedia[®]) e incubados a 35°C por até 48h (BRASIL, 2005).

2.3.3.2 Pesquisa de *Listeria* spp.

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi empregada a metodologia do United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) para produtos cárneos e amostras ambientais, com modificação quanto ao volume e peso da amostras utilizadas no enriquecimento primário, 5 mL ou 5 g em 45 mL de UVM.

As amostras, previamente preparadas em caldo UVM foram incubadas por 22h ± 2h a 30°C ± 2°C. Posteriormente, 1 mL do Caldo UVM foi transferido para 10 mL de Caldo Fraser (Acumedia[®]) e incubado por até 48 ± 2h a 35°C ± 2°C. Em seguida, as amostras consideradas positivas (escurecimento do meio) foram semeadas em Agar Oxford Modificado (Acumedia[®]) e incubadas por até 48h ± 2h a 35°C ± 2°C. As placas com colônias pequenas (aproximadamente 1 mm) e rodeadas por uma área escura devido à hidrólise da esculina foram consideradas

positivas e cinco destas foram então semeadas em agar soja triptona (Biobrás[®]) suplementado com extrato de levedura (Biobrás[®]) por $22\text{h} \pm 2\text{h}$ a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. As amostras positivas para *Listeria* spp. foram submetidas às análises de coloração de Gram, prova da catalase, verificação de hemólise em agar sangue, fermentação de açúcares (manitol, ramnose, xilose e destrose) com incubação por 7 dias a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e prova de motilidade em agar semi-sólido com incubação por 7 dias a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Para a confirmação e sorotipagem, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Zoonoses Bacterianas, no Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – RJ.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises dos microrganismos pesquisados foram convertidos em \log_{10} , e vários parâmetros estatísticos foram calculados utilizando-se análise de variância (ANOVA) e cálculo das médias pelo teste “t” de Tuckey com $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média logarítmica das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos (CMAM) em equipamentos foi de 3,77 UFC/cm² e 5,66 UFC/superfície (Tabela 3). Apesar de não ter havido diferença significativa ($p > 0,05$) entre as contagens dos equipamentos da área de descamação, evisceração e *toilet*, na área de evisceração, o alicate e as facas, e na área de *toilet*, as facas e as caixas plásticas, apresentaram as contagens mais elevadas (Tabela 5).

No frigorífico A, o setor de *toilet* não era abastecido com água corrente e, portanto as facas não eram lavadas durante o processamento, somente no início e no final do turno. Alicates para retirada do couro só eram usados pelo frigorífico C e, apesar do uso contínuo de água no setor de evisceração, não ocorria a lavagem dos alicates nesta etapa do processamento. Esta prática facilita o acúmulo de matéria orgânica e microrganismos, o que pode explicar as CMAM encontradas.

Nas amostras das instalações a média logarítmica das CMAM foi de 3,71 UFC/cm² (Tabela 3). A média logarítmica da CMAM nos ralos da área de descamação e da área de embalagem foi de 6,07 UFC/superfície. Nestes setores, os ralos do setor de descamação apresentaram contagem máxima de 7,97 UFC/superf. verificada no Frigorífico A. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas contagens encontradas nas instalações das diferentes áreas. Salienta-se que em quase todos os pontos amostrados em equipamentos e instalações o valor máximo esteve acima de 6,0 log UFC/cm² ou UFC/superfície. Somente o piso do setor de embalagem apresentou média inferior a 4 log UFC/cm². Na Tabela 6 estão descritas as médias dos pontos mais contaminados nas instalações das plantas de processamento.

Ralos e pisos podem representar, além de ambientes propícios para o desenvolvimento de microrganismos, importantes fontes de manutenção e propagação de microrganismos já que a higienização com água sob pressão pode ocasionar a suspensão dos microrganismos em gotículas e disseminá-los para outras áreas da planta de processamento (BARROS, 2005).

Gill (1998) considera que superfícies visivelmente limpas ainda podem apresentar contagens totais de 10 a 10³ UFC/cm². Hood e Zottola (1995) consideram contagens a partir de 10⁴ UFC/cm² suficientes para a formação de biofilmes.

A média logarítmica da CMAM nas amostras de água de abastecimento foi de 3,28 UFC/mL e de água em uso de 4,39 UFC/mL, diferença não significativa ($p > 0,05$) (Tabela 3). O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1952) preconiza para estabelecimentos de produtos de origem animal destinados à alimentação, um limite máximo de 500 UFC/mL de microrganismos aeróbios mesófilos, o que evidencia a má qualidade da água utilizada no processamento do pescado.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas médias das CMAM das mãos dos manipuladores dos diferentes setores, entretanto a média mais elevada foi evidenciada no setor de *toilet*, 5,34 UFC/superfície com contagem máxima de 6,88 UFC/superfície, obtida no Frigorífico A (Tabela 3). No setor de *toilet* deste frigorífico não havia o fornecimento constante de água corrente e, portanto não havia também a prática de higienização das mãos durante o processamento, o que pode justificar as altas contagens. Manipuladores são considerados importantes fonte de incorporação de microrganismos em alimentos durante o processamento.

Temelli et al. (2006) obtiveram CMAM de 2,67, 2,99 e 5,48 UFC/cm² nos equipamentos (tesouras, garfos e mesas de evisceração, respectivamente) e 5,73 UFC/cm² em mãos de manipuladores em planta de processamento de moluscos. Os autores consideraram estas contagens muito elevadas e apontaram os equipamentos e as mãos de manipuladores como fontes de contaminação.

As médias logarítmicas das CMAM nas amostras coletadas de peixes vivos (3,48 UFC/cm²), filés no setor de embalagem (3,01 UFC/cm²) e filés embalados (3,95 UFC/g), não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 3). A média mais elevada, verificada nos filés embalados prontos para comercialização, demonstrou a possível incorporação de microrganismos a partir das instalações, equipamentos e manipuladores.

Belchior e Pucci (2000) pesquisando a qualidade microbiológica de filés de merluza durante as diferentes fases de processamento relataram contagem de bactérias aeróbias mesófilas mais reduzida no peixe conservado na câmara frigorífica antes do processamento e aumento durante as fases de filetagem e de embalagem.

Chytiri et al. (2004) avaliaram a carga microbiana total em trutas, e encontraram contagens de 2,5 log UFC/cm² em peixe não eviscerado e 3,8 log UFC/cm² em pescado recém filetado. Segundo os autores esse aumento está

associado à contaminação cruzada durante o processamento devido ao contato com os vários equipamentos usados (tábuas de corte, facas), com os manipuladores e gelo utilizado durante a insensibilização dos peixes.

Olafsdóttir et al. (1997) consideram que peixes inteiros não eviscerados e filés apresentam uma contagem de microrganismos viáveis em torno de $10^2 - 10^6$ UFC/g. Gram e Huss (1996) consideram para um pescado fresco de alta qualidade contagens obtidas em sua superfície entre 3 a 4 log UFC/g.

De acordo com a literatura, níveis de contaminação por aeróbios mesófilos de 10^2 a 10^5 UFC/cm² em carnes indicam que o abate ocorreu em condições higiênicas e acima de 10^5 em condições insatisfatórias (GILL, 1998). Contaminações de carne em torno de 10^6 UFC/cm² podem indicar processo de deterioração com odor desagradável e comprometimento da vida de prateleira, e a partir de 10^7 UFC/cm² pode ser evidenciada limosidade (FRANCO; LANDGRAF, 1996; GILL, 1998). Neste trabalho das 15 amostras de filés embalados, três apresentaram contagens acima de 6,0 log UFC/g e a contagem máxima foi de 7,79 UFC/g o que pode indicar deterioração e redução no tempo de prateleira destas amostras.

A média logarítmica das contagens de coliformes totais (CCT) em equipamentos foi de 0,68 UFC/cm² e 2,63 UFC/superfície (Tabela 4). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as contagens dos equipamentos da área de descamação, evisceração e *toilet*. O alicate no setor de evisceração e as facas no setor de *toilet* foram os mais contaminados com médias de 3,42 UFC/superfície e 2,63 UFC/superfície, respectivamente (Tabela 5).

Nas amostras das instalações a média logarítmica da CCT foi de 0,56 UFC/cm² e 2,66 UFC/superfície (Tabela 4). A média da CCT no setor de evisceração foi significativamente ($p < 0,028$) mais elevada quando comparada aos setores de *toilet* e embalagem. Os ralos do setor de embalagem do frigorífico C foram os mais contaminados com média de 3,40 UFC/superfície (Tabela 5). Os frigoríficos A e B não possuíam ralos neste setor.

As amostras de água de abastecimento e da água em uso apresentaram média de CCT de 0,31 UFC/mL e 1,72 UFC/mL ($p = 0,002$), respectivamente (Tabela 4).

As mãos dos manipuladores apresentaram média logarítmica de CCT de 1,79 UFC/superfície, com níveis máximos de 3,79 (Tabela 4). Os manipuladores do

setor de evisceração apresentaram o maior índice de contaminação com média de 2,22 log UFC/superfície. A média mais reduzida foi verificada no setor de embalagem. Não houve diferença ($p>0,05$) entre as médias da contagem nos manipuladores dos diferentes setores.

O peixe antes do abate apresentou média logarítmica de CCT de 0,65 UFC/cm², o filé no setor de embalagem, 0,48 UFC/cm² e o filé embalado, destinado ao consumo, média de 2,69 UFC/g (Tabela 4). Estes resultados sugerem a incorporação de coliformes totais durante o processamento, apesar das medidas de amostragem serem diferentes.

Bianchini et al. (1999), na Costa Rica, analisaram 135 amostras de pescado fresco filetado e obtiveram CCT de 10² a 10⁷ UFC/g e contagem de coliformes termotolerantes 10² a 10⁶ UFC/g e relataram que estes dados mostram a baixa qualidade do produto e indicam contaminação por manipuladores, água, instalações e equipamentos mal higienizados.

Morales et al. (2004), também na Costa Rica, verificaram que 74% dos filés de tilápia analisados apresentaram CCT superiores a 10³ UFC/g e consideraram a qualidade microbiológica dos filés inaceitável já que 58% das amostras foram positivas para coliformes termotolerantes com contagens acima de 5 x 10² UFC/g (2,69 log UFC/g), limite estabelecido pelo ICMSF.

E. coli foi isolada nos Frigoríficos A e B, em 5/248 amostras positivas para coliformes totais. *E. coli* foi encontrada em quatro amostras do setor de evisceração, sendo três de mãos de manipuladores com contagens de 2,65, 2,57 e 2,78 log UFC/superfície e uma amostra de facas com contagem de 2,71 log UFC/superfície. Uma amostra de água em uso apresentou contagem de 1,30 log UFC/mL. *E. coli* não foi isolada da água de abastecimento e das amostras de peixes vivos, o que sugere equipamentos e manipuladores como possíveis fontes de contaminação. Este microrganismo não está presente na microbiota dos peixes e, portanto a matéria-prima torna-se uma improvável fonte de contaminação para o produto final. Mesmo não tendo sido isolado nos filés embalados para comercialização, a presença de *E. coli* na planta de processamento possibilita a sua incorporação ao produto final.

Temelli et al. (2006), em plantas de processamento de moluscos, relataram o isolamento de *E. coli* em equipamentos e manipuladores e sugeriram possíveis falhas de higienização nas plantas.

Estafilococos coagulase positiva foram isolados nos Frigoríficos B e C, de 4/291 amostras. Na mesa, piso e mãos de manipulador do setor de evisceração, as contagens obtidas foram 1,48 log UFC/cm², 0,93 log UFC/cm² e 3,42 log UFC/superfície, respectivamente, e uma amostra em mãos de manipulador no setor de *toilet* com contagem de 2,29 log UFC/superfície. No filé embalado não foram isolados estafilococos coagulase positiva. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece para pontos de comercialização, limite máximo de 10³ UFC/g de estafilococos coagulase positiva, para pescado *in natura*, resfriado ou congelado não consumido cru (BRASIL, 2001).

No estudo realizado por Basti et al. (2006), *S. aureus* não foi isolado de peixes recém-capturados e de peixes cultivados, indicando que não é parte da microbiota de pescados. Portanto, a presença deste microrganismo em pescados crus e derivados é devido à contaminação durante a captura e/ou subsequente processo de manipulação sem a higiene adequada.

Simon e Sanjeev (2007) pesquisaram *Staphylococcus aureus* em pescado e manipuladores de indústria e relataram que 62% dos manipuladores eram portadores de *S. aureus*, dos quais 28% eram cepas enterotoxigênicas. Dentre os produtos analisados 17% estavam contaminados com *S. aureus*, dos quais 41% eram enterotoxigênicos. Foram caracterizadas as enterotoxinas SEA, SEB e SEC. Os autores afirmaram que a contaminação do produto ocorre pelo manuseio e estocagem inadequados, e enfatizaram a necessidade de adoção de medidas sanitárias mais rigorosas.

A ocorrência de *S. aureus* em alimentos manipulados é comum, sendo que a contaminação geralmente se origina no manipulador ou pela contaminação cruzada devido ao contato com equipamentos mal higienizados (HERRERA, 2006).

Em nenhuma amostra de filé embalado foi isolada *Salmonella* spp. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece para pontos de comercialização, a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de pescado *in natura*, resfriado ou congelado não consumido cru (BRASIL, 2001).

Davies et al. (2001) e Basti et al. (2006), em estudo com peixes, não isolaram microrganismos do gênero *Salmonella* na microbiota de pescados e sugerem que a presença de *Salmonella* spp. em pescados seja devido à falta de controle e higiene durante a manipulação. Além disso, Pilarski et al. (2004) avaliaram o músculo de carpas cultivadas em viveiros fertilizados com dejetos de

suínos e fertilizados com ração comercial e não encontraram *Salmonella* spp. em nenhuma amostra analisada.

Cinco amostras (1,72%) das 291 pesquisadas foram positivas para *Listeria* spp. das quais quatro foram identificadas como *L. monocytogenes* e uma como *L. innocua*. As amostras de *L. monocytogenes* foram isoladas somente em uma coleta, no Frigorífico A, das mãos e faca de um manipulador, caixa plástica do setor de *toilet* e do filé de tilápia embalado (Tabela 6).

Chiarini (2007) afirma que em locais mais limpos da indústria onde a presença de microrganismos competidores é menor, e em temperaturas mais amenas a *L. monocytogenes* encontra condições favoráveis a sua sobrevivência e multiplicação. No presente estudo os isolamentos de *L. monocytogenes* ocorreram no setor de *toilet* que apresentou CMAM e CCT sem diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparadas aos outros setores das plantas de processamento.

L. monocytogenes pode contaminar todo o ambiente da planta de processamento desde a matéria-prima até o produto final e persistir mesmo após a higienização (GUDMUNDSDÓTTIR et al., 2005).

Vários estudos mostram que a incorporação de *Listeria* spp. ao produto final ocorre principalmente pelo contato com equipamentos e manipuladores contaminados e menos freqüentemente pela matéria-prima contaminada (RØRVIK et al., 1995; AUTIO et al., 1999; FONNESBECH VOGEL et al., 2001; BARROS et al., 2004; GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004).

Medrala et al. (2003), na Polônia, isolaram em uma planta de processamento, no período de um ano, 36/177 amostras de *L. monocytogenes* em filé de linguado cru, filé empanado congelado e de diversos pontos da planta de processamento. Os autores enfatizam que há necessidade do desenvolvimento de um esquema de sanitização voltado para *Listeria* a fim de evitar a sua persistência na planta de processamento.

Gudbjörnsdóttir et al. (2004), na Islândia, no período de 1998 a 1999, pesquisaram *L. monocytogenes* em cinco plantas de processamento de frutos do mar, e isolaram a bactéria em 154/1180 amostras da planta de processamento e produto final. O produto final cru estava mais contaminado que a matéria-prima. Esses resultados indicam que a contaminação ocorre e aumenta durante o processamento.

Bianchini et al. (1999), pesquisaram pescado fresco filetado em peixarias de

São José na Costa Rica e encontraram em um total de 135 amostras, 88 (65,2%) positivas para *Listeria* spp., das quais 46 (52,3%) positivas para *L. monocytogenes*.

As quatro amostras de *L. monocytogenes* isoladas pertencem ao sorogrupo 1 e sorovar 1/2c (Tabela 6).

Gianfranceschi et al. (2003) examinaram no período de 1990 a 1999 na Itália, 280 amostras de peixes e derivados e isolaram *L. monocytogenes* em 78 (27,9%), com predominância dos sorovares 1/2a (44,8%), 4b (30,8%) e 1/2b (10,3%). O sorovar 1/2c foi detectado em uma amostra.

Vitas et al. (2004), no norte da Espanha, investigaram um total de 3685 amostras de alimentos, a ocorrência maior de *L. monocytogenes* foi verificada em carne de aves (36,1%) e salmão defumado (28,0). Do total de 307 amostras de *L. monocytogenes* isoladas, 121 pertenceram ao sorovar 1/2a, 71 ao 4b/4bx, 58 ao 1/2c e 53 ao 1/2b. Nas amostras de salmão não foi isolado o sorovar 1/2c.

Latorre et al. (2007) pesquisaram 5.788 amostras de alimentos no período de 1993 a 2004 na Itália, destas 121 (2,1%) apresentaram *L. monocytogenes*. A maior incidência foi em salmão defumado (10,6%) e carne de aves (8,5%). Em 154 amostras de frutos do mar frescos não foi isolado *L. monocytogenes*. Os sorovares mais comuns foram 1/2a (32,8%), 1,2c (32,8%), 1/2b (13,5%) e 4b (11,5%).

Basti et al. (2006) relatam a ocorrência de *L. monocytogenes* sorovar 1/2a e 1/2b em 10,2% de carpas prateadas (*H. molitrix*) cultivadas.

Doumith et al. (2004) citaram que apesar de todos os sorovares de *L. monocytogenes* serem potencialmente capazes de causar doenças em humanos, os sorovares 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b são responsáveis por 98% dos casos. Jacquet et al. (2002) ao comparar estatisticamente amostras de origem alimentar e amostras de origem humanas sugerem que, se existir um sorovar atenuado ou avirulento para humanos, este está associado ao 1/2c. Segundo Vitas et al. (2004) o sorovar 1/2c não foi isolado de listeriose humana de origem alimentar.

L. innocua 6b foi isolada em uma amostra de piso no setor de evisceração do Frigorífico C. A presença de uma espécie de listeria não patogênica em determinado ambiente pode ser indicativa da ocorrência de *L. monocytogenes*, e a *L. innocua* poderia ser um bom indicador para esse patógeno (SLADE, 1992).

Esta espécie é considerada apatogênica para o homem (ALLERBERGER, 2003), no entanto, um caso fatal por *L. innocua* em uma mulher por bacteremia já foi relatado (PERRIN; BERNER; DELAMARE, 2003).

A legislação brasileira não estabelece limites para *L. monocytogenes* em carnes e produtos cárneos. Alguns países têm estabelecido limites legais e padrões para este patógeno em alimentos (União Européia, 2005; CANADÁ, 2005). O governo dos Estados Unidos estabelece ausência do microrganismo em 50g de alimento, sendo considerada a legislação mais rígida (JAY, 2000).

Tabela 3 – Médias logarítmicas das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos em amostras de equipamentos, instalações, manipuladores, água, matéria-prima e produto final colhidas nos diferentes setores de três frigoríficos de peixes localizados no Paraná, Brasil.

Amostras^{1, 2}	n	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Mínimo	Máximo	
EQUIPAMENTOS							
descamação	5	4,32	1,30	0,58	3,28	6,55	UFC/cm ²
evisceração	28	3,48	1,08	0,20	1,70	5,84	UFC/cm ²
<i>toilet</i>	26	3,51	1,46	0,29	1,20	6,15	UFC/cm ²
<i>subtotal</i>	59	3,77	1,28	0,36	1,20	6,55	UFC/cm ²
evisceração	11	5,51	1,00	0,30	4,40	7,26	UFC/superf
<i>toilet</i>	11	5,82	1,08	0,33	4,36	7,39	UFC/superf
<i>subtotal</i>	22	5,66	1,04	0,31	4,36	7,39	UFC/superf
INSTALAÇÕES							
evisceração	16	3,95	1,49	0,37	1,49	6,11	UFC/cm ²
<i>toilet</i>	16	3,76	1,50	0,37	1,22	5,67	UFC/cm ²
embalagem	7	3,41	0,97	0,37	2,26	4,70	UFC/cm ²
<i>subtotal</i>	39	3,71	1,33	0,37	1,22	7,97	UFC/cm ²
descamação	6	6,72	1,35	0,55	4,43	7,97	UFC/superf
embalagem	2	5,42	1,96	1,39	4,03	6,81	UFC/superf
<i>subtotal</i>	8	6,07	1,66	0,97	4,03	7,97	UFC/superf
MANIPULADOR (mão)							
evisceração	10	5,15	1,45	0,46	1,41	6,41	UFC/superf
<i>toilet</i>	14	5,34	0,80	0,22	4,30	6,88	UFC/superf
embalagem	7	4,16	1,16	0,44	2,69	5,80	UFC/superf
<i>subtotal</i>	31	4,88	1,14	0,37	1,41	6,88	UFC/superf
ÁGUA							
abastecimento	7	3,28	1,29	0,49	1,28	4,95	UFC/mL
em uso	8	4,39	1,33	0,47	3,00	6,67	UFC/mL
<i>subtotal</i>	15	3,84	1,31	0,48	1,28	6,67	UFC/mL
PRODUTO							
peixe	11	3,48	0,51	0,15	2,75	4,33	UFC/cm ²
filé	8	3,01	0,95	0,34	2,03	4,91	UFC/cm ²
<i>subtotal</i>	19	3,24	0,73	0,24	2,03	4,91	UFC/cm ²
filé embalado	15	3,95	1,86	0,48	2,34	7,79	UFC/g
TOTAL	208						

¹ p>0,05.

² somente unidades de amostragem iguais foram comparadas entre si.

Tabela 4 – Médias logarítmicas das contagens de coliformes totais em amostras de equipamentos, instalações, manipuladores, água, matéria-prima e produto final colhidas nos diferentes setores de três frigoríficos de peixes localizados no Paraná, Brasil.

Amostras¹	n	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Mínimo	Máximo	
EQUIPAMENTOS							
descamação	4	0,63	0,43	0,21	0,00	0,95	UFC/cm ²
evisceração	34	0,73	0,79	0,14	0,00	2,43	UFC/cm ²
<i>toilet</i>	32	0,67	0,63	0,11	0,00	1,68	UFC/cm ²
<i>subtotal</i>	70	0,68	0,61	0,15	0,00	2,43	UFC/cm ²
evisceração	11	2,63	1,36	0,41	0,00	3,96	UFC/superf
<i>toilet</i>	12	2,63	1,27	0,37	0,00	3,73	UFC/superf
<i>subtotal</i>	23	2,63	1,31	0,39	0,00	3,96	UFC/superf
INSTALAÇÕES							
evisceração ²	25	0,98 ^a	1,11	0,22	0,00	3,11	UFC/cm ²
<i>toilet</i> ²	22	0,40 ^b	0,70	0,15	0,00	1,98	UFC/cm ²
embalagem ²	16	0,32 ^b	0,59	0,15	0,00	1,46	UFC/cm ²
<i>subtotal</i>	63	0,56	0,80	0,17	0,00	3,11	UFC/cm ²
descamação	4	1,93	2,22	1,11	0,00	3,86	UFC/superf
embalagem	2	3,40	0,82	0,58	2,82	3,98	UFC/superf
<i>subtotal</i>	6	2,66	1,52	0,85	0,00	3,98	UFC/superf
MANIPULADOR (mão)							
evisceração	12	2,22	1,40	0,40	0,00	3,79	UFC/superf
<i>toilet</i>	13	2,05	1,44	0,40	0,00	3,27	UFC/superf
embalagem	7	1,09	1,37	0,52	0,00	2,73	UFC/superf
<i>subtotal</i>	32	1,79	1,40	0,44	0,00	3,79	UFC/superf
ÁGUA							
abastecimento ³	13	0,31 ^a	0,77	0,21	0,00	2,10	UFC/mL
em uso ³	7	1,72 ^b	0,94	0,36	0,00	2,62	UFC/mL
<i>subtotal</i>	20	1,02	0,85	0,28	0,00	2,62	UFC/mL
PRODUTO							
peixe	11	0,65	0,63	0,19	0,00	1,65	UFC/cm ²
filé	8	0,48	0,45	0,16	0,00	1,16	UFC/cm ²
<i>subtotal</i>	19	0,57	0,54	0,18	0,00	1,65	UFC/cm ²
filé embalado	15	2,69	0,53	0,14	2,00	3,97	UFC/g
TOTAL	248						

¹ somente unidades de amostragem iguais foram comparadas entre si.

² p=0,028. Letras diferentes indicam médias diferentes.

³ p=0,002. Letras diferentes indicam médias diferentes.

Tabela 5 – Médias dos principais pontos de contaminação por microrganismos aeróbios mesófilos e coliformes totais em equipamentos e instalações nos diferentes setores de plantas de processamento de três frigoríficos de peixes localizados no Paraná, Brasil.

SETOR	EQUIPAMENTOS	AERÓBIOS MESÓFILOS	COLIFORMES TOTAIS	
DESCAMAÇÃO	descamador	4,91	0,87	UFC/cm ²
	cuba de aço inoxidável	3,92	0,39	UFC/cm ²
EVISCERAÇÃO	alicate	6,36	3,42	UFC/superf.
	facas	5,19	2,33	UFC/superf.
TOILET	facas	5,82	2,63	UFC/superf.
	caixa plástica	5,20	0,98	UFC/cm ²
INSTALAÇÕES				
DESCAMAÇÃO	ralo	6,72	1,93	UFC/superf.
EVISCERAÇÃO	ralo	5,10	1,72	UFC/cm ²
	piso	4,30	1,18	UFC/cm ²
TOILET	ralo	4,89	0,15	UFC/cm ²
	piso	4,26	0,88	UFC/cm ²
EMBALAGEM	ralo	5,42	3,40	UFC/superf.
	piso	3,41	0,64	UFC/cm ²

Tabela 6 – Sorovares de *Listeria* spp. identificados em amostras obtidas de diferentes setores de plantas de processamento e no filé embalado de três frigoríficos de peixes localizados no Paraná, Brasil.

Espécie	Sorovar	Origem
<i>L. innocua</i>	6b	piso (evisceração)
<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	caixa plástica (<i>toilet</i>)
<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	mão de manipulador (<i>toilet</i>)
<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	faca (<i>toilet</i>)
<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	filé de tilápia embalado

4 CONCLUSÃO

Os principais pontos de contaminação por microrganismos aeróbios mesófilos e coliformes totais foram facas, alicates, pisos, ralos e mãos de manipuladores.

As contagens de aeróbios mesófilos e coliformes totais no peixe antes do abate, o seu aumento no filé durante o processamento e no filé embalado indicam incorporação microrganismos durante o processamento.

O isolamento de *Listeria monocytogenes* em diferentes pontos da planta de processamento e do produto final sugere risco à saúde do consumidor e indica a necessidade de legislação própria para este microrganismo no pescado.

A ausência de *Salmonella* spp. e estafilococos coagulase positiva assim como as médias das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes totais e ausência de *E. coli* no filé sugerem qualidade microbiológica satisfatória, mas dependendo das condições de estocagem, transporte e comercialização poderá ocorrer diminuição na qualidade e comprometimento da vida de prateleira do produto final.

5 REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira De Normas Técnicas. NBR 10203: **Preparo da amostra para exame microbiológico**. Rio de Janeiro, mar. 1998.

ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 35, p. 183-189, abr. 2003.

AL-MOHIZEA, I. S.; MASHHADI, A. S.; FAWWAL, A.; AL-SHALHAT, A. Microbiological and shelf life assessment of chilled eviscerated whole chicken broilers in Saudi Arabia. **British Poultry Science**, Londres, Inglaterra, v. 35, n. 4, p. 519-526, 1994.

AUBOURG, S. P.; QUITRAL, V.; LARRAIN, M. A.; RODRÍGUEZ, A.; GÓMEZ, J.; MAIER, L.; VINAGRE, J. Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage. **Food Chemistry**, Londres, Inglaterra, v. 104, n. 1, p. 369-375, jan. 2007.

AUTIO, T.; HIELM, S.; MIETTINEN, M.; SJÖBERG, A.; AARNISALO, K.; BJÖRKROTH, J.; MATTILA-SANDHOLM, T.; KORKEALA, H. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, EUA, v. 65, n. 1, p. 150-155, jan. 1999.

BARROS, M. A. F.; BELOTI, V.; HAGA, M. M.; CAVALETTI, L.; D'OVÍDIO, L.; MONTEIRO, F. A.; NERO, L. A. *Listeria* spp. ocorrência em equipamentos e ambientes de processamento de carne bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, Paraná, v. 25, n. 4, p. 341-348, out./dez. 2004.

BARROS, Márcia de Aguiar Ferreira. ***Listeria monocytogenes*: ocorrência na carne bovina, identificação dos principais pontos de contaminação em plantas de processamento e relação com a microbiota acompanhante**. 2005. Tese em Ciência Animal - Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

BASTI, A. A.; MISAGHI, A.; SALEHI, T. Z.; KAMKAR, A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. **Food Control**, Guildford, Inglaterra. v. 17, n. 3, p. 183–188, mar. 2006.

BELCHIOR, S. E.; PUCCI, O. H. Controles microbiológicos y puntos de control en una planta elaboradora de filete de merluza para exportación. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, Venezuela, v. 50, n. 2, p. 171-176, jun. 2000.

BIANCHINI, M.; ARIAS, M. L.; HERRERA, C.; ZUÑIGA, C. Incidência de *Listeria monocytogenes* y evaluación de la calidad sanitaria del pescado fresco filetado del Area Metropolitana de San José. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, Venezuela, v. 49, n. 4, p. 358-362, dez. 1999.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M. *et al.* Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, set./out. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº30691 de 29 de março de 1952. Aprova o novo regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 de jul 1952, Seção 1, p.10785. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/riispoa.htm#decreto30691>>. Acesso em: 26 abr. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 40, de 12 de dezembro de 2005. Aprova os Métodos Analíticos, Isolamento e Identificação da *Salmonella* na carne bovina, avicultura e produtos derivados de ovos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 dez 2005. Seção I, p.70.

CANADÁ. Canadian Food Inspection Agency. **Fish Products Standards and Methods Manual**, de 24 de junho de 2005. Disponível em: <http://www.inspection.gc.ca/english/anima/fispoi/manman/manindexe.shtml>. Acesso em: 29 nov. 2007.

CHIARINI, Eb. **Listeria monocytogenes em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação**. 2007. Tese em Ciência dos Alimentos - Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHYTIRI, S.; CHOULIARA, I.; SAVVADIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. **Food Microbiology**, Inglaterra, v. 21, n. 2, p. 157-165, abr. 2004.

DAVIES, A. R.; CAPELL, C.; JEHANNO, D.; NYCHAS, G. J. E.; KIRBY, R.M. Incidence of foodborne pathogens on European fish. **Food Control**, Guildford, Inglaterra, v. 12, n. 2, p. 67-71, mar. 2001.

de CURTIS, M. L.; FRANCESCHINI, O.; DE CASTRO, N. *Listeria monocytogenes* em vegetables minimally processed. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, Venezuela, v. 52, n. 3, p. 282-288, 2002.

DOUMITH, M.; CAZALET, C.; SIMOES, N.; FRANGEUL, L.; JACQUEL, C.; KUNST, F.; MARTIN, P.; COSSART, P.; GLASER, P.; BUCHRIESER, C. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. **Infection and Immunity**, Washington, EUA, v. 72, n. 2, p. 1072-1083, fev, 2004.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, Paris, França, v. 2, n. 13, p. 1651-1660, nov. 2000.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species of the 21st century. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 50., 2000, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: 2000. v. 1, p. 3-8.

FONNESBECH VOGEL, B.; HUSS, H. H.; OJENIYI, B.; AHRENS, P.; GRAM, L. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, EUA, v. 67, n. 6, p. 2586-2595, jun., 2001.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu. 1996. 182p.

GIANFRANCESCHI, M.; GATTUSO, A.; TARTARO, S.; AURELI, P. Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990 and 1999: serotype distribution in food, environmental and clinical samples. **European Journal of Epidemiology**, v. 18, n. 10, p. 1001-1006, 2003.

GILL, C. O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A; BOARD, R. **The Microbiology of Meat and Poultry**, London: ed. Blackie Academic and Professional, p. 118-157, 1998.

GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 121-137, nov. 1996.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M. L.; GUSTAVSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A.-M.; NICLASEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, Inglaterra, v. 21. n. 2, p. 217-225, abr. 2004.

GUDMUNDSDÓTTIR, S; GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; LAUZON, H. L.; EINARSSON, H.; KRISTINSSON, K. G.; KRISTJÁNSSON, M. Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 41-51, maio 2005.

HERRERA, F. C.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCIA-LÓPEZ, M. L. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, Inglaterra, v. 100, n. 3, p. 527-536, mar. 2006.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, Inglaterra, v. 6, n. 1, p. 9-18, jan. 1995.

HUSS, H. H. **Assurance of seafood quality**. FAO Fisheries technical paper. Nº334, Roma, FAO. 1993. 169p.

HUSS, H. H. **Quality and quality changes in fresh fish**. FAO Fisheries technical paper nº 348, Roma, 1995.

IBAMA – instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis.
Estatística da pesca 2004: Brasil – grandes regiões e unidades da federação.
 Tamandaré: IBAMA, 2005.

IIDA, T.; KANZAKI, M.; NAKAMA, A.; KOKUBO, Y.; MARUYAMA, T.; KANEUCHI, C.
 Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. **Journal
 Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 12, p. 1341-1343, dez. 1998.

JACKSON, T. C.; ACUFF, G. R.; DICKSON, J. S. **Meat, Poultry and Seafood**. In.
 DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTEVILLE, L. Food Microbiology, 1997. p. 83-
 99.

JACQUET, C.; GOUIN, E.; JEANNEL, D.; COSSART, P.; ROCOURT, R. Expression
 of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O on *Listeria monocytogenes* of Human and Food
 Origin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, EUA, v. 68, n. 2, p.
 616-622, fev. 2002.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6ed. Aspen Publishers. 2000. 635p.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F.
 Kubitza, 2000.

LATORRE, L.; PARISI, A.; FRACCALVIERI, R.; NORMANNO, G.; LA PORTA, M C N;
 GOFFREDO, E.; PALAZZO, L.; SANTAGADA, G. Low prevalence of *Listeria
 monocytogenes* in foods from Italy. **Journal of Food Protection**, Iowa, EUA, v. 70,
 n. 6, p. 1507-1512, jun. 2007.

MEDRALA, D.; DABROWSKI, W.; CZEKAJŁO-KOŁODZIEJ, U.; DACZKOWSKA-
 KOZON, E.; KORONKIEWICZ, A.; AUGUSTYNOWICZ, E.; MANZANO, M. The
 possible effect of a sanitization program on intraspecies differentiation of *Listeria
 monocytogenes* strains isolated from a fish processing plant. **International Journal
 of Hygiene and Environmental Health**, Alemanha, v. 206, n. 6, p. 583-590, jan.
 2003.

MORALES, G.; BLANCO, L.; ARIAS, M. L.; CHAVES, C. Evaluación de la calidad
 bacteriológica de tilápia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de La Zona Norte
 de Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, Venezuela, v.
 54, n. 4, p. 433-437, 2004.

ÓLAFSDÓTTIR, E.; MARTINSDÓTTIR, E.; OEHLENSCHLÄGER, J.; DALGAARD,
 P.; JENSEN, B.; UNDELAND, I.; MACKIE, I. M.; HENEHAN, G.; NIELSEN, J.;
 NILSEN, H. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. **Trends in
 Food Science and Technology**, Guildford, Inglaterra, v. 8, n. 8, p. 258-265, ago.
 1997.

PERRIN, M.; BERNER, M.; DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua*
 bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, EUA, v. 41, n. 11, p.
 5308-5309, nov. 2003.

PILARSKI, F.; TOMAZELLI JUNIOR, O.; CASACA, J. Consórcio suíno-peixe:
 aspectos ambientais e qualidade do pescado. **Revista Brasileira de Zootecnia**,
 Minas Gerais, v. 33, n. 2, p. 267-276, mar./abr. 2004.

POPMA, T. e MASSER, M. **Tilapia**: life history and biology. Southern Regional Aquaculture Center. Nº283, mar. 1999.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 5.ed. The McGraw-Hill Companies, 2002.

RØRVIK, L. M.; CAUGANT, D. A.; YNDESTAD, M. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 19-27, mar. 1995.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, Inglaterra, v. 118, n. 12, p. 1565-1568, dez. 2007.

SLADE, P. J. Monitoring *Listeria* in the food production environment. Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. **Food Research International**, Barking, Inglaterra, v. 25, n. 1, p. 45-56, jan. 1992.

TEMELLI, S.; DOKUZLU, C.; SEN, M. K. C. Determination of microbiological contamination sources during frozen snail processing stages. **Food Control**, Inglaterra, v. 17, n. 1, p. 22-29, jan. 2006.

União Européia. Regulamento da Comissão nº 2073/2005, de 15 de novembro de 2005. Relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:PT:PDF>. Acesso em: 23 jan. 2008.

VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 349-356, fev. 2004.