

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

**EFEITO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SUBSTÂNCIA PRODUZIDA POR**  
***Bacillus amyloliquefaciens* NO CONTROLE DA MICROBIOTA DO MEXILHÃO**  
***Perna perna* (Linnaeus, 1758)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Cleide Rosana Vieira Batista, PhD

**KARINE MARIE ARASAKI**

**FLORIANÓPOLIS**

**2002**

*Para meus pais, Tadao e Yara e  
meus irmãos, Tadashi e Hiroshi*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Cleide Rosana Vieira Batista, pelo seu esforço e confiança que me estimularam a ir em busca do conhecimento e por sua amizade e apoio ao longo de todo o percurso.

Ao professor Jaime Fernando Ferreira, que gentilmente cedeu as amostras para a realização deste estudo.

Aos colegas de mestrado Luiz Ivan Souto e Denys Schulz, aos bolsistas Rodrigo Boff Costa e Raphaela Negro e ao técnico Gelso Panho, companheiros de muitas horas, nas quais aprendemos, trabalhamos e rimos, horas essas que serão lembradas sempre com muito carinho, pela dedicação, amizade e incentivo.

As amigas do laboratório de microbiologia II, Eliane Bressa Dalcin, Micheline Sandra Ramella e Sandra Denise Camargo Mendes, pelo apoio, incentivo e amizade que muito me ajudaram durante todo o percurso.

Aos amigos Rodrigo Giovanni, Melissa dos Santos, Deisy Drunkler e Luciana Garcia, pela companhia, paciência, dedicação e pelos conselhos que com certeza foram e serão muito úteis.

Aos amigos Carolina Ximenes de Macedo e Rodrigo Cordeiro Mazzoleni, que mesmo de longe iluminaram com sua alegria e confiança todo esse período.

Aos secretários Sérgio de Souza e Maria Inês Nava de Azevedo, pelo auxílio em todos os trâmites de secretaria

Ao professor Paulo Ogliari, pela orientação na parte estatística.

Ao povo brasileiro que, através da CNPq, financiou este trabalho.

À Deus por me acompanhar e iluminar, não só durante essa etapa, como também ao longo da minha vida.

À todos aqueles que de alguma forma fizeram parte deste caminho em busca da realização de mais esta etapa, muito obrigada.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b>	viii
<b>RESUMO</b>	ix
<b>ABSTRACT</b>	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
2.1 Os moluscos bivalves e a saúde pública	4
2.2 Substâncias antimicrobianas	8
2.3 Gênero <i>Bacillus</i>	14
2.4 Gênero <i>Listeria</i>	15
2.5 Histamina e bactérias produtoras	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.1 Mexilhões	20
3.2 Microrganismos	20
3.3 Meios de cultura	20
3.4 Métodos	21
3.4.1 Preparo do extrato do <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	21
3.4.2 Preparação das amostras de mexilhão	23
3.4.3 Avaliação microbiológica inicial e isolamento de bactérias presentes no mexilhão	23
3.4.4 Verificação, <i>in vitro</i> , da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota isolada do mexilhão	24
3.4.5 Identificação das bactérias sensíveis a substância antimicrobiana	25
3.4.6 Verificação, <i>in vivo</i> , da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota do mexilhão mantido sob temperatura de refrigeração	25
	27

3.4.7 Verificação da produção de histamina pelas bactérias inibidas pela substância antimicrobiana_____	
3.4.8 Análise estatística dos dados_____	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO_____</b>	<b>29</b>
4.1 Avaliação microbiológica inicial e isolamento de bactérias presentes no mexilhão_____	29
4.2 Verificação, <i>in vitro</i> , da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota isolada do mexilhão_____	30
4.3 Identificação das bactérias sensíveis à substância antimicrobiana_____	31
4.4 Verificação, <i>in vivo</i> , da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota do mexilhão mantido sob temperatura de refrigeração_____	33
4.5 Verificação da produção de histamina pelas bactérias inibidas pela substância antimicrobiana_____	46
4.6 Trabalhos futuros_____	50
<b>5. CONCLUSÕES_____</b>	<b>51</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS_____</b>	<b>52</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Conceito da doença de histaminose induzida por alimentos_____	18
Figura 2:	Procedimento para a extração da substância antimicrobiana produzida por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ._____	22
Figura 3:	Procedimento de análise para contagem de microrganismos psicrotróficos_____	24
Figura 4:	Metodologia utilizada para a verificação da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota do mexilhão mantido sob temperatura de refrigeração_____	26
Figura 5:	Resultados da primeira coleta referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões parcialmente eviscerados os quais foram tratados com 100% e 50% de extrato de <i>B. amyloliquefaciens</i> e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias_____	34
Figura 6:	Resultados da primeira coleta referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões inteiros, os quais foram tratados com 100% de extrato de <i>B. amyloliquefaciens</i> e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias_____	35
Figura 7:	Comparação dos controles, mexilhões parcialmente eviscerado e inteiro, referente a primeira coleta_____	37
Figura 8:	Resultados da segunda coleta, referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões parcialmente eviscerados os quais foram tratados com 100% e 50% de extrato de <i>B. amyloliquefaciens</i> e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias_____	38
Figura 9:	Resultados da segunda coleta, referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões inteiros, os quais foram tratados com 100% de extrato de <i>B. amyloliquefaciens</i> e mantidos sob temperatura de	

refrigeração por sete dias_____	39
Figura 10: Comparação dos controles, mexilhões parcialmente eviscerado e inteiro, referente a segunda coleta_____	39
Figura 11: Resultados da terceira coleta, referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões parcialmente eviscerados os quais foram tratados com 100% e 50% de extrato de <i>B. amyloliquefaciens</i> e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias_____	40
Figura 12: Resultados da terceira coleta, referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões inteiros, os quais foram tratados com 100% de extrato de <i>B. amyloliquefaciens</i> e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias_____	41
Figura 13: Comparação dos controles, mexilhões parcialmente eviscerado e inteiro, referente a terceira coleta_____	41
Figura 14: Resultados para as três coletas, referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões parcialmente eviscerados os quais foram tratados com 100% e 50% de extrato de <i>B. amyloliquefaciens</i> e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias_____	42
Figura 15: Resultados para as três coletas, referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões inteiros os quais foram tratados com 100% de extrato de <i>B. amyloliquefaciens</i> e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias_____	43
Figura 16: Colônias que apresentaram alteração da cor do meio, nos testes de decarboxilação da histidina realizados através da metodologia sugerida por Yoshinaga & Frank (1982)_____	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Apresentações clínicas de infecções bacterianas e virais em humanos, causadas por consumo de moluscos contaminados_____	7
Tabela 2:	Produtos metabólicos de bactérias ácido lácticas com propriedades antimicrobianas_____	10
Tabela 3:	Classificação de bacteriocinas de bactérias ácido lácticas_____	11
Tabela 4:	Bacteriocinas vs. Antibióticos_____	13
Tabela 5:	Atividade da substância antimicrobiana produzida por <i>B. amyloliquefaciens</i> sobre as culturas isoladas do mexilhão_____	30
Tabela 6:	Resultados da microscopia e dos testes bioquímicos utilizados na identificação das bactérias isoladas do mexilhão e que apresentaram sensibilidade à substância antimicrobiana produzida por <i>B. amyloliquefaciens</i> _____	32
Tabela 7:	Bactérias sensíveis à substância antimicrobiana, isoladas e identificadas a partir do mexilhão <i>Perna perna</i> _____	33
Tabela 8:	Resultados dos testes de decarboxilação da histidina realizados através da metodologia sugerida por Yoshinaga & Frank (1982)_____	49



## RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se a atividade antimicrobiana de substância produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* sobre a microbiota do mexilhão *Perna perna* cultivado na praia do Sambaqui, na cidade de Florianópolis. Para a realização dos testes de inibição realizaram-se 3 coletas nas quais as amostras de mexilhão foram submetidas inicialmente a Contagem Padrão em Placas para microrganismos psicrotróficos. Para a obtenção do extrato, as culturas estoques de *B. amyloliquefaciens* foram centrifugadas e saturadas. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão fosfato, dialisado e esterilizado por filtração. As bactérias isoladas do mexilhão foram cultivadas sobre placas de TSA onde foram feitos 2 poços de 5mm de diâmetro nos quais adicionou-se 80µL da solução inibidora. Foi observada a formação ou não de halos de inibição ao redor dos poços. Das 39 colônias isoladas, 9 apresentaram halos de inibição e foram identificadas como *Bacillus* sp, *Aerococcus viridians*, *Acinetobacter* spp., *Corynebacterium* spp e *Staphylococcus epidermidis*. Foi possível verificar que a substância produzida por *B. amyloliquefaciens* teve uma discreta ação sobre a microbiota do mexilhão *Perna pena* quando aplicada diretamente na carne do mesmo, apresentando um comportamento bacteriostático. Os gêneros *Bacillus* sp, *Aerococcus viridians*, *Acinetobacter* spp., *Corynebacterium vitarumen*, apresentaram mudança da cor do indicador do meio Niven modificado, sugerindo a formação de compostos alcalinos.

Palavras-chave: *Bacillus amyloliquefaciens*, mexilhão, substância antimicrobiana e histamina

## ABSTRACT

The antimicrobial activity of a substance produced by *Bacillus amyloliquefacens* was evaluated against the *Perna perna* mussel microbial charge in this work. Mussels were farmed at Sambaqui beach facilities in Florianópolis city. Three collects were done for the inhibition assays. Mussels samples were analysed for psicrotrophic microorganisms. The *Bacillus amyloliquefacens* stock culture were centrifugated and saturated for the obtaintion of the extract. After new centrifugation the precipitate was resuspended in phosphate buffer, dialised and sterilized by filtration. The isolated bacteria was cultivated on TSA plates when were done 2 wells of 5mm diameter in which was added 80µl of inhibitory solution. The formation or not of inhibitory halos at border of wells were observed. In the 39 isolated cultures 9 presented sensibility to antimicrobial substance. Was possible to verify that the produced substance by *Bacillus amyloliquefacens* have a discrete action over the *Perna perna* mussel microbotic. When applied direct on the mussel muscle it presented a bacteriostatic behavior. The strains inhibited by the antimicrobial substances were also tested *in vitro*, to investigate their ability in produce histamine.

Palavras-chave: *Bacillus amyloliquefaciens*, mexilhão, substância antimicrobiana e histamina

## 1. INTRODUÇÃO

A relação entre o homem e o mar vem sendo desenvolvida desde o princípio da história. Entretanto, devido ao acesso a novas tecnologias, esta relação está se tornando mais intensa à medida que o ser humano cria condições de determinar seu futuro junto a esse ambiente. Mas para isso, ele depende das ações que realiza no presente. A prática do cultivo de moluscos bivalves é um exemplo disto. Desde que o homem começou a freqüentar as praias ele usou bivalves como alimento. Vestígios do consumo desta fonte proteica podem ser verificados em muitas costas através de sambaquis, onde povos antigos durante muitas gerações, alimentavam-se de moluscos e jogavam suas conchas neste ambiente (STORER *et al.*,1991). Nos últimos anos, as técnicas para uma exploração comercial obtiveram um grande avanço, resultando em um maior controle durante todo o processo de cultivo (MARENZI, 1997).

O cultivo de moluscos bivalves, além de ser uma excelente opção alimentícia, surgiu como uma alternativa de renda para os pescadores artesanais, permitindo o desenvolvimento direto ou indireto de um grande número de empregos e gerando oportunidades a todos os membros da comunidade pesqueira.

Tendo em vista que esta atividade apresenta baixos custos de produção e uma alta rentabilidade, o cultivo de mexilhões vem aumentando a cada dia. No Estado de Santa Catarina, houve uma grande evolução na produção. Em 1991 (apenas dois anos após o início desta atividade no Estado) a produção de mexilhões encontrava-se em torno de 190 toneladas e estava restrita ao litoral da região central do Estado (Florianópolis). Em 1994, este valor subiu para 2500 toneladas e na safra de 1997 a produção atingiu 6397.3 toneladas (ROSA *et al.*, 2000). Na safra de 2000/2001, a produção foi de 11.369 toneladas, envolvendo 1.056 produtores, estes valores adicionados aos da produção de ostras, tem contribuído para transformar o Estado no maior produtor nacional (EPAGRI, 2002).

A mitilicultura é caracterizada como sendo um sistema intensivo de monocultivo semi-integral, não exigindo como em outros cultivos intensivos, laboratórios de incubação. Além de não ser necessário cuidados especiais com a alimentação dos organismos, as larvas podem ser obtidas diretamente da natureza. No Brasil, é na espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758), que estão concentrados a maioria dos estudos e investimentos em cultivos de mitilídeos (MARENZI, 1997).

É possível realizar a colheita do mexilhão em qualquer época do ano, mas é durante os meses de verão que a comercialização é mais intensa. Nesse período há um aumento populacional devido ao fato das zonas produtoras serem também zonas turísticas. Neste caso, normalmente a venda é realizada pelo produtor diretamente ao consumidor ou através de intermediários para mercados, peixarias e restaurantes (ANTONIOLLI, 1999).

Os mexilhões podem ser comercializados “in natura” (na concha) ou desconchados (apenas o “miolo”), nas proporções de 30% a 70%, respectivamente. Do desconchado, metade é vendida à granel e os outros 50% são embalados em sacos plásticos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 2002). Ainda é muito comum a realização do desconchamento nas comunidades pesqueiras. Esta prática artesanal é realizada em locais onde a manipulação é feita sob baixas condições higiênico-sanitárias, normalmente em ranchos com estruturas improvisadas, gerando preocupações com relação a qualidade do produto. Para que o mesmo seja vendido sem riscos ao consumidor, é necessário que todo o beneficiamento seja realizado em infra-estruturas que permitam obter produtos seguros e de qualidade. Nas unidades de beneficiamento, os mexilhões são submetidos a tratamentos térmicos, uso de refrigeração adequada e adição de aditivos, garantindo a qualidade final do produto além de proporcionar o aumento da vida útil do mesmo.

Geralmente os aditivos químicos são empregados para limitar o número de microrganismos capazes de crescer no interior dos alimentos, porém o aumento da informação do consumidor quanto ao risco potencial a saúde associado com essas substâncias tem levado pesquisadores a examinar a possibilidade do uso de bioconservantes, como por exemplo as bacteriocinas (ABEE *et al.*, 1995). O uso destas substâncias em alimentos é sugerido devido à ação das mesmas contra bactérias associadas com a deterioração de alimentos e com doenças alimentares (HANLIN *et al.*, 1993).

Algumas bactérias são uma fonte de peptídeos antimicrobianos, os quais tem sido pesquisados para aplicação em alimentos microbiologicamente seguros. Estas substâncias, denominadas bacteriocinas foram caracterizadas primeiramente em bactérias Gram negativas. As colicinas de *E. coli* são as mais estudadas e constituem um diverso grupo de proteínas antimicrobianas, com atividade letal para bactérias estreitamente relacionadas. Entre os mecanismos de ação estariam a inibição da síntese da parede celular, permeabilização da membrana das células alvo ou inibição da atividade de RNase ou DNase. Entre as bactérias Gram positivas, as bactérias ácido lácticas tem sido exploradas como uma reserva para peptídeos antimicrobianos com aplicação em alimentos (CLEVELAND *et al.*, 2001). Há também bacteriocinas produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus*, que não

atraem tanto atenção como aquelas produzidas pelas bactérias ácido láticas. Diferente destas, que inibem naturalmente bactérias Gram positivas, as bacteriocinas produzidas pelas cepas de *Bacillus* spp. demonstram uma maior diversidade em suas atividades inibitórias (ZHENG & SLAVIK, 1999).

Batista (1993) verificou a produção por *Bacillus amyloliquefaciens* de uma substância com ação inibitória sobre o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*. Como a inibição não ocorreu devido à produção de ácidos ou peróxido de hidrogênio e tampouco à exaustão de nutrientes, o estudo sugeriu a possibilidade de que a substância antimicrobiana fosse uma bacteriocina.

Dados de surtos de doenças alimentares causadas pela ingestão de alimentos marinhos no período de 1988 - 1992 nos Estados Unidos, mostraram que 35% ocorreram devido ao consumo de moluscos contaminados e 51% pela ingestão de peixes, os quais continham com altos níveis de histamina (Scombroid fish poisoning) (HUSS, *et al.* 2000). Casos de intoxicações por histamina ocorrem em função do consumo de peixes (por exemplo, família Scombridae – atuns, bonitos, albacora, entre outros), que contém caracteristicamente altos níveis de histidina livre em seus tecidos musculares. Este aminoácido é decarboxilado por várias espécies diferentes de bactérias, contudo *Morganella mornanii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei*, têm sido normalmente isoladas de peixes envolvidos em envenenamentos por histamina (TAYLOR & SPECKARD, 1983 *apud* BEN-GIGIREY *et al.*, 1999).

A pesquisa apresentada nesta dissertação pretende verificar primeiramente a ação de uma substância antimicrobiana produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*, sobre a microbiota do mexilhão *Perna perna*. Isolar e identificar as bactérias presentes na microbiota do mexilhão que sejam inibidas por essa substância e investigar se as mesmas produzem histamina, são outros objetivos deste trabalho. As análises foram realizadas em mexilhões de cultivo, haja vista a grande importância desta atividade não só pelas oportunidades que ela gera aos membros da comunidade pesqueira, como também devido ao grande consumo destes organismos pela população em geral. Através deste trabalho procurou-se contribuir e instigar o interesse do uso de bioconservantes para controlar a microbiota do mexilhão *Perna perna*, produto de grande importância econômica no Estado de Santa Catarina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Os moluscos bivalves e a saúde pública

Cientificamente a espécie *Perna perna* pertence ao filo Mollusca; classe Bivalvia (LINNAEUS, 1758); ordem Mytiloida (FÉRUSAC, 1822); família Mytilidae (RAFINESQUE, 1815); gênero *Perna* (RETZIUS, 1788) e espécie *Perna* (LINNAEUS, 1758).

O mexilhão *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) habita regiões entre-marés, sendo muito abundante do litoral do Espírito Santo até Santa Catarina (MARENZI, 1997). Por apresentar esta ampla distribuição geográfica, recebe várias denominações populares, como marisco-preto, marisco da pedra, sururu e ostra de pobre. No Estado de Santa Catarina é conhecido popularmente como marisco (ROSA, *et al.* 2000).

Os bivalves constituem a segunda grande classe de moluscos, com aproximadamente 20.000 espécies largamente distribuídas em águas doces e salgadas, sendo mais comuns das linhas de marés até águas rasas. Sua concha de certa forma oval, é um exoesqueleto firme que protege o corpo e fornece pontos de fixação para os músculos (STORER *et al.*, 1991). Essa é composta por duas valvas, que se mantêm unidas com a ajuda de um ou dois músculos adutores (LUDORFF & MEYER, 1978).

A parte do molusco contida no interior da concha é constituída pela massa visceral, pé, brânquias e manto. A massa visceral situada medianamente, fixada dorsalmente, contém os anexos e prolongando-se ventralmente forma o pé. Partindo dorsalmente da massa visceral, o manto forma duas pregas laterais que se ajustam às faces internas das valvas. Entre as dobras do manto e a massa visceral situa-se a cavidade palial contendo em cada lado um par de brânquias laminares. As bordas posteriores do manto formaram duas aberturas denominadas sifões, representados por dois curtos tubos, um ventral ou inalante e outro dorsal ou exalante. Através do primeiro sifão, penetra a água que banha as brânquias para a respiração; o sifão exalante elimina a água, os excrementos, bem como os gametas (MORANDINI, 1978).

O pé do mexilhão tem forma tubular, é móvel e está ligado a um conjunto de músculos. Na base do pé, há um conjunto de glândulas chamadas bissogênicas, que secretam filamentos protéicos de alta resistência - o bisso, responsável pela fixação do animal no substrato (ROSA *et al.*, 2000). O bisso dos animais jovens é bastante frágil, ao contrário do bisso dos adultos, que apresenta extraordinária resistência ao arrancamento. Quanto mais jovem o animal, maior a capacidade de regeneração do bisso (MARQUES, 1998).

As brânquias possuem duas funções principais: a respiração e a seleção de partículas de alimento (ROSA *et al.*, 2000). A adsorção de oxigênio é feita parcialmente pelas brânquias e principalmente pelas membranas existentes em toda a superfície externa do manto. A passagem da água do mar no interior do mexilhão é contínua, a não ser após a retirada deste da água, ocasionando o fechamento das valvas as quais permanecem fortemente cerradas pelo músculo adutor. Neste caso, a taxa metabólica apresenta um nível mínimo, suficiente apenas para a manutenção das funções vitais do organismo, conseqüentemente o mexilhão utiliza apenas o oxigênio dissolvido na água armazenada dentro das valvas. Neste estado, o mexilhão pode sobreviver por um período de tempo bastante variável, geralmente de seis a 20 horas, dependendo da temperatura ambiente, idade e vigor dos animais (MARQUES, 1998).

Quanto à sua biologia reprodutiva, o *Perna perna* caracteriza-se por ser dióico, sendo necessária a abertura das valvas para que se possa diferenciar o sexo. A separação é realizada pela coloração das gônadas, branca leitosa nos machos e vermelha-alaranjada nas fêmeas (ROSA *et al.*, 2000).

A alimentação se baseia em sistema de cílios e muco, onde os cílios laterais dos filamentos branquiais provocam a entrada de água na cavidade do manto. Ao passar pelas brânquias, as partículas de água são aprisionadas no muco e transportadas em filamentos de muco até a base destas e daí através dos palpos labiais até a boca. Os palpos labiais aceitam algumas partículas e rejeitam outras que caem no fundo da cavidade do manto de onde são eliminadas mais tarde como pseudofeces. As partículas remanescentes são levadas até o estômago onde um elaborado conjunto de tratos ciliados de triagem age antes da digestão (STORER *et al.*, 1991). No interior do estômago, encontra-se o estilete cristalino, constituído por enzimas digestivas, atua como auxiliar químico e mecânico na digestão. A parte posterior do estômago está ligada ao intestino, o qual por sua vez encontra-se adjacente ao sifão exalante, por onde são lançadas as fezes (ROSA *et al.*, 2000).

Ao se alimentar pelo bombeamento de grandes quantidades de água através da ação de cílios, os quais filtram partículas microscópicas, ocorre a concentração de plancton, bactérias, vírus, substâncias químicas e outras partículas pequenas no trato digestivo do animal. Os moluscos bivalves possuem uma população microbiana “residente”, que no caso de ostras tem-se observado que oscila entre  $10^4$  a  $10^6$  bactérias/g de tecido (ICMSF, 1985).

A maioria das bactérias associadas aos moluscos bivalves são Gram negativas, entre as quais encontram-se as espécies de *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Vibrio*. Em menor número, os microrganismos Gram positivos são normalmente representados por espécies de *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Micrococcus* (BAUTISTA, 1989; ICMSF, 1985; FRAZIER & WESTHOFF, 1993; ELEMENTOS DE APOIO PARA O SISTEMA APPCC, 2000). Assim sendo, os moluscos atuam como transportadores passivos de microrganismos, que podem ser patógenos ao homem. Este fato é conhecido em nível mundial e constatado através de diversos relatos de doenças causadas devido ao consumo desses bivalves. Os moluscos bivalves são freqüentemente consumidos crus ou ligeiramente cozidos, diretamente da concha ou preparados em pratos de frutos do mar (LISTON *in* ICMSF, 1985). Em ambos os casos todo o animal é consumido, incluindo o trato gastrointestinal e seu conteúdo. Desta forma, os moluscos são potenciais vetores de doenças transmissíveis pela água, sendo que as intoxicações ou infecções podem ter origens distintas: bacteriana, viral, micótica, parasitária, alérgica e indeterminada (BUSSANI, 1990).

Os agentes bacterianos que têm sido associados à doenças produzidas pelo consumo de moluscos em humanos incluem: *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Vibrio spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli*. Em adição, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila* e *Enterobacter spp.*, também têm sido implicadas como possíveis agentes de doenças relacionadas ao consumo de moluscos bivalves (STELMA & MCCABE, 1992; KLONTZ & SCOTT *in* OTWELL *et al.*, 1991; HUSS *et al.*, 2000).

*S. typhi* e *S. paratyphi* são as duas espécies de *Salmonella* mais relacionadas com salmoneloses transmitidas ao homem devido ao consumo de moluscos bivalves (ICMSF, 1985; STELMA & MCCABE, 1992). Esses microrganismos são encontrados no trato intestinal de mamíferos, pássaros, anfíbios e répteis e sua presença em moluscos indica a poluição das orlas litorâneas, onde os mesmos são cultivados (ou capturados) juntamente com dejetos humanos ou de animais (HUSS, 1997; ELEMENTOS DE APOIO PARA O SISTEMA APPCC, 2000). Seu período de incubação,



varia em média de 12 a 24 horas, e os sintomas persistem por três a 14 dias, sendo os mais comuns náusea e vômito, dores abdominais e febre (TRABULSI, 1991; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Pelo menos cinco espécies de *Vibrio* tem sido associados com doenças causadas pelo consumo de moluscos, sendo que *V. parahaemolyticus* e *V. cholera* são os mais comuns (KLONTZ & SCOTT in OTWELL *et al.*, 1991).

Os sintomas de infecções causadas por consumo de moluscos contaminados em humanos podem se apresentar por si mesmas ou em mais de um sintoma clínico (Tabela 1).

**Tabela 1: Apresentações clínicas de infecções bacterianas e virais em humanos, causadas por consumo de moluscos contaminados**

Organismo	Apresentação Clínica		
	Gastroenterite	Hepatite	Septicemia
<b>Salmonella</b>			
<i>S. typhi</i>			xx
<i>S. paratyphi</i>			xx
<b>Vibrio</b>			
<i>V. cholerae</i> 01	Xx		
<i>V. cholerae</i> não 01	Xx		x
<i>V. parahaemolyticus</i>	Xx		x
<i>V. mimicus</i>	Xx		
<i>V. hollisae</i>	Xx		
<i>V. fluvialis</i>	Xx		
<i>V. vulnificus</i>	X		xx
<b>Shigella</b>	Xx		
<b>Campylobacter*</b>	Xx		
<b>Vírus - Hepatite A</b>		xx	
<b>Vírus – Norwalk</b>	Xx		

xx – apresentação mais comum

x – apresentação menos comum

\* papel não bem definido

Fonte: Klontz & Rippey in Otwell *et al.*, 1991

A freqüente descarga de desejos humanos em águas estuarinas, proximidades da costa, lagos e rios e o crescimento constante da população nas cidades litorâneas contribuem com o aumento da preocupação no consumo de moluscos (LISTON *in* ICMSF, 1985). Devido a esses fatos, os moluscos bivalves requerem medidas especiais em relação a um controle sanitário adequado, as quais tem como interesse básico o controle ambiental direto das águas de cultivo (CHICHESTER & GRAHAM, 1973). Além disso, após a captura, cuidados com o manejo, processamento e armazenamento são essenciais no sentido de não se desenvolverem condições para o crescimento bacteriano, garantindo assim, um produto sem riscos a saúde pública.

O fato de alguns gêneros de bactérias que possuem a capacidade de decarboxilação da histidina (*e.g. Vibrio spp., Pseudomonas spp., Bacillus spp. Aeromonas spp. e Acinetobacter spp.*) pertencerem ao grupo de microrganismos contaminantes do mexilhão, gera algumas dúvidas com relação a presença desta toxina nos músculos destes moluscos.

## **2.2 Substâncias antimicrobianas**

A preservação de alimentos tem sido praticada desde tempos antigos onde utilizava-se principalmente o açúcar, o sal, a pimenta, a defumação e a fermentação como métodos de conservação. Atualmente, a preservação depende quase que exclusivamente de conservantes químicos incluindo ácidos orgânicos (p. ex. acético e benzóico), sulfitos, nitritos, antioxidantes, óxidos, etileno e outros (DZIEZAK, 1986; ROBACH, 1980 *apud* MURIANA, 1993).

Ocorrendo naturalmente, agentes antimicrobianos tem potencial benefício na aplicação em alimentos, do ponto de vista de serem “naturais”, podendo o seu uso reduzir o nível de aditivos químicos em alimentos (MURIANA, 1993).

Bacteriocinas são um grupo heterogêneo de proteínas antibacterianas que variam em espectro de atividade, modo de ação, peso molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (DAESCHEL, 1989; ABEE *et al.*, 1995). Elas são produzidas nos ribossomas e são provavelmente inativadas pelas proteases no trato gastrointestinal (HOLZAPFEL *et al.*, 1995).

A nomenclatura empregada para bacteriocinas é inconsistente. Algumas bacteriocinas tem sido nomeadas com base na espécie bacteriana que a produz, por exemplo bacteriocinas de *Listeria* tem sido chamadas de listeriocinas. Algumas vezes o nome do gênero pode ser usado inteiro ou truncado (ECKNER, 1992).

As bactérias ácido lácticas (Lactic Acid Bacteria - LAB) são organismos industrialmente importantes, reconhecidos por sua habilidade fermentativa tão bem como pelos seus benefícios nutricionais e à saúde. Espécies usadas para fermentação de alimentos pertencem aos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Carnobacterium* (DAESCHEL, 1989; ECKNER, 1992; NETTLES & BAREFOOT, 1993). Uma vez usadas para retardar a deterioração e preservar alimentos através de fermentações naturais, elas tem sido usadas em aplicações comerciais como culturas “starters” em indústrias de laticínios e carnes (ABEE *et al.*, 1995). Além disso, também são conhecidas por serem capazes de inibir o crescimento de uma ampla variedade de bactérias (JACK, *et al.*, 1995; STOFFELS, *et al.*, 1992; PILET *et al.*, 1995, CLEVELAND *et al.*, 2001) por meio da produção de vários componentes tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, CO<sub>2</sub>, depleção de nutrientes, e síntese de antibióticos e bacteriocinas (Tabela 2) (DAESCHEL, 1989; NETTLES & BAREFOOT, 1993; MORENO *et al.*, 1999; SAAD *et al.*, 2001).

Embora um dos principais papéis das bactérias ácido lácticas em alimentos fermentados tem sido a preservação desses, suas contribuições ao “flavor”, aroma e textura dos produtos são igualmente desejáveis (ECKNER, 1992; NETTLES & BAREFOOT, 1993). Através da longa história do uso seguro em alimentos, as bactérias ácido lácticas são geralmente conhecidas como seguras (generally-recognized-as-safe GRAS) (MURIANA, 1993; NETTLES & BAREFOOT, 1993).

Vários produtos, especialmente produtos lácteos, o uso da preservação biológica pode também contribuir para o benefício da saúde, por exemplo, os leites fermentados. Tais culturas são consideradas por proporcionar substancial benefício a saúde do homem pelo significativo restabelecimento ou estabilização da microbiota do trato gastrointestinal (FERNANDES *et al.*, *apud* HOLZAPFEL *et al.*, 1995).

As principais classes de bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas incluem: (I) antibióticos, (II) proteínas de baixo peso molecular termo-estáveis, (III) proteínas de alto peso

molecular termo-lábeis e (IV) complexo proteico, nos quais a atividade requer a associação com lipídeos ou carboidratos (Tabela 3) (KLAENHAMMER, 1993).

**Tabela 2: Produtos metabólicos de bactérias ácido lácticas com propriedades antimicrobianas**

<b>Produto</b>	<b>Principal organismo alvo</b>
<b>Ácidos orgânicos</b>	
- ácido láctico	Bactérias deteriorantes e Gram negativas, alguns fungos
- ácido acético	Bactérias deteriorantes, alguns fungos e leveduras
<b>Peróxido de hidrogênio</b>	Organismos patogênicos e deteriorantes, especialmente em alimentos ricos em proteínas
<b>Enzimas</b>	
- sistema lactoperoxidases com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Bactérias patogênicas e deteriorantes (leite e produtos lácteos)
- lisozima	Bactérias Gram positivas indesejáveis
<b>Metabólitos de baixo peso molecular</b>	
- reuterina (3-OH-propionaldeído)	Amplo espectro de bactérias, bolores e leveduras
- diacetil	Bactérias Gram negativa
- ácidos graxos	Diferentes bactérias
<b>Bacteriocinas</b>	
- nisina	Algumas bactérias ácido lácticas e Gram positivas, notavelmente formadoras de esporos
- outras	Bactérias Gram negativas, espectro de inibição de acordo com a cepa produtora e o tipo de bacteriocina

Fonte: Holzapfel *et al.*, 1995

O espectro de ação das bacteriocinas é, por definição, restrito a organismos estritamente relacionados entre si (TAGG *et al.*, 1976; MORENO *et al.*, 1999). Para bactérias ácido lácticas este fato implica em duas desvantagens principais: (a) bacteriocinas produzidas por culturas protetoras podem inibir outras culturas “starters” desejáveis e (b) não são ativas contra bactérias Gram negativas patogênicas e bactérias deteriorantes.

A atividade inibitória destas substâncias é limitada a bactérias Gram positivas e a inibição de Gram negativas por estas bacteriocinas não tem sido demonstrada. Essa diferença pode ser explicada por uma análise e comparação detalhada da composição da parede celular de bactérias Gram positivas e negativas (KLAENHAMMER, 1993; STILES & HASTINGS, 1991 *apud* ABEE *et al.*, 1995; HOLZAPFEL *et al.*, 1995).

**Tabela 3: Classificação de bacteriocinas de bactérias ácido lácticas**

<b>Tipo</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Estabilidade ao calor</b>	<b>Espectro antibacteriano</b>	<b>Exemplo</b>
<b>Lantibióticos</b>	Pequenos (< 5kDa) + e.g. lantionina		Médio a amplo	Nisina
<b>Bacteriocinas peptídicas</b>	Pequenos (< 10 kDa) + não lantionino		Médio a amplo	Pediocina AcH Sakacina A Leucocina UAL 187
<b>Bacteriocinas protéicas</b>	Grandes (> 10 kDa) - não lantionina		Limitado	Helveticina J Caseicina 80
<b>Complexo de bacteriocinas</b>	Porção glicídica e/ou + lipídica		Médio	Leuconocina S Pediocina SJ-1

Fonte: Holzapfel *et al.*, 1995

A ação das bacteriocinas pode ocorrer de diferentes formas promovendo um efeito letal bactericida, sem ou com lise celular (bacteriolítico), ou ainda, inibir a multiplicação microbiana, com efeito bacteriostático (MORENO *et al.*, 1999).

A nisina é uma bacteriocina polipeptídica natural, termo-estável classificada como um lantibiótico (HOLZAPFEL *et al.*, 1995) usada como conservante de alimentos em mais de 50 países (DAESCHEL, 1989; WIRJANTORO *et al.*, 2001). Esta bacteriocina é produzida por muitas cepas de *Lactococcus lactis* e tem sido utilizada como conservante principalmente em indústrias de laticínios, alimentos enlatados e de fermentação de bebidas (JACK *et al.*, 1995; MARTH, 1998; DE VUYST, 1994 *apud* ETTAYEBI, *et al.*, 2000). Seu espectro de atividade é limitado e inclui várias

bactérias Gram positivas e seus esporos, mas não inclui Gram negativas ou fungos e leveduras (DELVES-BROUGHTON *et al.*, 1996 *apud* NATTRESS *et al.*, 2001).

Após a aprovação do uso desta substância em queijo processado pela Food and Drug Administration (FDA), as pesquisas relacionadas com o uso de bacteriocinas como agentes antibacterianos em alimentos receberam um grande estímulo nos Estados Unidos (ZHENG & SLAVIK, 1999). Além disso, a aplicação da nisina para controlar bactérias patogênicas teve aumento com a descoberta dos efeitos inibitórios em vários organismos tais como: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (KRIER *et al.*, 1998; ETTAYEBI *et al.*, 2000).

De um modo geral, a atividade da nisina parece ser direta contra a membrana citoplasmática de bactérias Gram positivas. A região C-terminal da nisina liga-se a membrana citoplasmática de células vegetativas e penetra dentro da membrana formando poros ou canais, os quais permitem um efluxo de substâncias de baixo peso molecular (por exemplo, íons  $K^+$ , aminoácidos e ATP). A perda destas substâncias resulta no colapso do potencial de membrana e causa basicamente a morte celular (NETTLES & BAREFOOT, 1993; MONTIVILLE & CHEN, 1998; MORENO *et al.*, 1999; PERIAGO & MOEZELAAR, 2001).

As bacteriocinas são freqüentemente confundidas na literatura com antibióticos (HANSEN, 1993 *apud* CLEVELAND *et al.*, 2001). Isto pode limitar seu uso em aplicações em alimentos do ponto de vista legal. As principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos encontram-se sumarizadas na tabela 4.

Bacteriocinas podem ser aplicadas em sistemas alimentares de três formas básicas (BLOM *et al.*, 1997; MURIANA, 1993):

- (i) aplicação de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas (por exemplo a nisina) a qual é limitado segundo a solicitação das regulamentações federais para aditivos alimentares;
- (ii) utilização de culturas iniciadoras produtoras de bacteriocinas que são GRAS e apresentam (ou oferecem) um caminho indireto para incorporar bacteriocinas no interior de produtos alimentares. Isto requer que a cultura iniciadora produza quantidades suficientes de bacteriocina durante o processo de fermentação para ser efetivo.

- (iii) Um método alternativo pode ser utilizado, uma cultura em leite pasteurizado como um ingrediente para introduzir funcionalmente flavor e textura bem como propriedades de biocontrole.

**Tabela 4: Bacteriocinas vs. antibióticos**

<b>Características</b>	<b>Bacteriocinas</b>	<b>Antibióticos</b>
<b>Aplicação</b>	Alimentos	Clínica
<b>Síntese</b>	Ribossomal	Metabólitos secundários
<b>Atividade</b>	Espectro limitado	Espectro variado
<b>Imunidade da célula hospedeira</b>	Sim	Não
<b>Mecanismo de resistência ou tolerância da célula alvo</b>	Usualmente afetando a adaptação da composição da membrana celular	Usualmente um determinante geneticamente transferível afetando diferentes locais dependendo do modo de ação
<b>Requerimentos para interação</b>	Às vezes moléculas de ligação	Alvos específicos
<b>Modo de ação</b>	Principalmente formação de poros	Membrana celular ou alvos intracelulares
<b>Toxicidade</b>	Desconhecida	Sim

Fonte: Cleveland *et al.*, 2001

Com o aumento de doenças alimentares causadas por microrganismos psicrotróficos emergentes, o desenvolvimento de novas tecnologias na área de alimentos e a pesquisa dos consumidores por produtos alimentícios naturais, as bacteriocinas e/ou microrganismos produtores tem sido reconhecidos como uma fonte potencial de bioconservantes para alimentos (MORENO *et al.*, 1999). Estes alimentos incluem produtos convencionais e/ou refrigerados parcialmente processados, tais como carnes, pescados, ovos, saladas de vegetais, molhos, sopas e refeições prontas para o consumo (MARTH, 1998).

### 2.3 Gênero *Bacillus*

Os microrganismos desse gênero apresentam células em forma de bastão reto, com dimensões de 0,5 – 2,5 x 1,2 – 10 µm e frequentemente arranjadas em pares ou cadeias, com as pontas arredondadas ou quadradas. São Gram positivos, possuem mobilidade devido a flagelos peritríqueos. Os endosporos são ovais, as vezes redondos ou cilíndricos e muito resistentes a condições adversas. Não existe mais de um esporo por célula e a esporulação não é reprimida pela exposição ao ar. Aeróbios ou anaeróbios facultativos, com comportamento fisiológico muito diversificado no que diz respeito a temperatura, pH e salinidade. Usualmente são catalase positivo. Encontram-se em um amplo alcance de habitats sendo poucas espécies patogênicas a vertebrados ou invertebrados (HOLT *et al.*, 1994).

Várias cepas de *Bacillus* spp. tem sido indicadas por produzir substâncias antibióticas. Muitas estão caracterizadas incompletamente, mas evidentemente algumas são semelhantes a bacteriocinas (TAGG, *et al.*, 1976).

Como as bactérias ácido lácticas, alguns representantes do gênero *Bacillus*, tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis*, são bactérias geralmente conhecidas como seguras (generally-recognized-as-safe GRAS) (SHARP *et al.*, 1989 *apud* ZHENG & SLAVIK, 1999). Entre alguns exemplos de bacteriocinas produzidas por organismos do gênero *Bacillus* encontram-se: megacinas de *B. megaterium*, subtilina e subtilosina A de *B. subtilis* e a substância M-4 amoebicidal de *B. licheniformis* M-4, que apresentam espectro e modo ação conforme o microrganismo que as produzem (ZHENG & SLAVIK, 1999).

As bacteriocinas mais extensivamente estudadas e melhor caracterizadas de *Bacillus* spp. são aquelas produzidas pelo *B. megaterium*. As primeiras informações a respeito dos princípios antibacterianos produzidos por *B. megaterium* cepa 216 foram relatadas por Ivánovics e Alfoldi em 1954 (TAGG, *et al.*, 1976). A partir desta data, diversos trabalhos tem sido realizados visando a caracterização da megacina.

Outra bacteriocina amplamente estudada é a subtilina produzida por *B. subtilis* ATCC 6633, a qual apresenta estrutura e mecanismo de ação semelhantes aos da nisina (KLEIN & ENTIAN, 1994 *apud* BONELLI, 2001).



Novotny e Perry (1992), realizaram a caracterização de 2 bacteriocinas termo-estáveis de *B. thermoleovorans* S-II e NR-9 as quais inibiram vários microrganismos, entre eles *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus faecalis* e outras cepas de *B. thermoleovorans*.

Naclerio *et al.* (1993), identificaram uma proteína com atividade bacteriocida em uma cultura sobrenadante de uma cepa de *B. cereus* isolada de alimento. Essa bacteriocina chamada por eles de cereína, foi ativa contra outras cepas de *B. cereus*.

#### **2.4. Gênero *Listeria***

Segundo o Manual Bergey's de 1994 (Holt *et al.*, 1994) o gênero *Listeria* possui a forma de pequenos bacilos regulares com dimensões de 0,4 – 0,5 x 0,5 - 2µm, bordas arredondadas e às vezes quase cocóides. Podem ocorrer isoladas ou em ou pequenas cadeias e menos freqüentemente em longos filamentos. Apresentam motilidade devido a poucos flagelos peritríqueos quando crescem à 20° - 25°C. São Gram positivas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, não resistentes a ácidos e não encapsuladas. Quando crescem em ágar nutriente apresentam perfil convexo, são translúcidas e inteiras, de coloração cinza-azulada sob iluminação normal e com característico brilho verde-azulado sob iluminação oblíqua. São catalase positivas e oxidase negativas. A temperatura ótima para o crescimento (mas não para motilidade) é 30° - 37°C. O gênero *Listeria* é composto por sete espécies: *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. evanovii*, *L. murrayi*, *L. suligeri* e *L. welchimeri* (HOLT *et al.*, 1994)

A *Listeria monocytogenes* encontra-se amplamente distribuída na natureza e pode ser isolada do solo, vegetação, água, esgotos e animais (TRABULSI, 1991; JUNEJA & DAVIDSON, 1993). É o agente causador de listeriose, uma doença que ocorre tanto em homens quanto em animais. Nestes, as infecções causadas por *Listeria* freqüentemente resultam em encefalite, aborto e mastite (SEELIGER, 1961 *apud* PAPAGEORGIOU *et al.*, 1996). No homem, a doença normalmente é transmitida através da ingestão de alimentos contaminados, causando a infecção do epitélio gastrointestinal e de outras células (DALLAS, 1996).

Os sintomas no início da doença assemelham-se aos da gripe, acompanhado de diarréia e febre moderada (FRANCO & LANDGRAF, 1996), podendo em casos mais severos, causar meningite,

encefalite e septicemia (DUFFES *et al.*, 1999). Fazem parte do grupo de alto risco gestantes, recém-nascidos, pacientes com doenças crônicas (câncer, AIDS, diabetes), idosos (acima dos 65 anos) e outros indivíduos imunocomprometidos (PAPAGEORGIOU *et al.*, 1996; DE MARTINS *et al.*, 2001). Casos de mortes em adultos sadios são raros, mas podem ocorrer em pessoas pertencentes ao grupo de alto risco apresentando uma taxa de 30% de mortalidade (FRANCO & LANDGRAF, 1996; PAPAGEORGIOU *et al.*, 1996; DUFFES, 1999).

No início de 1960, o leite e produtos lácteos eram suspeitos de serem os possíveis veículos de listeriose em humanos nos países da Europa, mas pouca informação da presença e do comportamento de *Listeria monocytogenes* no leite e em seus produtos estava disponível na literatura naquela época (PAPAGEORGIOU *et al.*, 1996). Na década de 80, houve um rápido aumento nos casos de listeriose em humanos (GOFF *et al.*, 1996), instigando pesquisadores a determinar a incidência e o comportamento de *Listeria monocytogenes* não só em leite e seus derivados, como também em outros alimentos. Os veículos de listeriose mais comuns tem sido produtos cárneos (MING, *et al.*, 1997), leites e produtos lácteos (PAPAGEORGIOU *et al.*, 1996), peixes (PILET *et al.*, 1995; NILSSON, *et al.*, 1999) e vegetais (BEUCHAT, 1996).

Para prevenir epidemias de *Listeria* a U.S. Food and Drug Administration (FDA), estabeleceu “tolerância zero” em alimentos prontos para o consumo, contudo a norma Européia recomenda diferentes níveis, dependendo do produto (DUFFES *et al.*, 1999).

A ênfase atual de muitos pesquisadores de bacteriocinas tem sido a inibição de *L. monocytogenes* devido a tolerância estabelecida para este microrganismo, a alta taxa de mortalidade e a ocorrência em diferentes produtos (MURIANA, 1996).

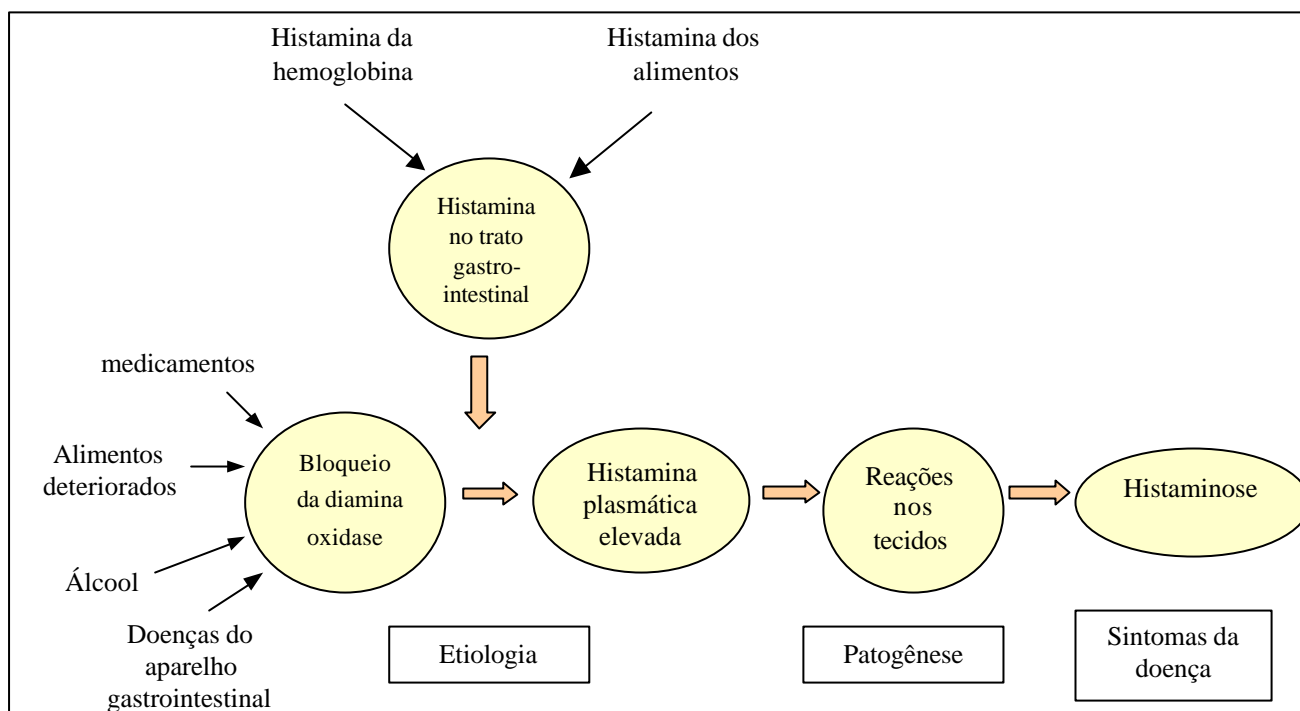
## **2.5 Histamina e bactérias produtoras**

O interesse científico em aminas biogênicas têm crescido consideravelmente nos últimos anos, principalmente nos campos de alimentação e medicina (ZEE *et al.*, 1983), em função de inúmeras ocorrências de intoxicações alimentares causadas pela ingestão de alimentos marinhos que continham altos níveis destas aminas como: histamina, putrescina e cadaverina (MIDDLEBROOKS, *et al.*, 1988).

Em alimentos, as aminas biogênicas podem ser formadas como um resultado da decarboxilação de aminoácidos. A taxa de decarboxilação de aminoácido é dependente de vários fatores como disponibilidade de aminoácidos livres, presença de microrganismos capazes de realizar a decarboxilação e condições ambientais adequadas para o crescimento bacteriano e para a produção de enzimas (SHALABY, 1996).

O envenenamento por histamina é uma intoxicação alimentar química causada pelo consumo de alimentos contendo níveis tóxicos de histamina (BEN-GIGIREY *et al.*, 1999). Esta é formada pela decarboxilação microbiana da histidina (SANTOS, 1996; RAWLES & FLICK, 1996; LEHANE & OLLEY, 2000; KIM *et al.*, 2001), um aminoácido que é abundante principalmente no músculo de peixes escombroides (YOSHINAGA & FRANK, 1982; BARANOWSKI *et al.*, 1990; WEI *et al.*, 1990; VIDAL-CAROU *et al.*, 1990; HALÁSZ *et al.*, 1994; BARBOSA *et al.*, 1995; SHALABY, 1996; HERNÁNDEZ-HERRERO *et al.*, 1999). A família *Scombridae* inclui atuns, bonitos e cavalas. Embora a maior parte dos surtos estejam relacionados com o consumo de peixes desta família, intoxicações por histamina também podem ocorrer pelo consumo de peixes pertencentes as famílias *Pomatomidae*, *Coryphaenidae*, *Carangidae*, *Clupeidae* e *Engraulidae* (TAYLOR, 1986 in HWANG *et al.*, 1995; BEN-GIGIREY *et al.*, 1999; LEHANE & OLLEY, 2000).

O envenenamento por histamina (ou “scombroid poisoning” - envenenamento por peixe escombride) causa uma variedade de sintomas tais como: sintomas gastrointestinais (náusea, vômito, diarreia), cutâneos (erupções, urticária, edema), neurológicos (enxaquecas, formigamentos) e hipotensão (NIVEN *et al.*, 1981; TAYLOR & SUMMER, 1986; INGLIS *et al.*, 1993; ZEE *et al.*, 1983; HALÁSZ *et al.*, 1994; FWU HWANG, *et al.*, 1995; HUSS, 1997; LEHANE & OLLEY, 2000). O grau de intoxicação e os sintomas são muito variáveis, pois dependem diretamente da dose de histamina ingerida e da susceptibilidade de cada indivíduo (MIDDLEBROOKS *et al.*, 1988). O corpo humano pode tolerar uma determinada quantidade de histamina sem que haja reação. A histamina ingerida será eliminada no trato intestinal por pelo menos, duas enzimas: a diamina oxidase (DAO) e a histamina N-metiltransferase (HMT) (TAYLOR & SUMMER, 1986). Mas este mecanismo de proteção pode ser eliminado se a ingestão de histamina e/ou outras aminas biogênicas for muito elevada ou ainda se as enzimas forem bloqueadas por outros compostos (Figura 1).



**Figura 1: Conceito da doença de histaminose induzida por alimentos (Fonte: HUSS, 1997).**

A diversidade das bactérias que possuem atividade decarboxilase-positiva observadas em peixes escombroides pode ser atribuída ao tipo do fruto do mar, diferenças entre espécies de peixes e as condições de tempo e temperatura de armazenamento (YOSHINAGA & FRANK, 1982). Em adição, fatores que incluem os hábitos alimentares do peixe, localização geográfica, estação do ano, temperatura da água, salinidade, qualidade da água onde foi capturado e a forma que este pescado foi manuseado e armazenado são fatores importantes para se determinar a composição e o tipo de bactéria formadora de histamina presente na microbiota do peixe (SUBBURAJ *et al.*, 1984 in LÓPEZ-SABATER *et al.*, 1996).

Algumas bactérias são capazes de produzir perigosas quantidades de histamina em curtos períodos de tempo quando o peixe é mantido sob condições insatisfatórias de armazenamento entre elas encontram-se: *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Hafnia alvei*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Proteus vulgaris*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus*, *Acinetobacter* spp., *Salmonella* e *Shigella* (TAYLOR *et al.*, 1978; INGLIS *et al.*, 1993; TAYLOR, 1986 in HWANG *et al.*, 1995; LÓPEZ-SABATER *et al.*, 1996; SANTOS, 1996; RAWLES & FLICK, 1996; BEN-GIGIREY *et al.*, 1999; LEHANE & OLLEY, 2000; KIM *et al.*, 2001).

Estes microrganismos produtores podem ser parte da população associada com o alimento ou podem ser introduzidos por contaminação antes, durante ou após o processamento do alimento (BOVER-CID *et al.*, 2001). Assim, a presença de quantidades significativas de histamina, é uma prova evidente da decomposição de pescados e seus derivados, haja vista que em produtos marinhos frescos, adequadamente armazenados e refrigerados, encontram-se somente quantidades traços deste composto (SIKORSKI *et al.*, 1990).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Mexilhões**

Os mexilhões com tamanho comercial (acima de 6 cm) foram obtidos no cultivo da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado na praia do Sambaqui, Florianópolis, SC. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo seco até chegarem ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC. O tempo entre a coleta da amostra e o início das análises não ultrapassou 3 horas. Foram realizadas duas coletas no mês de outubro e uma em novembro de 2002 sendo coletados um total de 15 Kg de mexilhões.

#### **3.2 Microrganismos**

Neste estudo utilizou-se *Bacillus amyloliquefaciens* isolado por Batista (1993) e, *Listeria monocytogenes* NCTC 098630 como microrganismo indicador para a realização dos testes de atividade antimicrobiana. *Proteus vulgaris* ATCC 13315 foi usado como controle positivo para os testes de formação de histamina.

Foram preparadas culturas à partir de colônias isoladas de cada linhagem por repicagem para Agar inclinado de Triptona de Soja (TSA) suplementado com 0,6% de Extrato de Levedura (TSA – YE). Após incubação por 24 horas a 35°C, estas culturas foram armazenadas a aproximadamente 4°C para serem utilizadas como culturas estoque. A cada dois meses, estas culturas eram examinadas para certificação da sua pureza, através do plaqueamento em Ágar, exame das características coloniais, morfologia, coloração de Gram e reações bioquímicas como catalase e oxidase.

#### **3.3 Meios de cultura**

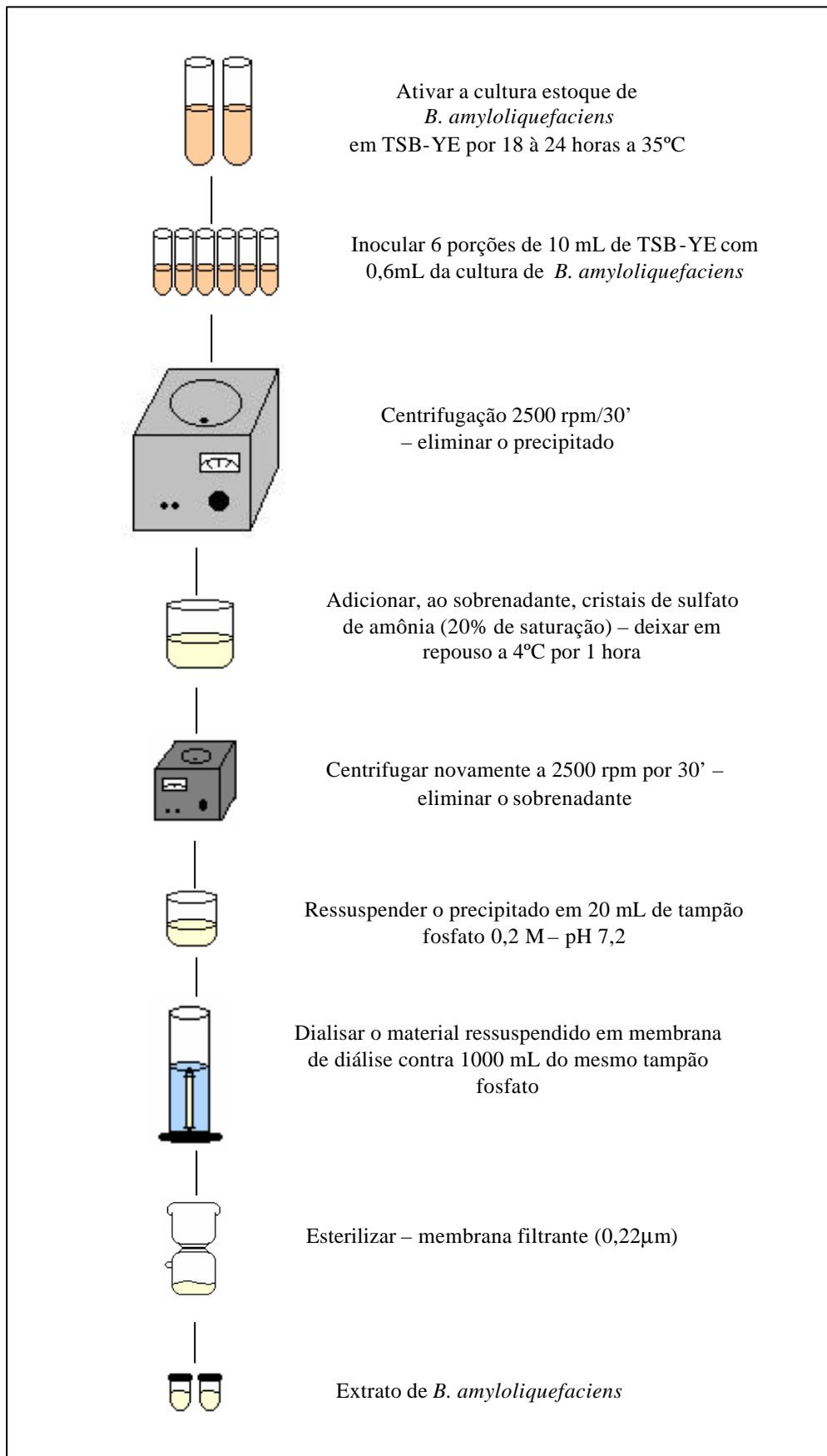
Além dos meios utilizados na rotina do Laboratório de Microbiologia, dois meios foram formulados para determinação de bactérias histidina-decarboxilase, os quais encontram-se descritos no item

3.4.7. Todos os meios de cultura utilizados durante a realização desta pesquisa foram adquiridos da Oxoid.

### 3.4 Métodos

#### 3.4.1 Preparo do extrato do *Bacillus amyloliquefaciens*

Para obtenção do extrato, como pode ser observado na Figura 2, as culturas estoque de *B. amyloliquefaciens* foram ativadas através de incubação a 35°C por 18 à 24 horas, em Caldo Triptona de Soja com Extrato de Levedura (TSB-YE) 0,6%. Em seguida, 60 mL deste caldo foram submetidos à centrifugação a 2.500 rpm durante 30 minutos. Adicionou-se cristais de sulfato de amônio PA (20% de saturação) e uma nova centrifugação a 2.500 rpm durante 30 minutos foi realizada. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi ressuspendido em 20 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2) e dialisado (membrana Spectrum, Spectra PM 3500) com o mesmo tampão, em uma temperatura de 4°C por 24 horas. O produto desta diálise foi esterilizado por filtração, utilizando-se membranas de 0,22 µm (Millipore). (BONELLI, 2001).



**Figura 2: Procedimento para a extração da substância antimicrobiana produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*.**



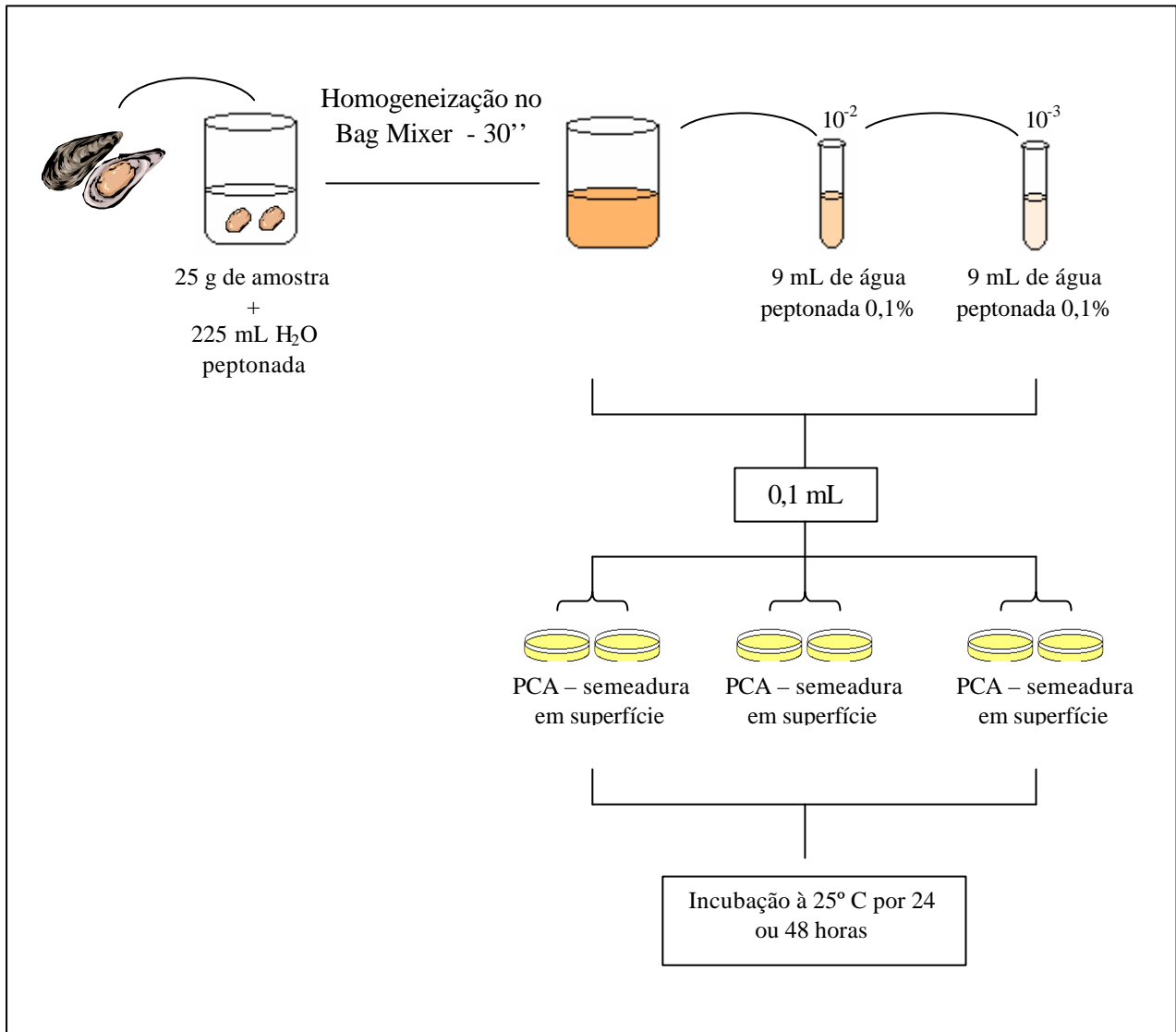
### **3.4.2** Preparação das amostras de mexilhão

Após o recebimento, os mexilhões foram lavados com o auxílio de uma escova sob água potável corrente, para retirar organismos incrustantes (cracas, algas, entre outros) presente nas conchas. Em seguida eles foram colocados em bandejas estéreis para secarem ao ar livre. Para abertura das valvas utilizou-se uma faca estéril. Com o objetivo de verificar se havia diferença da ação da substância sobre a microbiota do mexilhão inteiro ou sobre a microbiota do mexilhão parcialmente eviscerado, dois procedimentos foram realizados: no primeiro, após abertos, coletou-se todo o mexilhão conforme metodologia recomendada pelo APHA (1992) e, no segundo, retirou-se parcialmente as vísceras desconsiderando-se líquido intervalvar. Estes procedimentos foram realizados em todas as amostras coletadas.

### **3.4.3** Avaliação microbiológica inicial e isolamento de bactérias presentes no mexilhão

Para verificar as condições microbiológicas da matéria prima foram realizadas análises de bactérias psicrotróficas (Figura 3), segundo metodologia recomendada pelo APHA (1992), com posterior isolamento das mesmas.

Através destas contagens iniciais (Contagem Padrão em Placa inicial – CPPi), realizadas no dia da coleta dos mexilhões (tempo 0), colônias com características distintas foram selecionadas para que fossem testadas quanto a sua sensibilidade à substância antimicrobiana. As colônias selecionadas foram isoladas através da técnica de esgotamento em superfície, em placas de TSA, suplementado com Extrato de Levedura 0,6% (TSA-YE).



**Figura 3: Procedimento de análise para contagem de microrganismos psicrotróficos.**

### 3.4.4 Verificação, *in vitro*, da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota isolada do mexilhão

As bactérias isoladas foram incubadas a 35°C em um meio de enriquecimento (TSB-YE) durante 24 horas. Diluições decimais até 10<sup>-5</sup> foram preparadas e 0,1mL de cada cultura obtida foi semeada na superfície de uma placa de TSA-YE. Na mesma placa foram feitos 2 poços de aproximadamente 5 mm de diâmetro onde foram depositados 80 µL da substância antimicrobiana. Estas placas permaneciam em temperatura ambiente durante 30 minutos para que ocorresse a difusão da

substância no ágar. Posteriormente as mesmas eram incubadas a 35°C por 24 horas. Foi observada a formação ou não de halos de inibição ao redor destes poços. Durante a realização destes testes utilizou-se *Listeria monocytogenes* como controle positivo. A atividade foi quantificada através do raio do halo formado, ou seja, a medida entre a extremidade do poço perfurado ao limite da região de inibição visualizada (BONELLI, 2001).

### 3.4.5 Identificação das bactérias sensíveis à substância antimicrobiana

Após realizar os testes *in vitro* da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota isolada do mexilhão, foram selecionadas somente aquelas colônias que apresentaram inibição frente a esta substância. Então realizou-se a identificação destas colônias através de técnicas clássicas da microbiologia como coloração de Gram, observação das características microscópicas e coloniais; além de testes bioquímicos como catalase, oxidase, redução de nitrato, manitol, Vogues-Proskauer, O/F, coagulase e DNase. Os testes realizados neste etapa seguiram a chave de identificação descrita por Faddin (1980). As colônias que não apresentaram halos de inibição foram descartadas.

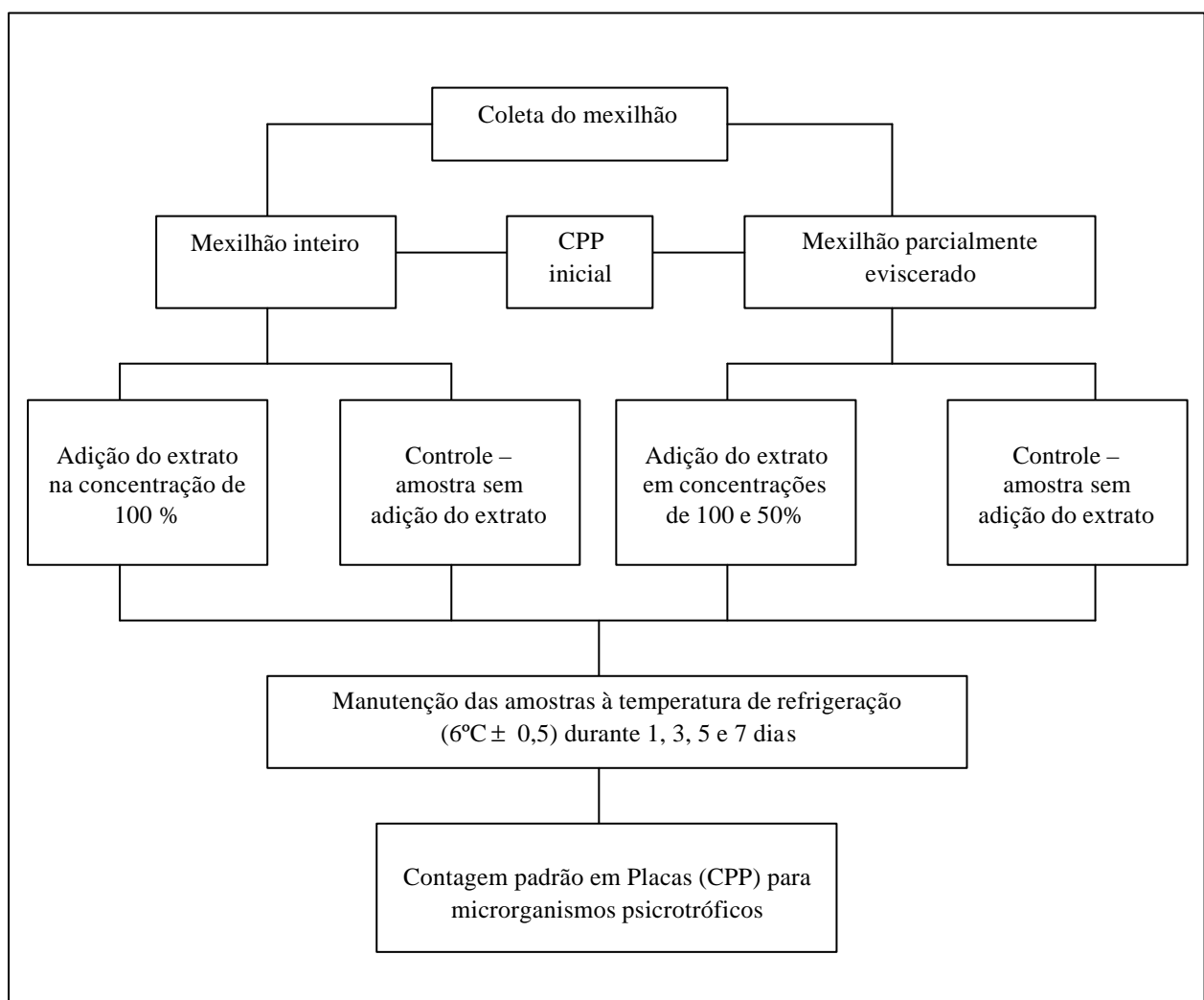
### 3.4.6 Verificação, *in vivo*, da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota do mexilhão mantido sob temperatura de refrigeração

Amostras de mexilhão mantidas a temperatura de refrigeração ( $6^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ ) foram submetidas à Contagem Padrão em Placas – CPP (Figura 3), para microrganismos psicrotópicos antes e depois de tratadas com o extrato da substância produzida pelo *B. amyloliquefaciens* em diferentes concentrações: 100% (extrato não diluído) e 50% (extrato diluído em água destilada esterilizada – 1:2). Nos testes realizados com o mexilhão inteiro utilizou-se apenas a concentração de 100% de extrato da substância antimicrobiana. A quantidade de substância antimicrobiana utilizada foi de 1 mL para cada 10 gramas de mexilhão (proporção de 1:10).

As unidades amostrais foram constituídas por porções de 10 gramas de mexilhão, separadas em sacos plásticos, identificadas com a concentração da substância, o tipo de amostra (mexilhão inteiro ou parcialmente eviscerado) e o tempo em que deveriam permanecer sob refrigeração. Os períodos

estabelecidos para se verificar a ação da substância sob esta temperatura ao longo do tempo foram 1, 3, 5 e 7 dias (Figura 4). Para cada análise uma unidade amostral contendo 10 gramas de mexilhão foi utilizada como controle.

Após a contagem das colônias obtidas a cada tempo estipulado, avaliou-se o efeito das diferentes concentrações da substância antimicrobiana sobre a microbiota do mexilhão.



**Figura 4: Metodologia utilizada para a verificação da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota do mexilhão mantido sob temperatura de refrigeração.**

### 3.4.7 Verificação da produção de histamina pelas bactérias inibidas pela substância antimicrobiana

A fim de testar a produção de histamina pelas bactérias isoladas do mexilhão que foram inibidas pela substância antimicrobiana produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*, utilizou-se dois métodos: um descrito por Niven *et al.* - chamado meio Niven (1981) e outro por Yoshinaga & Frank - meio Niven modificado (1982).

Inicialmente as bactérias foram reativadas em um meio de enriquecimento (TSB-YE) por 24 horas a 35°C. Posteriormente, diluições decimais (até concentrações de 10<sup>-5</sup>) deste caldo foram realizadas e utilizadas conforme a metodologia sugerida para cada meio.

O meio Niven é composto de 0,5% triptona, 0,5% extrato de levedura, 2,7% de L- histidina · 2HCL, 0,5% NaCL, 0,1% de CaCO<sub>3</sub>, 2,0% ágar e 0,006% de púrpura de bromocresol (pH 5,3). Este meio foi autoclavado por 10 minutos ou menos para evitar a hidrólise excessiva do ágar devido ao baixo pH (NIVEN *et al.*, 1981).

Neste meio, utilizou-se a técnica convencional de semeadura em profundidade e o ágar solidificado foi coberto com cerca de 5 mL do mesmo meio. Placas duplicadas foram incubadas à 25° ou 35°C de 36 à 72 horas e então examinadas para a verificação de colônias púrpuras com halo púrpura em um fundo amarelo.

Yoshinaga & Frank (1982) realizaram algumas modificações no meio descrito por Niven *et al.* (1981) entre elas o ajuste do pH para 6,5 a fim de permitir o crescimento de clostrídios ácido-sensíveis. Este meio é composto por 0,5% triptona, 0,5% extrato de levedura, 2% L – histidina (base livre), 0,5% NaCl, 1,5% de ágar e 0,02% do indicador vermelho de cresol. A atividade de decarboxilação da histidina foi testada para todos os isolados em:

- (i) cultivos em caldo do meio Niven modificado, contendo tubos de Durhan (difere-se do meio, apenas por não ter sido adicionado ágar na sua composição);
- (ii) cultivos em meio Niven modificado através da técnica de semeadura na superfície do ágar e
- (iii) cultivos em meio Niven modificado através de picadas em ágar contendo 0,1% de glucose.

Para a realização do item (i), 1 mL de cada diluição obtida foi transferida para caldos contendo tubos de Durhan. No item (ii), utilizou-se a técnica tradicional de semeadura em superfície. Para o

item (iii) as colônias reativadas em TSB-YE, foram semeadas em superfície de placas de TSA e incubadas à 35° por 24 horas. Então as colônias eram picadas e transferidas para tubos contendo o meio Niven modificado suplementado com 0,1% de glucose. Todos os itens (i, ii e iii) foram incubados à 35°C por 48 horas. Uma dada colônia foi considerada positiva para decarboxilação de histidina se houvesse a formação de gás nos tubos com Durhan ou se o indicador mostrasse um aumento do pH nos tubos ou nas placas (YOSHINAGA & FRANK, 1982).

### 3.4.8 Análise estatística dos dados

Para análise dos resultados da ação da substância antimicrobiana produzida por *B. amyloliquefaciens* sobre a microbiota do mexilhão, para as 3 coletas, utilizou-se o modelo de regressão polinomial executados através dos programas STATISTICA (edição 1998) e SAS PROC GLM versão 6.12 (1996). O modelo de regressão quadrático utilizado para verificar o relacionamento funcional entre o tempo de armazenamento e a ação da substância sobre a microbiota do mexilhão foi o seguinte:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \varepsilon,$$

onde: Y é a variável resposta;  $\beta_0$  é o intercepto,  $\beta_1$  é o coeficiente do termo do efeito linear;  $\beta_2$  é o coeficiente do termo do efeito quadrático; X é o tempo de armazenamento e  $\varepsilon$  é o termo do erro aleatório.

Para saber se havia diferença entre os tratamentos (amostra tratadas x amostras não tratadas com a substância e mexilhão parcialmente eviscerado x mexilhão eviscerado) aplicou-se o teste de hipótese, comparando-se entre eles os termos do modelo (intercepto, coeficiente do termo linear e coeficiente do termo quadrático). O nível de significância foi de 10% devido a grande variabilidade encontrada entre coletas, sendo os fatores ambientais, os principais causadores desta variabilidade.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação microbiológica inicial e isolamento de bactérias presentes no mexilhão

As contagens padrões iniciais para microrganismos psicrótrópicos dos mexilhões provenientes do cultivo localizado na praia do Sambaqui realizadas nos dias das coletas apresentaram valores que ficaram entre  $7,5 \times 10^2$  e  $5,0 \times 10^3$  UFC/g para mexilhões parcialmente eviscerados e  $2,1 \times 10^3$  e  $9,8 \times 10^3$  UFC/g para mexilhões inteiros.

Estas contagens obtidas para o dia da coleta (dia 0), ficaram dentro do limite microbiológico recomendado pelo ICMSF (1986) para moluscos, que estabelece  $5,0 \times 10^5$  UFC/g (contagem de aeróbios totais à 25°C). Indicando assim, que o mexilhão está dentro dos padrões estipulados para o seu consumo. Na legislação brasileira, através da Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001, não há nenhum padrão estipulado para contagem total de microrganismos aeróbios.

Cerutti & Barbosa (1991), avaliaram a qualidade microbiológica de ostras coletadas em 3 pontos da Baía Norte da Ilha de Santa Catarina. As análises de bactérias heterotróficas foram realizadas no organismo inteiro e na massa digestiva. As contagens obtidas para o animal inteiro apresentaram valores que oscilaram de  $1,0 \times 10^3$  a  $1,0 \times 10^6$  UFC/g. Para a massa digestiva as contagens foram superiores a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g. Um dos pontos de coleta (praia de Santo Antônio de Lisboa) do trabalho realizado por Cerutti & Barbosa ficava próximo ao local de onde as amostras utilizadas neste trabalho eram provenientes (praia do Sambaqui). Neste ponto, as contagens para bactérias heterotróficas oscilaram entre  $2,1 \times 10^4$  e  $2,3 \times 10^5$  UFC/g, para análise do corpo inteiro e  $3,5 \times 10^4$  e  $1,5 \times 10^6$  UFC/g para a massa digestiva. Embora o trabalho citado anteriormente tenha sido realizado com amostras de ostras, é possível verificar que as contagens obtidas no dia da coleta nesta pesquisa foram inferiores.

Em um trabalho realizado com espécies de bivalves comuns nas regiões costeiras de Hong Kong, Kueh & Chan (1985) investigaram a presença de bactérias heterotróficas aeróbias nos organismos inteiros de ostras (*Crassostrea gigas*) e de mexilhões (*Perna viridis*). Para ostras também foram realizadas análises em diferentes tecidos: branquias, músculo adutor, fluído do manto, conteúdo estomacal, estilete cristalino e fezes. A contagem de bactérias heterotróficas aeróbias dos diferentes

tecidos da ostra apresentaram valores que oscilaram entre  $10^4$  a  $10^7$  UFC/g, sendo que as contagens obtidas para brânquias, fluído do manto e músculo adutor foram menores do que as obtidas das vísceras. Para mexilhão *Perna viridis*, a contagem foi de  $6,0 \times 10^5$  UFC/g para o organismo inteiro.

Das três coletas realizadas, isolou-se 39 colônias que apresentavam características distintas, as quais foram testadas quanto a sensibilidade a substância antimicrobiana produzida por *B. amyloliquefaciens*.

#### 4.2 Verificação, *in vitro*, da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota isolada do mexilhão

Das 39 colônias isoladas, 9 apresentaram sensibilidade a substância antimicrobiana, sendo que o grau de inibição variou de uma colônia para outra (Tabela 5). As colônias que não apresentaram inibição foram descartadas.

**Tabela 5: Atividade da substância antimicrobiana produzida por *B. amyloliquefaciens* sobre as culturas isoladas do mexilhão**

Cultura Isolada do Mexilhão		Atividade Inibitória
Número	Características	
1	Colônia com 3 mm de raio, brilhante, branca cremosa e borda irregular	+++
8	Colônia com 1,5 mm de diâmetro, cor cinza rosado, brilhante, não muito alta, arredondada	+
9	Colônia com 5 mm de diâmetro, brilhante, amarela, plana.	+++
12	Colônia com 9 mm de diâmetro, branco – creme, opaca.	+
13	Colônia com 2 mm diâmetro, branca, brilhante, pouco convexa	+++
16	Colônia com 7 mm de diâmetro, rosa claro com região central amarela, opaca, elevação central	++
19	Colônia com 1 mm de diâmetro, rosa, brilhante, convexa	+
37	Colônia com 3 mm de diâmetro, creme, brilhante, convexa, borda regular	+
38	Colônia com 5 mm de diâmetro, creme, brilhante, convexa, borda regular	+

Legenda:

+ = halo < 2 mm;

++ = 2 mm > halo < 5 mm;

+++ = halo > 5 mm.



Em estudos realizados por Bonelli (2001) o tamanho do halo de inibição ficou entre 6 e 8mm, quando a atividade inibitória da substância produzida por *B. amyloliquefaciens* foi testada sobre *Listeria monocytogenes*.

Em testes semelhantes realizados por Zheng & Slavik (1999), mostraram que o preparado antibacteriano bruto (extrato) de *Bacillus subtilis* foi efetivo contra as 9 cepas de bactérias Gram positivas e negativas testadas durante a pesquisa apresentando maior atividade contra cepas de *Bacillus* spp., que são estritamente relacionadas com a cepa produtora.

### **4.3 Identificação das bactérias sensíveis à substância antimicrobiana**

As bactérias isoladas que apresentaram sensibilidade à substância antimicrobiana foram submetidas a testes bioquímicos (Tabela 6) para sua identificação, conforme a chave de identificação descrita em Faddin (1980).

Através destes testes, identificou-se *Bacillus* sp., *Acinetobacter* spp, *Aerococcus viridians*, *Corynebacterium vitarumen*, *Corynebacterium amycolatum* e *Staphylococcus epidermidis* (Tabela 7). A colônia 13 não foi identificada, pois não foi possível a sua reativação para realização dos testes.

Como citado na literatura, bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Acinetobacter* são parte da microbiota normalmente encontrada em moluscos bivalves (BAUTISTA, 1989; ICMSF, 1985), além de estarem distribuídos tanto nos solos quanto na água. Estes três gêneros também foram encontrados por Kueh & Chan (1985) em análises realizadas com mexilhões e com ostras, sendo que o *Bacillus* só foi detectado no intestino desta última. Entre outras espécies, Castellvi (1966) também encontrou bactérias do gênero *Acinetobacter* em *Mytilus edulis*, representando cerca de 12% do total de microrganismos detectados.

**Tabela 6: Resultados da microscopia e dos testes bioquímicos utilizados na identificação das bactérias isoladas do mexilhão e que apresentaram sensibilidade à substância antimicrobiana produzida por *B. amyloliquefaciens***

Colônia	Microscopia <sup>1</sup>	Catalase	Oxidase	Nitrato	O/F <sup>2</sup>	15% NaCl	Xilose	Manitol	Coagulase	DNase	VP	VM	Uréia	Motilidade	Trealose	Gelatina	Rafinose	Dulcitol
1	a	+	-	-	O	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
8	b	+	-		F	+	-	-	NR	NR	-	+	+	NR	-	-	+	+
9	c	+	-	+	F	+	NR	+	-	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
12	a	+	-	+	F	+	-	NR	NR	NR	-	+	NR	-	+	-	-	-
13	a	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
16	a	+	-	+	F	+	-	-	NR	NR	-	+	-	-	+	-	-	-
19	c	+	-	+	F	+	NR	-	-	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
37	c	+	-	+	F	+	NR	-	-	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
38	c	+	-	+	F	+	NR	-	-	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NR - Teste não realizado

**1 - microscopia:** a - bastonete Gram positivo

b - bastonete Gram negativo

c - cocos Gram positivo

**2- O/F:** O = oxidativo; F = fermentativo

Espécies de *Aerococcus* estão amplamente distribuídas na natureza, incluindo ambientes marinhos. São conhecidos por causarem uma doença fatal em lagostas chamada “gaffkemia”. Além disso são patógenos oportunistas associados com bacteremia, endocardites e infecções do trato urinário em humanos (CDC, 2002).

*Staphylococcus epidermidis* é um habitante normal da pele e mucosas, sendo encontrado praticamente em todos os indivíduos (TRABULSI, 1991), sua presença nas amostras de mexilhão

pode ser devido há algum tipo de contaminação que pode ter ocorrido durante alguma etapa da análise.

É importante ressaltar que apenas os microrganismos que apresentaram sensibilidade a substância antimicrobiana produzida por *B. amyloliquefaciens* foram identificados, significando que poderíamos ter encontrado outras espécies de bactérias Gram negativas e positivas, uma vez que 39 microrganismos foram isolados.

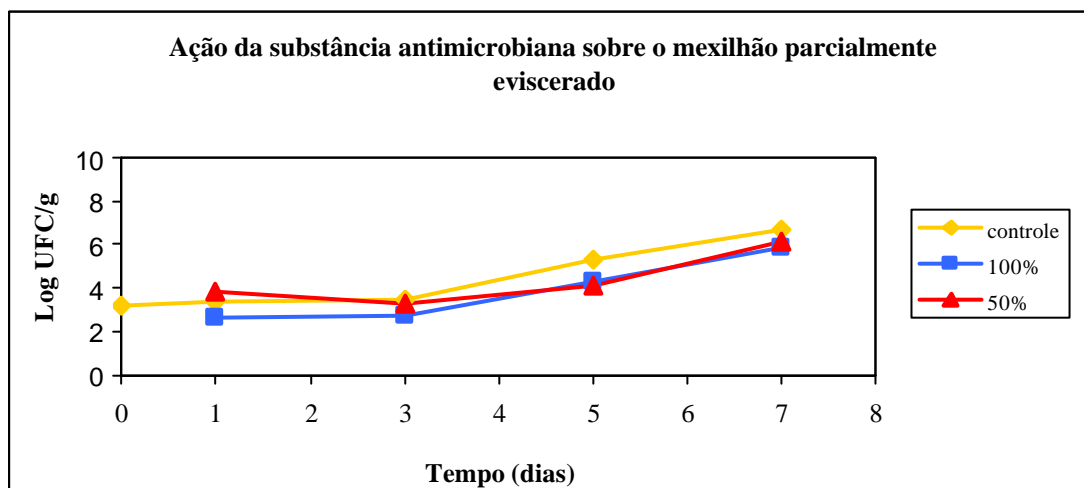
**Tabela 7: Bactérias sensíveis à substância antimicrobiana, isoladas e identificadas a partir do mexilhão *Perna perna***

<b>Colônia</b>	<b>Identificação</b>
1	<i>Bacillus sp.</i>
8	<i>Acinetobacter spp.</i>
9	<i>Aerococcus viridians</i>
12	<i>Corynebacterium vitarumen</i>
13	<i>Não identificada</i>
16	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
19	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
37	<i>Aerococcus viridians</i>
38	<i>Aerococcus viridians</i>

#### **4.4 Verificação, *in vivo*, da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota do mexilhão mantido sob temperatura de refrigeração**

Em testes preliminares com amostras de mexilhões mantidas sob temperatura de refrigeração, verificou-se a ação do extrato contendo a substância antimicrobiana em diferentes concentrações (100%, 75%, 50%, 25%). Além disto, testou-se água destilada esterilizada e tampão fosfato como diluentes. A proporção de extrato utilizado foi 1:30 (1 mL de extrato para 30 g de mexilhão). Após análise dos resultados, observou-se que as concentrações de 75% e 50% apresentaram halos de inibição com o mesmo tamanho e, a 25% não houve inibição. Dessa forma, optou-se por utilizar o extrato a 100% (não diluído) e 50% (diluído em água destilada esterilizada na proporção de 1:2). Além disso, a proporção de extrato foi aumentada para 1:10, isto é, 1 mL de extrato para 10 gramas de mexilhão.

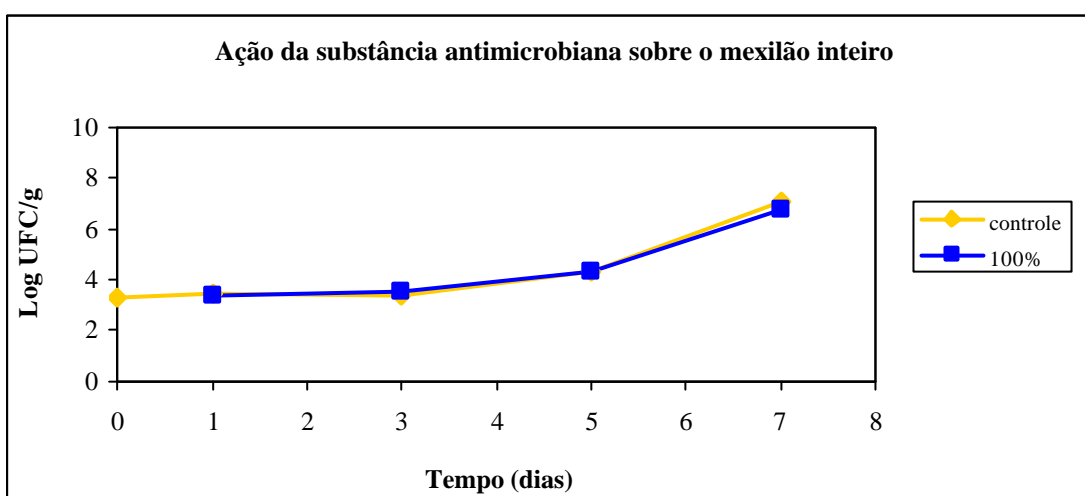
Nos resultados da primeira coleta, a contagem para microrganismos psicrotróficos efetuada com o mexilhão parcialmente eviscerado no dia 0 (dia da coleta) foi de  $1,4 \times 10^3$  UFC/g (Figura 5). Após 1 e 3 dias mantido sob temperatura de refrigeração as contagens ficaram em torno de  $2,3 \times 10^3$  e  $2,8 \times 10^3$  UFC/g, respectivamente. Para o mesmo período, as amostras tratadas com a substância a 100% apresentaram contagens inferiores ( $4,0 \times 10^2$  e  $5,5 \times 10^2$  UFC/g) às do controle. Após 7 dias de armazenamento as contagens foram de  $5,4 \times 10^6$  UFC/g enquanto que àqueles submetidos a substância a 100% apresentaram  $6,5 \times 10^5$  UFC/g. Sendo assim, a substância a 100% teve ação na microbiota do mexilhão parcialmente eviscerado. Como esperado, o extrato diluído (50 %) foi menos eficiente. Por exemplo, no 7º dia de armazenamento as contagens referentes a amostra tratada com o extrato diluído apresentaram contagens de  $1,3 \times 10^6$  UFC/g, enquanto que aquelas tratadas com o extrato a 100% as contagens não ultrapassaram valores de  $6,5 \times 10^5$  UFC/g.



**Figura 5: Resultados da primeira coleta referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões parcialmente eviscerados, os quais foram tratados com 100% e 50% de extrato de *B. amyloliquefaciens* e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias.**

Para as amostras de mexilhões inteiros as contagens obtidas tanto para as amostras tratadas com o extrato quanto para as não tratadas, foram semelhantes ao longo de todo o período de armazenamento (Figura 6). Mesmo assim, as contagens das amostras tratadas com o extrato de *B. amyloliquefaciens* foram menores do que as não tratadas apresentando valores que variaram entre  $2,2 \times 10^3$  a  $5,5 \times 10^6$  UFC/g e  $2,8 \times 10^3$  e  $1,2 \times 10^7$  UFC/g, respectivamente. Com relação à amostra

de mexilhões parcialmente eviscerados, o extrato teve um melhor efeito sobre a microbiota deste do que sobre a da amostra de mexilhões inteiros. Este fato pode ter ocorrido porque, durante a retirada das vísceras a microbiota que encontrava-se no seu interior ficou exposta, desta maneira a substância pode agir diretamente sobre as bactérias. Enquanto que nas amostras de mexilhão inteiro, era necessário que a substância penetra-se no interior das vísceras para depois atingir as bactérias ali presentes. Segundo BLOM *et al.* (1997) a distância em que a molécula de bacteriocina precisa se difundir até a célula alvo, além do número destas com relação à quantidade de substância são considerações importantes para serem realizadas na predição e verificação da sua atividade.

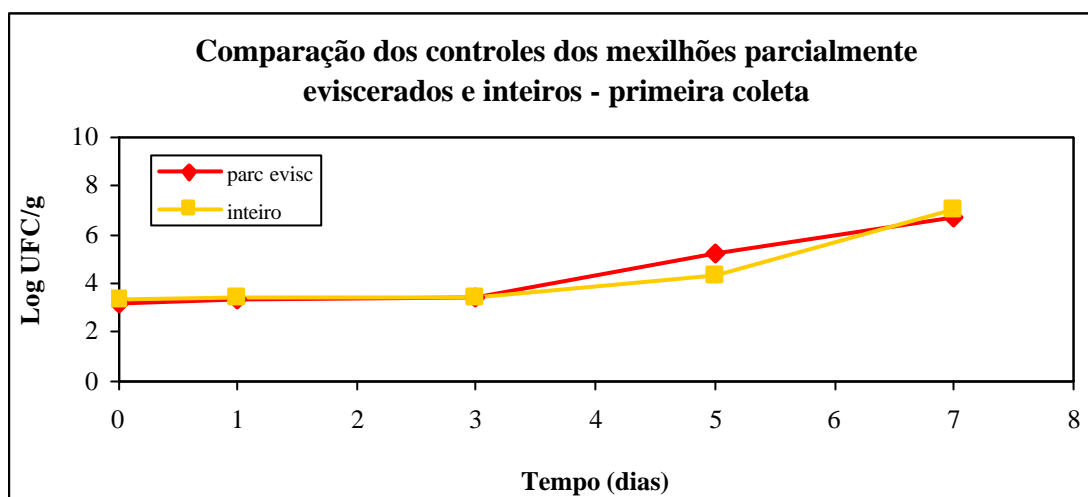


**Figura 6: Resultados da primeira coleta referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões inteiros, os quais foram tratados com 100% de extrato de *B. amyloliquefaciens* e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias.**

De uma forma geral, os produtos marinhos após a morte, perdem a proteção natural à invasão de bactérias e a ação de suas próprias enzimas que são encarregadas de controlar processos normais tais como, a contração e o relaxamento muscular enquanto o animal esta vivo. Mas quando o animal morre essas enzimas são implicadas em reações predominantemente degradativas. As enzimas proteolíticas, liberadas pelos lisossomas, começam a agir ainda no início do *rigor mortis* sobre as proteínas estruturais. A hidrólise das proteínas vai permitir a criação de um ambiente favorável para o crescimento bacteriano, permitindo a deterioração. A decomposição é particularmente intensa quando o produto sai do *rigor mortis* e as bactérias têm como substrato os produtos hidrolisados

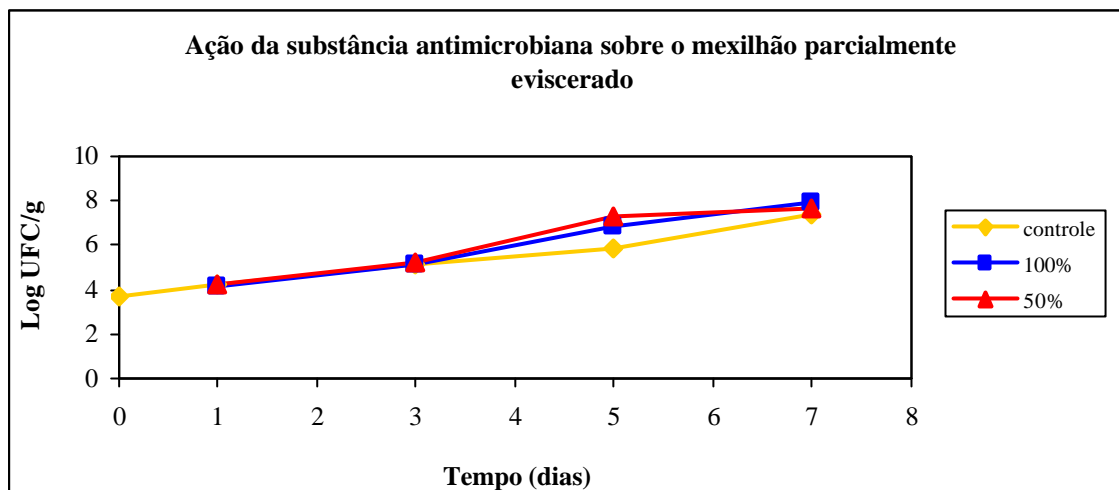
formados como resultado da autólise. Assim, no princípio, o número de microrganismos na carne cresce lentamente, mas depois aumenta rapidamente com o decorrer da decomposição (BERTULLO, 1975; CONNELL, 1988).

Através da figura 7, pode-se notar que as contagens das amostras controle dos mexilhões parcialmente eviscerados e inteiros apresentaram valores semelhantes durante os 3 primeiros dias de armazenamento, não ultrapassando valores de  $10^3$  UFC/g para ambas as amostras. Os processos de decomposição, assim como a duração do fenômeno de *rigor mortis*, podem ter sido retardados devido a temperatura de armazenamento ( $6^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ ), fazendo com que a taxa de crescimento das bactérias presentes no mexilhão fosse relativamente baixa. Algumas diferenças no crescimento e consequentemente na contagem de microrganismos psicotróficos podem ser verificadas entre o 5º e 7º dia de armazenamento. A carga microbiana das amostras de mexilhões parcialmente eviscerados ( $1,8 \times 10^5$  UFC/g) apresentou um ciclo logarítmico maior do que a do mexilhão inteiro ( $2,1 \times 10^4$  UFC/g) no 5º dia, mas ao final do período de armazenamento os mexilhões inteiros apresentaram uma contagem superior ( $1,1 \times 10^7$  UFC/g). O crescimento mais rápido dos microrganismos das amostras de mexilhões parcialmente eviscerados pode ter ocorrido devido ao contato com o músculo do mexilhão antes das bactérias presentes nas amostras de mexilhões inteiros. Isto porque durante o procedimento de retirada das vísceras ocorria a ruptura das mesmas, expondo a microbiota interna. Assim, com o decorrer dos processos de decomposição, os microrganismos encontravam-se em um ambiente favorável ao seu crescimento tendo disponível os produtos formados como resultado da autólise. Nos mexilhões inteiros era necessário primeiramente que a parede intestinal fosse rompida através da ação dos sucos digestivos, para que os microrganismos concentrados no interior das vísceras se difundissem na carne do mexilhão e assim encontrassem condições mais favoráveis ao seu crescimento.



**Figura 7: Comparação dos controles, mexilhões parcialmente eviscerado e inteiro, referente a primeira coleta.**

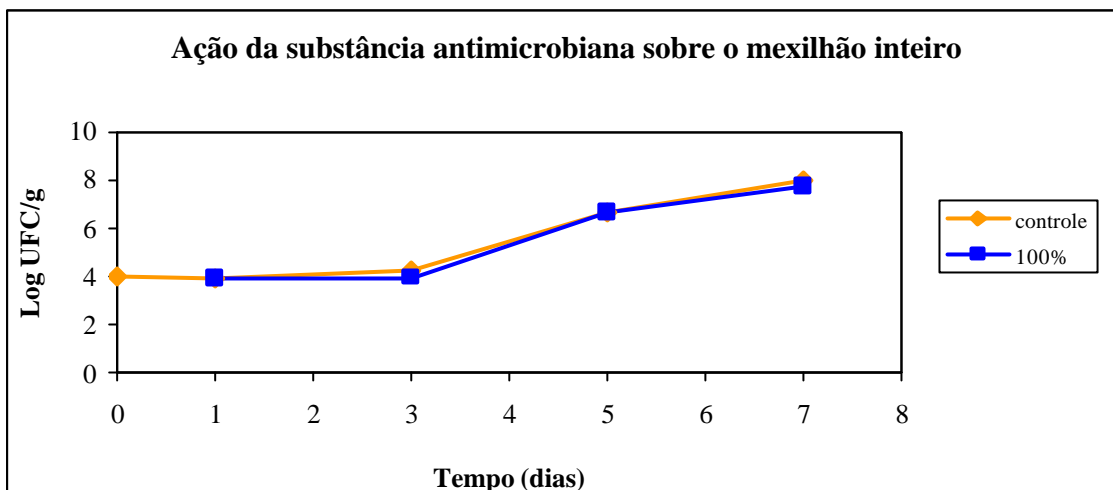
Na segunda coleta, também observou-se o aumento da microbiota do mexilhão parcialmente eviscerado ao longo do período de armazenamento sob temperatura de refrigeração, variando de  $5,0 \times 10^3$  UFC/g no dia 0 (dia da coleta) a  $2,4 \times 10^7$  UFC/g no 7º dia (Figura 8). As amostras, tratadas com o extrato a 100%, tiveram praticamente a mesma contagem observada nas amostras não tratadas até o terceiro dia de armazenamento com valores que variaram de  $1,3 \times 10^4$  UFC/g no primeiro dia à  $1,3 \times 10^5$  UFC/g no terceiro dia. A partir do quinto e sétimo dia as contagens foram um superiores as do controle apresentando  $7,5 \times 10^6$  UFC/g e  $8,3 \times 10^7$  UFC/g, respectivamente. As amostras tratadas com 50% de extrato antimicrobiano apresentaram o mesmo comportamento que àquelas tratadas com 100% sendo que em termos de contagem foram superiores (Figura 8). Novamente observa-se que o extrato diluído, embora apresente um comportamento semelhante ao não diluído, é um menos eficiente.



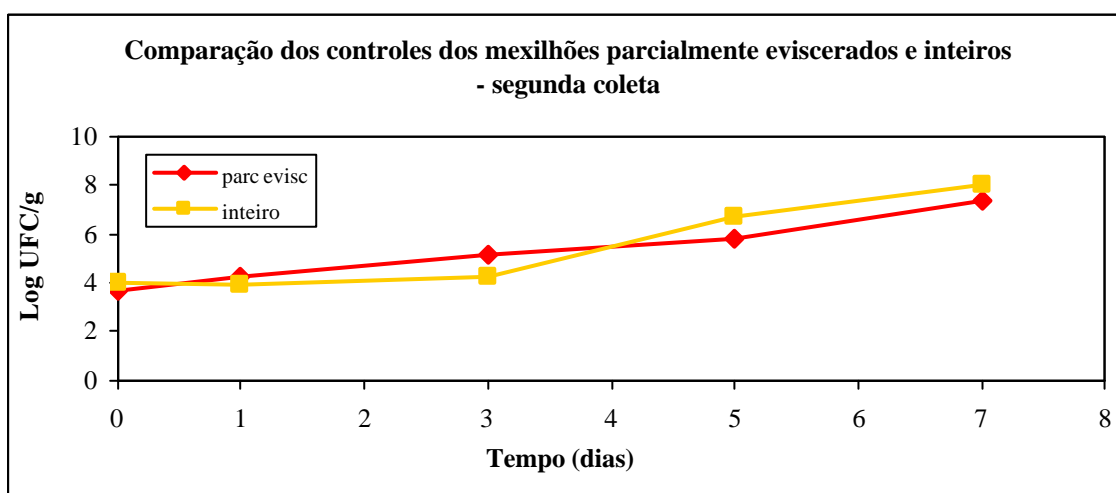
**Figura 8:** Resultados da segunda coleta, referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões parcialmente eviscerados os quais foram tratados com 100% e 50% de extrato de *B. amyloliquefaciens* e mantidos sob temperatura de refrigeração por 7 dias.

Os resultados para a amostra de mexilhões inteiros mostraram um comportamento semelhante das curvas de crescimento microbiano tanto para o controle quanto para a amostra tratada com o extrato. Sendo que esta última, teve uma contagem um pouco menor do que a controle (Figura 9). Assim como na primeira coleta, a contagens iniciais da amostra controle do mexilhões parcialmente eviscerados e inteiros foram próximas  $5,0 \times 10^3$  UFC/g e  $9,8 \times 10^3$  UFC/g, respectivamente. Embora a contagem da amostra de mexilhões inteiros tenha sido mais baixa que a dos mexilhões parcialmente eviscerados até o terceiro dia de armazenamento, houve um aumento de um ciclo logarítmico nas contagens a partir do quinto dia (Figura 10).



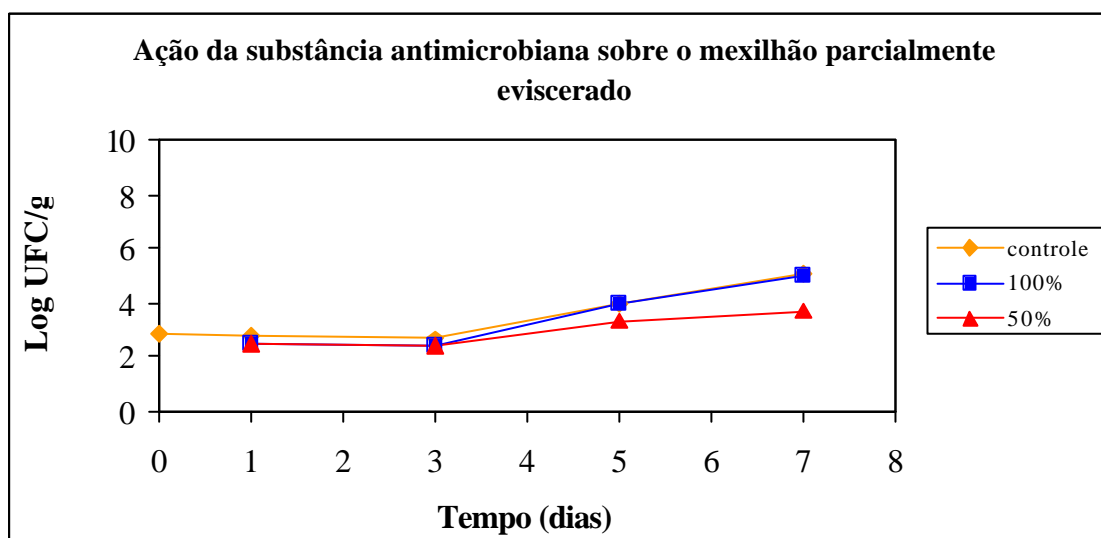


**Figura 9:** Resultados da segunda coleta, referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões inteiros, os quais foram tratados com 100% de extrato de *B. amyloliquefaciens* e mantidos sob temperatura de refrigeração por 7 dias.



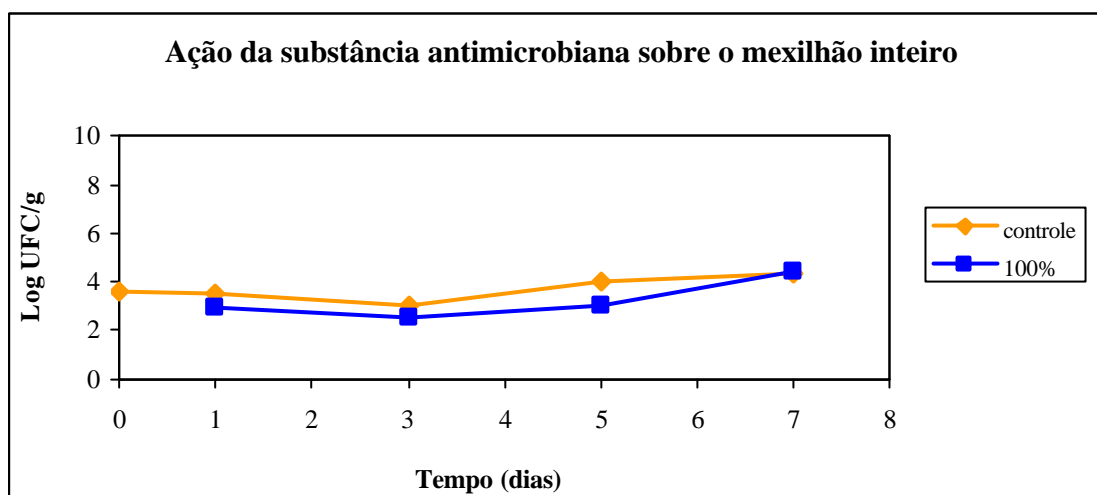
**Figura 10:** Comparação dos controles, mexilhões parcialmente eviscerado e inteiro, referente a segunda coleta.

Na terceira coleta a contagem padrão para microrganismos psicrotróficos da amostra de mexilhões parcialmente eviscerados, foi menor do que as anteriores, mas teve o mesmo comportamento, apresentando valores de  $7,5 \times 10^2$  UFC/g para o dia 0 e  $1,1 \times 10^5$  UFC/g para o sétimo dia. A substância apresentou certa atividade, haja vista, que os mexilhões tratados com 100% de extrato apresentaram uma contagem inferior do que ao do controle ao longo dos sete dias de armazenamento (Figura 11). Diferentemente das demais coletas, nesta a amostra tratada com o extrato a 50% foi pouco mais eficiente ao longo de todo o armazenamento apresentando uma diferença de 1,36 log UFC/g quando comparado a controle no sétimo dia. Nas coletas anteriores as amostras tratadas com o extrato diluído tiveram crescimento maior do que naquelas tratadas com o extrato a 100% e controle. Possivelmente devido a maior concentração bacteriana a quantidade de extrato adicionado a amostra foi insuficiente para atuar tanto na microbiota inicial quanto naquela que se desenvolvia ao longo do tempo, não ocorrendo assim a ação esperada. Nesta coleta as contagens foram menores do que nas anteriores, assim, provavelmente devido a baixa carga microbiana tanto inicial quanto ao longo do período, a quantidade de extrato utilizado tenha sido relativamente suficiente para apresentar uma certa ação bacteriostática.

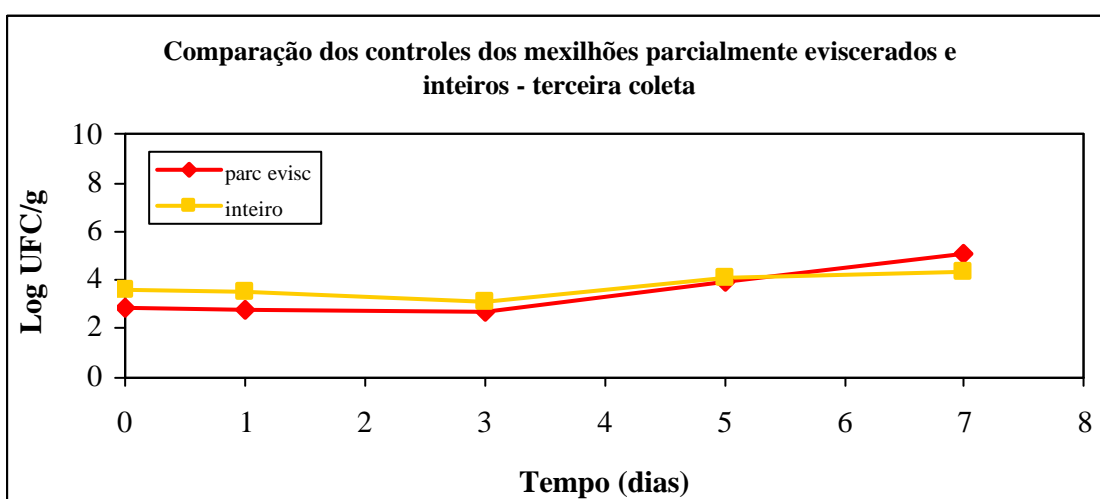


**Figura 11: Resultados da terceira coleta, referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões parcialmente eviscerados os quais foram tratados com 100% e 50% de extrato de *B. amyloliquefaciens* e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias.**

Na amostra dos mexilhões inteiros não houve uma grande alteração na carga microbiana ao longo do período de armazenamento. Os mexilhões tratados com a substância antimicrobiana, apresentaram uma carga microbiana menor do que aqueles não tratados (Figura 12), apenas com um valor um pouco maior no sétimo dia ( $2,2 \times 10^4$  UFC/g para o controle e  $2,8 \times 10^4$  UFC/g para o tratado).

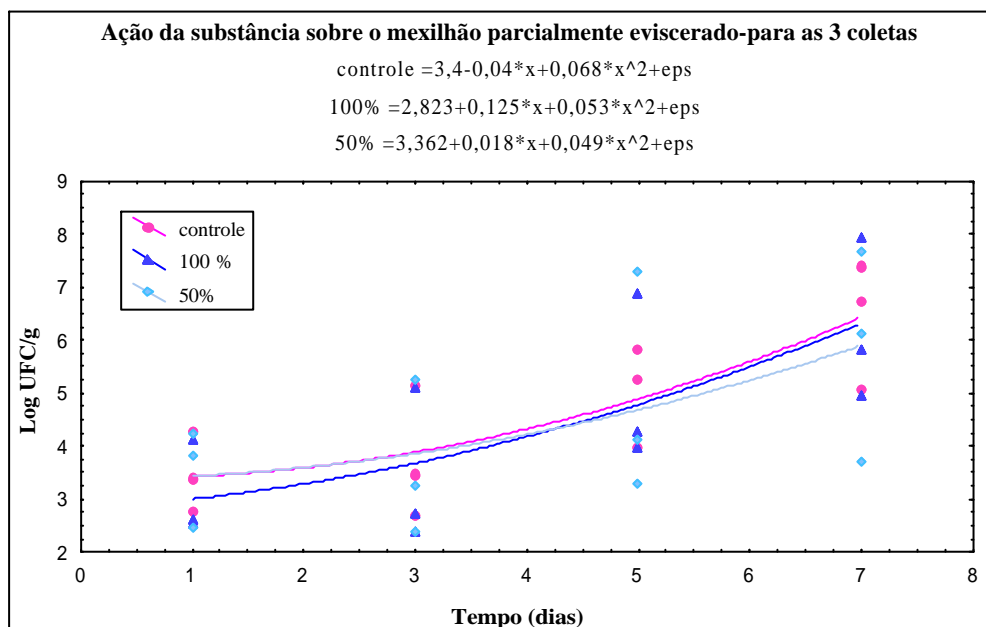


**Figura 12:** Resultados da terceira coleta, referente às análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões inteiros, os quais foram tratados com 100% de extrato de *B. amyloliquefaciens* e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias.

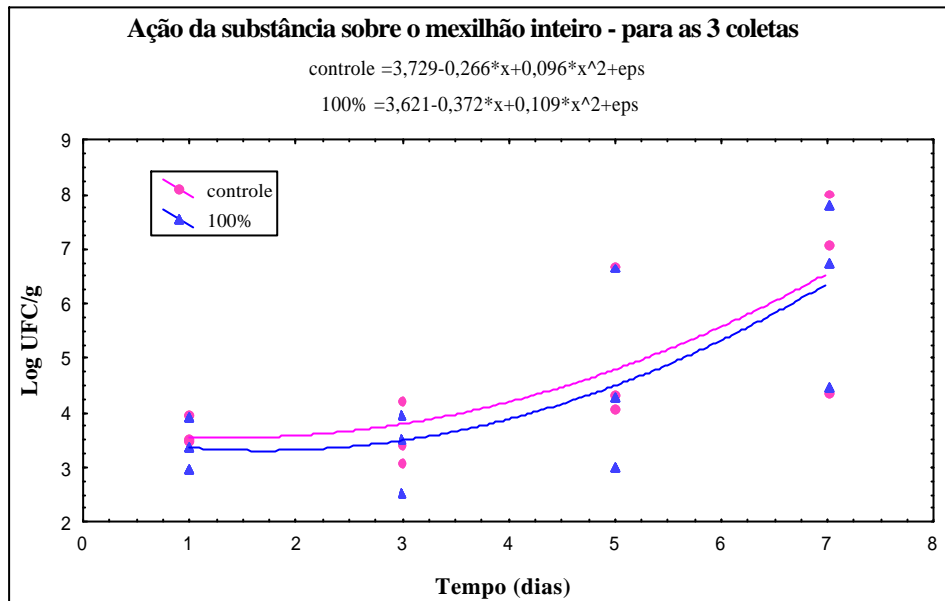


**Figura 13:** Comparação dos controles, mexilhões parcialmente eviscerado e inteiro, referente a terceira coleta.

Embora tenha sido possível verificar a inibição de alguns microrganismos presentes na microbiota do mexilhão em testes *in vitro*, quando estes foram realizados diretamente sobre o alimento (testes *in vivo*), a adição da substância de uma maneira geral, apresentou um comportamento bacteriostático. Desta maneira, embora não tenha inibido o crescimento da microbiota do mexilhão ao longo do período em que este ficou armazenado, a adição da substância antimicrobiana também não permitiu um aumento desta carga. Esta conclusão foi confirmada através das análises estatísticas do modelo de regressão polinomial quadrático, realizada com as três coletas juntas, onde estatisticamente os tratamentos não foram diferentes entre si, ao nível de significância de 10% (Figura 14 e 15).



**Figura 14: Resultados para as três coletas, referente as análises de microrganismos psicrotróficos realizadas com mexilhões parcialmente eviscerados os quais foram tratados com 100% e 50% de extrato de *B. amyloliquefaciens* e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias.**



**Figura 15: Resultados para as três coletas, referente as análises de microrganismos psicotróficos realizadas com mexilhões inteiros os quais foram tratados com 100% de extrato de *B. amyloliquefaciens* e mantidos sob temperatura de refrigeração por sete dias.**

Em testes realizados por Duffes *et al.* (1999) verificou-se que *Carnobacterium divergens* V41 teve um efeito bacteriostático, visto que as contagens iniciais e finais de *Listeria monocytogenes* foram idênticas após 3 semanas de armazenamento. Neste mesmo estudo, a nisina também teve uma atividade bacteriostática sobre *Listeria monocytogenes* por todo o período de armazenamento. Quando testado no alimento, (salmão defumado a frio embalado a vácuo) verificou-se novamente o efeito bacteriostático de *Carnobacterium divergens* V41.

Eckner (1992) descreveu que em testes realizados em um tipo de salsicha alemã, a introdução de *Lactobacillus sake*, uma bactéria produtora de bacteriocina, teve um efeito bacteriostático sobre *Listeria monocytogenes* e concluiu-se que tal cepa produtora de bacteriocina pode ser utilizada como uma medida profilática. Diferente de outros alimentos, especialmente líquidos como leites ou sopas, os substratos de alimentos sólidos podem restringir severamente a difusão da bacteriocina através do produto. Isto pode limitar a eficácia da bacteriocina por mais que seja produzida, como pode estar disponível ou ativa somente em áreas localizadas dentro da matriz do alimento (ECKNER, 1992).

Segundo Gänzle *et al.* (1999), a inibição do crescimento e eliminação de microrganismos patogênicos pelas bacteriocinas durante a produção e armazenamento do alimento é resultado de interações específicas entre bacteriocina e a matriz do alimento tão bem como o organismo alvo.

Outro fator que pode ter interferido na eficiência da substância quando adicionada no mexilhão, é o fato da microbiota do mexilhão ser composta, em sua grande maioria, por bactérias Gram negativas. Através de vários estudos (TAGG *et al.*, 1976; HOLZAPFEL, *et al.*, 1995; GOFF *et al.*, 1996; MONTVILLE & CHEN, 1998; DUFFES *et al.*, 1999; GÄNZLE, *et al.*, 1999; CLEVELAND *et al.*, 2001) tem se verificado que a maioria das substâncias antimicrobianas possuem a ação sobre bactérias Gram positivas. Esta ação diferenciada entre as bactérias Gram positivas e negativas pode ser devido à composição da parede celular das mesmas. Em ambas, a membrana citoplasmática forma uma borda entre o citoplasma e o ambiente externo, que é circundada por uma camada de peptidoglicano o qual é significativamente mais fino nas bactérias Gram negativas do que nas bactérias Gram positivas. As bactérias Gram negativas possuem uma camada adicional, também chamada camada externa, a qual é composta de fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos, sendo impermeável a maior parte de moléculas. Apesar disso, a presença de poros nesta camada permite a difusão livre de moléculas com massa molecular inferior a 600 Da. As bacteriocinas pequenas produzidas por bactérias ácido lácticas são aproximadamente 3kDa e são assim muito grandes para atingir seus alvos, a membrana citoplasmática (KLAENHAMMER, 1993; STILES & HASTINGS, 1991 *apud* ABEE *et al.*, 1995; GÄNZLE *et al.*, 1999). No caso da substância utilizada neste trabalho, foi verificado em estudos preliminares que possivelmente a substância antimicrobiana produzida por *B. amyloliquefaciens* possui o peso molecular inferior a 6500 Da (BONELLI, 2001). Mesmo sendo menor do que as bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas, ela ainda é maior do que o tamanho do poro da parede celular dos microrganismos.

Em matrizes alimentares a atividade das bacteriocinas pode ser afetada por (i) mudanças na solubilidade e carga das bacteriocinas, (ii) ligação das bacteriocinas aos componentes dos alimentos, (iii) inativação por proteases e (iv) mudanças no envelope celular de organismos alvos como uma resposta a fatores ambientais (GÄNZLE *et al.*, 1999). Estes fatores prévios devem ser considerados ao se adicionar as bacteriocinas diretamente no alimento.

A composição química (presença enzimas exógenas, e. g. proteases) e as condições físicas (temperatura e pH) são parâmetros críticos para a estabilidade e para a atividade de bacteriocinas

em alimentos ou bebidas. A nisina, por exemplo, é 228 vezes mais solúvel em pH 2 do que em pH 8 (LIU & HANSEN, 1990 *apud* CLEVELAND *et al.*, 2001). Durante verificação da atividade do extrato antimicrobiano de *B. amyloliquefaciens* verificou-se que este apresentou atividade em uma faixa de pH de 2 a 8 (BONELLI, 2001). O pH do mexilhão fresco fica em torno de 6,5 a 6,9 mesmo havendo uma diminuição deste ao longo do tempo de armazenamento devido a deterioração (aproximadamente pH 5,8) (ICMSF, 1985), ainda encontra-se dentro da faixa de atividade da substância antimicrobiana.

Outros investigadores (SAUCIER & GREER, 2001) tem reportado que os constituintes da carne e a atividade enzimática endógena podem interferir com atividade antimicrobiana de bacteriocinas usada em alimentos. Por exemplo, nisina não é ativa em sistemas carneos porque reage com glutatona em carne crua produzindo um complexo inativo, este é insolúvel ao pH da carne e esta sujeito a degradação proteolítica.

O conteúdo de gordura pode afetar a atividade da bacteriocina. Estudos tem mostrado que bacteriocinas, incluindo a nisina, pode ligar-se preferencialmente ao lipídeo, por isso interferindo com a atividade contra a bactéria (NETTLES & BAREFOOT, 1993). Um grande determinante para a sensibilidade da nisina é a quantidade relativa de lipídeos carregados negativamente na membrana alvo.

Visto que as bacteriocinas são componentes protéicos, elas podem ser susceptíveis a proteases endógenas ou proteinases presentes em alimentos e devem ser avaliadas cuidadosamente por retenção da atividade. Visto que a degradação destes componentes é indesejável em sistemas alimentares, inativação por enzimas gastro-intestinais, tais como as quimotripsina ou tripsina, é vantajoso. Inativação por essas enzimas causa bacteriocinas inertes e pode explicar porque nenhum efeito adverso tem sido associado com a ingestão de bacteriocinas (NETTLES & BAREFOOT, 1993).

O modo de ação das bacteriocinas é dependente de muitos fatores, dentre os quais a sua concentração. A inibição de células persiste enquanto houver bacteriocina ativa remanescente no meio de crescimento (MORENO, 1999). Assim, talvez a quantidade de substância antimicrobiana utilizada na realização dos testes deste trabalho (1mL de substância em 10 g de mexilhão) não tenha sido suficiente para inativar o crescimento da microbiota presente no mexilhão.

A capacidade de inibição de uma bacteriocina é medida pela quantidade de proteína ativa na mesma. Esta quantidade pode variar dependendo das condições de crescimento da bactéria produtora. Desta maneira seria necessário realizar um pool de vários extratos e então dosar a quantidade de proteína e então utilizar uma quantidade padrão desta.

Ultimamente tem-se realizado estudos onde testa-se o efeito sinérgico de uma bacteriocina mais algum componente para melhorar a eficiência do controle da microbiota de um determinado alimento. Por exemplo, a lisoenzima é conhecida por inibir algumas bactérias Gram positivas, mas sozinha é ineficaz contra bactérias Gram negativas (NATTRESS, *et al.*, 2001). Em 1986, Kordel e Sahl reportaram que *Escherichia coli* torna-se sensível a nisina quando a membrana externa foi rompida (KORDEL & SAHL, 1986 *apud* ABEE *et al.*, 1995). Desde então, vários pesquisadores tem mostrado que o uso de agentes quelantes, tais como EDTA ou citrato podem ser usados para se ligarem aos íons de magnésio na camada lipopolisacarídeos, da membrana externa de bactérias Gram negativas com aumento da susceptível da sensibilidade a bacteriocinas, antibióticos e detergentes (ABEE *et al.*, 1995; STEVENS *et al.*, 1992 *apud* HOLZAPFEL *et al.*, 1995).

Os efeitos da nisina Z, carnocina UI49 e bavaricina A no crescimento bacteriano e vida de prateleira do camarão salgado foi recentemente avaliado comparada com aqueles de solução de sorbato-benzoato e um controle com nenhum preservativo adicionado. A vida de prateleira do camarão sem conservantes encontrada foi 10 dias. Carnocina UI49 não teve influencia na vida de prateleira, enquanto que bavaricina (bruta) estendeu a vida de prateleira para 16 dias. Significativamente quando a nisina Z purificada ou bruta foi aplicada no mesmo material a vida de prateleira foi estendida para 31 dias. A solução de sorbato-benzoato preservou o camarão salgado por todo o período de armazenamento (59 dias). Tais resultados oferecem perspectivas claras para o uso de bioconservantes de certos pescados com nisina Z (ABEE *et al.*, 1995)

#### **4.5 Verificação da produção de histamina pelas bactérias inibidas pela substância antimicrobiana**

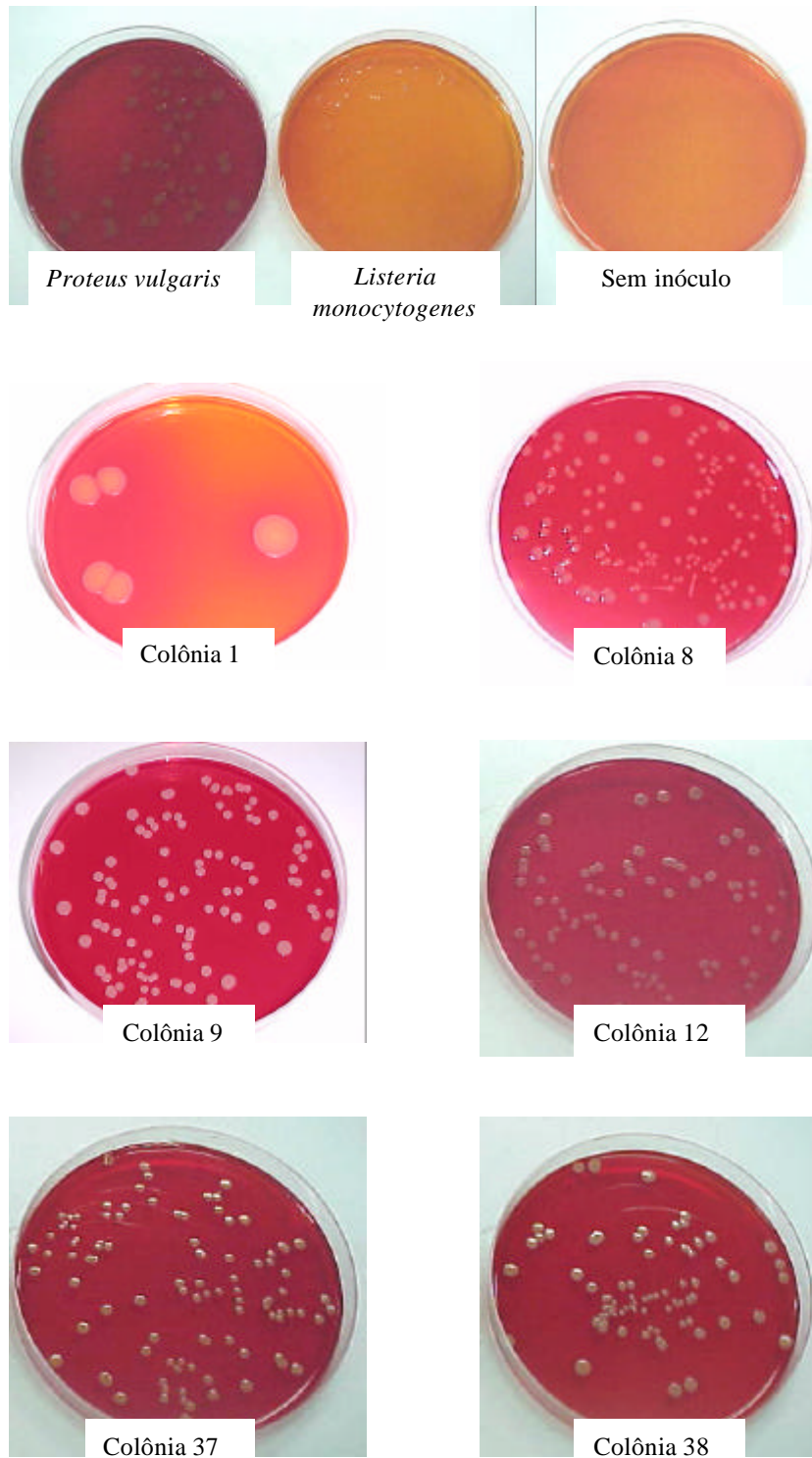
As colônias que apresentaram sensibilidade a substância antimicrobiana produzida por *B. amyloliquefaciens*, foram testadas para verificar se as mesmas possuíam a capacidade de formação de histamina.



O meio utilizado por Niven *et al.* (1981), teve que ser modificado no que diz respeito a concentração de ágar o qual passou de 2% para 3,5%, devido a não solidificação do mesmo no primeiro caso. Uma situação semelhante foi presenciada por Hernandez-Herrero *et al.* (1999), utilizando uma concentração um pouco superior - 4%. Neste trabalho, não houve a necessidade de utilizar este valor, haja vista que, com 3,5%, o ágar apresentou a consistência desejável.

Nos primeiros testes realizados com o meio descrito por Niven *et al.* (1981) não foi possível verificar se houve alteração da cor do meio, pois as colônias não cresceram devido provavelmente a sobrecamada. Em testes adicionais, esta camada foi desconsiderada mas, mesmo assim, houve pouco crescimento ou nenhum nas placas incubadas a 35° ou a 25°C, respectivamente. Com exceção de *Acinetobacter* spp, que é aeróbio, as demais colônias identificadas são anaeróbias facultativas o que não impediria o seu crescimento em um meio com sobrecamada. O baixo pH do meio (5,3) pode ser uma das causas do pouco crescimento observado das colônias. Àquelas colônias que cresceram não apresentaram as características descritas por Niven para bactérias histidina decarboxilase.

Na metodologia sugerida por Yoshinaga & Frank (1982) houve alteração da cor do meio (Figura 16) apenas nas placas (Tabela 8) e não foi notada a formação de gás nos tubos com Duhran.



**Figura 16: Colônias que apresentaram alteração da cor do meio, nos testes de decarboxilação da histidina realizados através da metodologia sugerida por Yoshinaga & Frank (1982).**

**Tabela 8: Resultados dos testes de decarboxilação da histidina realizados através da metodologia sugerida por Yoshinaga & Frank (1982)**

Colônias	Decarboxilação da histidina			
	1° teste	2° teste	3° teste	4° teste
1	++	++	++	++
8	+	+	+	+
9	++	++	++	++
12	++	++	++	++
13	s/c	s/c	s/c	s/c
16	s/c	s/c	-	-
19	-	-	+	-
37	+	+	+	+
38	+	+	+	+
Controle positivo*	++	++	++	++
Controle negativo**	-	-	-	-
Controle do meio***	-	-	-	-

Legenda:

++ = com alteração da cor do meio

+ = com pouca alteração da cor do meio

- = sem alteração da cor do meio

s/c = sem crescimento

\**Proteus vulgaris*

\*\**Listeria monocytogenes*

\*\*\* Placas sem inóculo

O aumento do pH do meio Niven modificado devido a secreção de componentes alcalinos, resulta em uma mudança de cor do meio ao redor das colônias de amarelo para vermelho/púrpura. Muitos autores (ACTIS, *et al.* 1999; BEN-GIGIREY, *et al.*, 1999; KIM, *et al.*, 2001) tem verificado que este aumento pode ocorrer devido a formação de outros componentes resultantes da via metabólica, tal como amônia. Isto pode ser um fator de interferência quando meios diferenciais são utilizados para detectar a secreção de histamina por bactérias. A secreção deste tipo de substância introduz uma variável perturbadora que afeta drasticamente os resultados obtidos com esta técnica a qual é baseada apenas na mudança de cor de um indicador de pH. Desta maneira, seria necessário a confirmação dos resultados através de técnicas mais específicas, por exemplo o uso de cromatografias (*e.g.* cromatografia gasosa, cromatografia de camada delgada ou cromatografia líquida de alta performance – HPLC), utilizando histamina padrão como referência.

Em acordo com este trabalho, os gêneros *Bacillus* spp. e *Acinetobacter* spp. também tem sido identificados como bactérias formadoras de histamina em outros alimentos (LEITÃO, *et al.*, 1983; MIDDLEBROOKS, *et al.*, 1988; SHALABY, 1996; BEN-GIGIREY. *et al.*, 1999; ACTIS, *et al.*, 1999; KIM, *et al.*, 2001).

Em um trabalho realizado por Hernández-Herrero *et al.* (1999), com anchovas maturadas em sal, 38,73% das bactérias isoladas foram classificadas como formadoras de histamina, destas, 76% pertenciam ao gênero *Staphylococcus* spp, sendo que *S. epidermis* foi a espécie formadora mais freqüente e ativa. Assim como neste trabalho, o meio utilizado por Hernández-Herrero para identificação das bactérias formadoras de histamina foi o meio Niven, mesmo assim, o resultado não foi semelhante para esta espécie em questão.

#### **4.6 Trabalhos futuros**

Segundo Tagg *et al.* (1976) fatores como temperatura, tempo, aeração e pH durante a incubação das culturas produtoras de antimicrobianos, podem exercer efeitos profundos na produção de antimicrobianos ativos. Desta maneira seria interessante a padronização da quantidade de substância utilizada, através da dosagem de proteínas. Assim, ao aplicar a substância antimicrobiana em um alimento a quantidade desta seria conhecida e as variações encontradas poderão ser devido somente as interações com o mesmo.

Verificar a possibilidade do efeito sinérgico da substância antimicrobiana produzida pelo *B. amyloliquefaciens* com mais algum componente, como por exemplo EDTA, visando assim, melhorar a eficiência do controle da microbiota do mexilhão ou de outro alimento.

Utilizar a microbiologia preditiva, como uma ferramenta na avaliação da ação da substância antimicrobiana sobre a microbiota do mexilhão ou de um outro alimento que se deseja estudar.

## 5. CONCLUSÕES

- Foi possível verificar que a substância antimicrobiana produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou um comportamento bacteriostático quando aplicada diretamente na carne do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758).
- Das 39 colônias bacterianas isoladas do mexilhão *Perna perna* cultivado na praia do Sambaqui, 9 apresentaram sensibilidade ao extrato da substância produzida por *B. amyloliquefaciens*, quando testadas *in vitro*.
- As 9 colônias foram identificadas pertencem aos gêneros: *Bacillus* sp., *Acinetobacter* spp, *Aerococcus viridians*, *Corynebacterium vitarumen*, *Corynebacterium amycolatum* e *Staphylococcus epidermidis*
- As bactérias *Bacillus* sp., *Acinetobacter* spp, *Aerococcus viridians*, *Corynebacterium vitarumen* quando incubadas no meio Niven modificado, apresentaram mudança de cor do indicador sugerindo uma possível capacidade de formação de compostos alcalinos. É necessário realizar testes bioquímicos para se confirmar se este composto formado é a histamina ou não.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T.; KROCKEL,L.; HILL,C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, p. 169-185, 1995.

ACTIS, L.A. *et al.* Comparison of differencial plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 39, p. 79-90, 1999.

ANTONIOLLI, M. A. **Vida útil do mexilhão *Perna perna* (L.) processado e mantido sob refrigeração.** 1999. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington, D.C., 1992. 1219 p.

BARANOWSKI, J.D. *et al.* Decomposition and histamine content in mahimahi (*Coryphaena hippurus*). **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 3, p. 217-222, 1990.

BARBOSA, M.G.R. *et al.* Epidemiologia das toxinfecções alimentares: estudo retrospectivo na casuística de informações anti-veneno – CIAVE/BA, no período de 1984 à 1994. **Anais do IX Congresso Brasileiro de Toxicologia**, Ribeirão Preto, SP. p.272, 1995.

BATISTA, C. R. V. **Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and on anthegonistic interaction with *Bacillus amyloliquefaciens*.** 1993. 314f. Thesis. (Doctor of Philosophy in the Faculty of Science)- Departament of Bioscience and Biotechnology, University of Strathclyde, Glasgow.

BAUTISTA, C. **Moluscos – Tecnologia de Cultivo.** Madri: Ediciones Mundi-Prensa,1989. 167 p. ISBN 84-7114-228-7.

BEN-GIGIREY, B. *et al.* Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 8, p. 933-939, 1999.

BERTULLO, V. **Tecnología de los productos de la pesca**. Montivideo, 1975. 486 p.

BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 2, p. 204-216, 1996.

BLOM, H. *et al.* A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 103-109, 1997.

BONELLI, R. R. **Extração e caracterização de uma substância antimicrobiana produzida por *Bacillus amyloliquefaciens***. 2001. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BOVER-CID, S. *et al.* Amino acid-decarboxilase activity of bacterial isolated from fermented pork sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, p. 185-189, 2001.

BUSSANI, M. **Guia practica del cultivo del mejillon**. Zaragoza: Acribia, 1990. 252 p.

CASTELLVI, J. Flora bacteriana marina acumulada por filtración en *Mytilus edulis*. **Inv. Pesq.**, v. 30, p. 639-651, 1966.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 20 jan. 2002.

CERUTTI, R. L.; BARBOSA, T. C. P. Flora bacteriana heterotrófica em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e águas da Baía Norte, Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 4, p. 330-334, 1991.

CHICHESTER, C. O.; GRAHAM, H. D. **Microbial safety of fishery products**. New York: Academic Press, 1973. 334 p.

CLEVELAND, J. *et al.* Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

CONNELL, J. J. **Control de la calidad del pescado**. Zaragoza: Acribia, 1988. 236 p. ISBN 84-200-0418-9

DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, v. 43, n. 1, p. 164-167, Jan. 1989.

DALLAS, H. L.; THOMAS, D. P.; HITCHINS, A. D. Virulence of *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, and *Listeria innocua* assayed with in vitro murine macrophagocytosis. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 1, p. 24-27, 1996.

DE MARTINS, E. C. P. *et al.* Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 32-37, 2001.

DUFFES, F. *et al.* Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 12, p. 1394-1403, 1999.

DZIEZAK, J. D. Antimicrobial Agents – A means toward product stability. **Food Technology**, v. 40, n. 9, p. 104-111, 1986.

ECKNER, K. F. Bacteriocins and food applications. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 12, n. 4, p. 204-209, April 1992.

ELEMENTOS DE APOIO PARA O SISTEMA APPCC. 2. ed. Brasília: SENAI/DN, 2000. 361 p. (Série Qualidade e Segurança Alimentar). Projeto APPCC Indústria. Convênio CNI/SENAI/SEBRAE. ISBN 85-87090-52-6.

EPAGRI. Disponível em:< <http://www.epagri.rct-sc.br>>. Acesso em: 28 jan. 2002.



ETTAYEBI, K.; YAMANI, J. E.; ROSSI-HASSANI, B.-D. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 191-195, 2000.

FADDIN, J. F. M. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527 p.

FRANCO, B. D. G. M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 886 p.

GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 207-217, 1999.

GOFF, J. H.; BHUNIA, S. K.; JOHNSON, M. G. Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken meat with pediocin AcH bound to heat-killed *Pediococcus acidilactici* cells. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 11, p. 1187-1192, 1996.

HALÁSZ, A. *et al.* Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, p. 42-49, 1994.

HANLIN, M. B. *et al.* Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 3, p. 252-255, 1993.

HWANG, D.-F. *et al.* Biogenic amines in flesh of sailfish (*Istiophorus platypterus*) responsible for scombroid poisoning. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 926-928, 1995.

HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M. *et al.* Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 5, p. 509-514, 1999.

HOLT, J. G. *et al.* **Bergey's Manual<sup>â</sup> of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 343-362, 1995.

HUSS, H. H. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. Roma: FAO,1997. 182 p. (Documento técnico sobre as pescas, 334).

HUSS, H. H.; REILLY, A.; EMBAREK, P. K. B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, v. 11, p. 149-156, 2000.

HWANG, D-F. *et al.* Biogenic amines in the flesh of sailfish (*Istiophorus platypterus*) responsible for Scombroid Poisoning. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 926-928, 1995.

INGLIS, V.; RICHARDS, R. H.; WOODWARD, K. N. Public health aspects of bacterial infections of fish. In: INGLIS, V.; ROBERTS, R. J.; BROMAGE, N.R. **Bacterial diseases of fish**. New York: Halsted Press, 1993. cap. 17. p. 284-303.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF). **Ecologia microbiana de los alimentos 2: Productos alimenticios**. Zaragoza: Acribia, 1985. 989 p.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 171-200, 1995.

JUNEJA, V. K.; DAVIDSON, P. M. Influence of altered fatty acid composition on resistance of *Listeria monocytogenes* to antimicrobials. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 4, p. 302-305, 1993.

KIM, S.- H. *et al.* Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1035-1044, 2001.

KIM, S.- H. *et al.* Identification of bacteria crucial to histamine accumulation in pacific mackerel during storage. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 10, p. 1556-1564, 2001.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 12, n. 1-3, p. 39-86, Sep. 1993.

KRIER, F.; REVOL-JUNELLES, A. M.; GERMAIN, P. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p. 359-363, 1998.

KUEH, C. S. W.; CHAN, K.-Y. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, p. 41-47, 1985.

LEHANE, L. & OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, n. 1-2, p. 1-37, 2000.

LEITÃO, M. F. F. *et al.* Bactérias produtoras de histamina em pescado de origem marinha. **Col. ITAL**, v. 13, p. 75-82, 1983.

LÓPEZ-SABATER, E. I. *et al.* Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in Barcelona area. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 411-418, 1996.

LUDORFF, W.; MEYER, V. **El pescado y los productos de la pesca**. Zaragoza: Acribia, 1978. 342 p. ISBN 84-200-0160-0.

MARENZI, A. W. C. M. **Cultivo de moluscos**. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), 1997. 20 p.

MARQUES, H. L. A. **Criação comercial de mexilhões**. São Paulo: Nobel, 1998. 111 p.

MARTH, E. H. Extended shelf life refrigerated foods: microbiological quality and safety. **Food Technology**, v. 52, n. 2, p. 57-61, Feb. 1998.

MIDDLEBROOKS, B. L. *et al.* Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). **Journal of Food Science**, v. 53, n. 4, p. 1024-1029, 1988.

MING, X. *et al.* Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 2, p. 413-415, 1997.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.setorpesqueiro.com.br>>. Acesso em: 2 fev. 2002.

MONTVILLE, T. J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p. 511-519, 1998.

MORANDINI, C. **Zoologia**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1978. 376 p.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITAO, M. F. F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 130-136, 1999.

MORENO, I. *et al.* Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria monocytogenes*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 23-28, 1999.

MURIANA, P.M. Antimicrobial peptides and their relation to food quality. **ACS Symposium Series**, 528: 303-321, 1993.

MURINA, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp in food. **Journal of Food Protection**, suppl. 5, p. 54-63, 1996.

NACLERIO, G. *et al.* Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4313-4316, Dec. 1993.

NATTRESS, F. M.; YOST, C. K.; BAKER, L. P. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 111-119, 2001.

NETTLES, C. G.; BAREFOOT, S. F. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 4, p. 338-356, April 1993.

NILSSON, L.; GRAM, L.; HUSS, H. H. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 4, p. 336-342, 1999.

NIVEN, C. F. *et al.* Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 321-322, Jan.1981.

NOVOTNY, J. F. Jr.; PERRY, J. J. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2393-2396, Aug. 1992.

OTWELL, W. S.; RODRICK, G. E.; MARTIN, R. E. **Molluscan Shellfish Depuration**. Florida: CRC Press, 1991. 384 p.

PAPAGEORGIU, D. K.; BORI, M.; MANTIS, A. Growth of *Listeria monocytogenes* in the whey cheeses Myzithra, Anthotyros, and Manouri during storage at 5, 12, and 22°C. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 11, p. 1193-1199, 1996.

PERIAGO, P. M.; MOEZELAAR, R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 141-148, 2001.

PILET, M.F. *et al.* Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 58, n.3, p. 256-262, 1995.

RAWLES, D. D.; FLICK, G. J. Biogenic amines in fish and shellfish. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.39, p. 329-365, 1996.

ROSA, R. C. C. *et al.* **Biologia e cultivo de mexilhões**. Florianópolis: EPAGRI/USFC, 2000. 115p.

SAAD, S. M. *et al.* Influence of lactic acid bacteria on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated minas cheese during storage at 8.5°C. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1151-1155, 2001.

SANTOS, S. M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 29, p. 213-231, 1996.

SAUCIER, L.; GREER, G. G. Description of a simple detection assay for in situ production of bacteriocin on meat. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 2, p. 264-267, 2001.

SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v.29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SIKORSKI, Z. E.; KOLAKOWSKA, A.; PAN, B. P. Cambios bioquímicos y microbianos subsiguientes a la captura. In: SIKORSKY, Z. E. **Tecnología de los Productos del Mar: recursos, composición nutritiva y conservación**. Zaragoza: Acribia S. A., 1990. cap. 4.

STELMA, G. N.; MCCABE, L. J. Nonpoint pollution from animal sources and shellfish sanitation. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 8, p. 649-656, Aug. 1992.

STOFFELS, G.; NES, I. F.; GUOMUNSDÓTTIR, A. Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, p. 309-316, 1992.

STORER, T. I.; *et al.* **Zoologia Geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1991. 816 p.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 3, p. 722-756, Sept. 1976.

TAYLOR, S. T.; SUMMER, S. S. Determination of histamine, putrescine, and cadaverine. In: KRAMER, D. E.; LISTON, J. (Eds.). **Seafood Quality determination**. Proceedings of an International Symposium Coordinated by the University of Alaska, 1986.

TAYLOR, S. T. *et al.* Histamine production by food-borne bacterial species. **Journal of Food Safety**, v. 1, p. 173-187, Jun. 1978.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. 386 p.

VIDAL-CAROU, M. C.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; MARINÉ-FONT, A. Spectrofluorometric determination of histamine in fish and meat products. **Journal of AOAC**, v. 73, n. 4, p. 565-567, 1990.

WEI, C. I. *et al.* Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. **Journal Food Science**, v. 55, n. 1, p. 59-63, 1990.

WIRJANTORO, T. I. *et al.* The effect of nisin on the keeping quality of reduced heat-treated milks. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 2, p. 213-219, 2001.

YOSHINAGA, D. H.; FRANK, H. A. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n. 2, p. 447-452, Aug. 1982.

ZEE, J. A.; SIMARD, R. E.; L'HEUREUX, L. Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. **Journal of Food Protection**, v. 46, n. 12, p. 1044-1049, 1983.

ZHENG, G.; SLAVIK, M. F. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 363-367, 1999.