

TOLERÂNCIA DE *S. aureus* ISOLADOS DE PESCADO SALGADO FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES SALINAS

CAROLINE DA SILVEIRA ROCKEMBACH¹; FLÁVIA LIÉGE SCHÜTZ VOLOSKI²,
GABRIELE BENATTO DELGADO³, WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁴, EDUARDA
HALLAL DUVAL⁵

^{1,3} Graduandas de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas –
carol.rockembach@hotmail.com ; gabriele_delgado@hotmail.com

² Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas – fla_voloski@hotmail.com

⁴ Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas -
vladimir.padilha2011@gmail.com

Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – eduardahd@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um micro-organismo Gram-positivo, anaeróbico facultativo, imóvel, não formador de esporos, catalase e coagulase positivo, cujas células apresentam-se na forma de cocos esféricos sozinhos ou dispostos em pares, formando grupamentos que aparentam um cacho de uva (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Seu habitat natural consiste nas narinas, pele e cabelos de animais de sangue quente, sendo 30-50% da população humana portadores assintomáticos (TODD et al., 2007).

Este micro-organismo é um dos principais agentes bacterianos causadores de doenças veiculadas por alimentos em todo o mundo, sendo uma constante fonte de contaminação durante a sua manipulação e processamento (TODD et al., 2007).

Em função da sua capacidade de crescimento em uma ampla gama de temperaturas, pH e concentrações de sal, *S. aureus* pode se desenvolver em diversos tipos de alimentos (SCHMITT et al., 1990; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003), sendo de grande importância naqueles onde a microbiota normal já foi destruída ou inibida, como em produtos salgados (RODE et al., 2007).

Com base no que foi exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a tolerância de isolados de *S. aureus* provenientes de pescado salgado frente a diferentes concentrações de sal (NaCl).

2. METODOLOGIA

Inicialmente, um total de 18 isolados (n = 18) de *S. aureus* provenientes de amostras de pescado salgado, já confirmados fenotípica e genotipicamente, foram cultivados em 3 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 37°C por 24h. Após o cultivo em condições ideais de crescimento, foram realizadas diluições decimais seriadas até 10⁻⁵, das quais alíquotas de 0,1 mL foram semeadas, em duplicata, em placas de Petri contendo ágar padrão para contagem (PCA) e incubadas a 37°C por 48h. Transcorrido esse período, determinou-se o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL⁻¹). Três novos repiques foram realizados para cada cepa de *S. aureus*, onde 0,3 mL do cultivo inicial foram transferidos para 3 mL de caldo BHI contendo diferentes concentrações de NaCl (10%, 20% e 30%),

seguido de incubação a 37°C por 48h. Após, adotou-se o mesmo procedimento listado acima para a determinação de UFC.mL⁻¹ (SILVA et al., 2010).

As contagens bacterianas foram avaliadas estatisticamente através do programa Statistica 7.0, após a conversão dos resultados para unidades logarítmicas. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, utilizando análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% (p<0,05). Diferenças significativas foram verificadas pelo Teste dos Mínimos Quadrados de Fisher – Teste LSD (p<0,05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se diferença significativa (p<0,05) no crescimento de *S. aureus* em função da concentração salina (Tabela 1), onde a maior média de contagem foi observada após o micro-organismo ter sido exposto a 10% de NaCl (5,9 Log UFC.mL⁻¹), não diferindo estatisticamente do cultivo inicial em condições ideais de crescimento (6,1 Log UFC.mL⁻¹). Além disso, a média de contagem de *S. aureus* foi significativamente inferior na concentração de 30% de NaCl (4,7 Log UFC. mL⁻¹) quando comparada às demais condições salinas testadas e ao cultivo inicial.

Tabela 1 – Médias de contagem de *S. aureus* em diferentes condições de crescimento.

Condição de crescimento	Log UFC.mL ⁻¹
Ideal*	6,1 ^a
10% NaCl	5,9 ^a
20% NaCl	5,1 ^b
30% NaCl	4,7 ^c

*37°C/24h e ausência de NaCl.

Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (p>0,05).

Estes resultados demonstram a tolerância e a capacidade de multiplicação de *S. aureus* mesmo em altas concentrações de sal, indo de encontro ao estudo de TSAI et al. (2011), onde nenhum crescimento de *S. aureus* foi verificado em meio de cultura contendo 25% de NaCl.

Segundo AMIN, LASH e WILKINSON (1995), alguns osmoprotetores, como colina, glicina betaína e prolina, acumulam-se nas células de *S. aureus* em resposta ao estresse osmótico causado pela presença de sal. No estudo de TSAI et al. (2011), avaliando a composição fosfolipídica de *S. aureus*, foi observado que o nível de cardiolipina, um fosfolípido contendo quatro grupos acila, é fundamental para a aptidão estafilocócica a longo prazo em condições de alta salinidade.

Além disso, *S. aureus* possui várias outras características envolvidas na tolerância ao sal, como a presença do gene *brnQ*, que codifica um transportador de aminoácidos de cadeia ramificada (VIJARANAKUL et al., 1998), e do gene *arsR*, regulador do operon arsênico (SCYBERT et al., 2003). A presença da proteína de parede celular Ebh também está envolvida na tolerância à pressão hiperosmótica (KURODA et al., 2008).

No Brasil, a Portaria nº 52 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do pescado salgado e do pescado salgado seco, estabelecendo um limite de, no mínimo, 10% de sal para esses produtos (BRASIL, 2000). Já o CODEX

ALIMENTARIUS (1989), estabelece que os teores de sal não devem ser inferiores a 12%.

Estudos realizados no Brasil demonstram que os teores de sal em pescado salgado e em pescado salgado seco comercializados no país variam entre 19,9 e 25,8% (VICTORIA; LIMA; SANT'ANA, 2011; BALTAZAR et al., 2013). Nessas concentrações de sal, a microbiota normal do alimento tende a ser rapidamente destruída ou inibida. Aliado a isso, condições impróprias de manipulação, processamento e armazenamento, ou situações onde há abuso de temperatura, resultam em níveis elevados ($>5 \text{ Log UFC.g}^{-1}$) de *S. aureus* no alimento, permitindo a produção de enterotoxinas estafilocócicas (EEs) (PEDRO et al., 2004; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2012).

Portanto, embora a salga seja uma das técnicas mais antigas e utilizadas em todo o mundo para retardar a deterioração dos alimentos (THORARINSDOTTIR et al., 2004), micro-organismos halofílicos e halotolerantes, como *S. aureus*, conseguem se desenvolver com facilidade em altas concentrações de sal, podendo causar riscos à saúde dos consumidores.

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *S. aureus* isoladas de pescado salgado foram capazes de tolerar e multiplicar-se em todas as condições salinas testadas. Como o desenvolvimento mais expressivo foi observado na presença de 10% de NaCl, o qual não diferiu das condições ideais de crescimento, é possível inferir que, nesta concentração salina, não há restrição ao crescimento do micro-organismo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN, U. S.; LASH, T. D.; WILKINSON, B. J. Proline betaine is a highly effective osmoprotectant for *Staphylococcus aureus*. **Archives of Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 138-142, 1995.

BALTAZAR, C. et al. Qualidade do bacalhau salgado seco comercializado em temperatura ambiente e refrigerado. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 236-242, jul./set. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Portaria nº 52, de 29 de dezembro de 2000**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Standard for Salted Fish and Dried Salted Fish of the Gadidae Family of Fishes**. Codex Stan 167. 1989. 10 p.

KURODA, M. et al. *Staphylococcus aureus* giant protein Ebh is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 374, n. 2, p. 237-241, 2008.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning (Review). **Genetic and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

PEDRO, S. et al. Pathogenic bacteria and indicators in salted cod (*Gadus morhua*) and desalted products at low and high temperatures. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 13, n. 3, p. 39-48, 2004.

RODE, T. M. et al. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 372-383, 2007.

SCHMITT, M. et al. Temperature limits of growth, TNase, and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 1-19, 1990.

SCYBERT, S. et al. NaCl-sensitive mutant of *Staphylococcus aureus* has a Tn917-lacZ insertion in its *ars* operon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, n. 2, p. 171-176, 2003.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 4ed.

THORARINSDOTTIR, K. A.; ARASON, S.; BOGASON, S. G.; KRISTBERGSSON, K. The effects of various salt concentrations during brine curing of cod (*Gadus morhua*). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 79-89, 2004.

TODD, E. C.; GREIG, J. D.; BARTLESON, C. A.; MICHAELS, B. S. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 3. Factors contributing to outbreaks and description of outbreak categories. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 2199–2217, 2007.

TSAI, M et al. *Staphylococcus aureus* requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity. **BioMedCentral Microbiology**, v. 11, n. 13, p. 1-12, 2011.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; LÓPEZ-CABO, M.; SAÁ-IBUSQUIZA, P.; RODRÍGUEZHERRERA, J. J. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 286-296, 2012.

VICTORIA, E. J.; LIMA, M. O.; SANT'ANA, L. S. Determinação de atividade de água, umidade e sal em peixes salgados e secos importados. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 125-129, abr./jun. 2011.

VIJARANAKUL, U. et al. Cloning and nucleotide sequencing of a *Staphylococcus aureus* gene encoding a branched-chain-amino-acid transporter. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 763-767, 1998.