

AUTORES
AUTHORS

✉ **Neliane Ferraz de Arruda SILVEIRA**
Pesquisadora Científica do Instituto de
Tecnologia de Alimentos-ITAL, Av. Brasil, 2880
13073-001 Campinas-SP - Brasil
e-mail: nferraz@ital.org.br

Mauro Faber de Freitas LEITÃO
Engenheiro Agrônomo pela ESALQ, Professor doutor
convocado do Departamento de Tecnologia de
Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos-
UNICAMP, Caixa Postal 6121, CEP 13083-970 Campinas SP
e-mail: leitao@correionet.com.br

Vera Lúcia Signorelli BALDINI
Pesquisadora Científica do Centro de Química de
Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de
Tecnologia de Alimentos-ITAL,
doutora em Ciência de Alimentos pela USP,
Av. Brasil, 2880, 13073-001 Campinas-SP - Brasil
e-mail: vbaldini@ital.org.br

Alcides Ribeiro TEIXEIRA FILHO
Pesquisador Científico do Instituto de Pesca
São Paulo, Parque da Água Branca, São Paulo-SP

RESUMO

A pesquisa foi conduzida objetivando a avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota total e produtora de histamina na superfície de truta (*Oncorhynchus myrkis*), carpa (*Cyprinus carpio*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*), coletadas em quatro épocas do ano, em três estações experimentais do Estado de São Paulo: Campos do Jordão, São Paulo e Pindamonhangaba, respectivamente. As amostras foram analisadas para contagem total e bactérias produtoras de histamina em ágar Níven. Quanto à microbiota total, observou-se uma predominância de psicrotópicos nos meses de inverno em Campos de Jordão, e de mesófilos no verão, em todas as regiões. Na microbiota presumivelmente histamina-positiva foram caracterizadas bactérias das famílias: *Vibrionaceae* (48,7%), *Pseudomonadaceae* (22,4%) e *Enterobacteriaceae* (16,3%). As bactérias histamina-positivas foram isoladas em número reduzido, sendo 17 culturas confirmadas em um total de 49 culturas presumivelmente positivas. *Morganella morganii* foi a única espécie bacteriana comum a todas as amostras. Três culturas histamina-positivas: *Morganella morganii*, *Plesiomonas shigelloides* e *Aeromonas hydrophila*, foram testadas qualitativamente quanto à capacidade de descarboxilação de arginina, lisina e tirosina, bem como quantificadas para produção de histamina em caldo de Níven, com incubação nas temperaturas de 5°C, 15°C e 30°C, durante 1, 3 e 6 dias. A 5°C nenhuma cultura evidenciou atividade descarboxilante, sendo constatada uma maior atividade das bactérias sobre a arginina, comparativamente aos outros aminoácidos testados. *Morganella morganii* demonstrou ter o maior potencial de descarboxilação dos aminoácidos, bem como produziu histamina em níveis considerados tóxicos (>100mg/100ml), em caldo de Níven a 30°C/1 dia e a 15°C/3dias.

SUMMARY

The main objective of this research was to evaluate the total and histamine producing microflora isolated from the surface of the following freshwater fish species: trout (*Oncorhynchus myrkis*), "tilápia" (*Oreochromis niloticus*) and carp (*Cyprinus carpio*), collected during the four seasons of the year, in 3 experimental breeding stations located in São Paulo State, Brazil, in the cities of Campos do Jordão, São Paulo, and Pindamonhangaba, respectively. The samples were analysed for their total microbial count and histamine producing bacteria, using Niven agar as the culture medium. With respect to the general microflora, a predominance of psychrotrophic microorganisms was observed in Campos de Jordão during the winter, and a predominance of mesophilic bacteria in all regions during the summer. Of the presumptive his+ bacteria, isolated the following were characterized: *Vibrionaceae* (48.7%), *Pseudomonadaceae* (22.4%) and *Enterobacteriaceae* (16.3%). Histamine producing bacteria were found in low numbers, with only 17 isolates being confirmed from a total of 49 presumptive his+ colonies. *Morganella morganii* (*Enterobacteriaceae*), was the only bacteria found in all the samples. Three histamine-positive isolates: *Morganella morganii*, *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonas hydrophila* were tested qualitatively for the production of arginine, lysine and tyrosine decarboxylases, and also for histamine production in Niven broth, with incubation at 15°C and 30°C, for 1, 3, and 6 days. At 5°C, no decarboxylation activity was detected and better activity of the isolates with arginine was observed, when compared to the other aminoacids. *Morganella morganii* showed the greatest aminoacid decarboxylation activity, and also produced histamine at toxic levels (>100mg/100ml or g) in Niven broth, at 30°C/1 day and at 15°C/3 days.

PALAVRAS-CHAVE
KEY WORDS

Bactérias produtoras de histamina, Histamina, Peixes fluviais, Carpa, Tilápia, Truta / Histamine-producing bacteria, Histamine, Fresh river fish, Histamine.

1. INTRODUÇÃO

A intoxicação mais comum por aminas biogênicas em alimentos envolve a histamina, amina primária, (4 (2-amino-etil)imidazol), que se origina da descarboxilação do aminoácido L-histidina presente na forma livre em vários tipos de alimentos, como embutidos e outros produtos cárneos, bebidas fermentadas, queijos maturados e especialmente peixes (SERRAR *et al.*, 1994, ACTIS *et al.*, 1999). É fundamental destacar que o processo de descarboxilação de aminoácidos é decorrente da atividade exclusiva de microrganismos produtores da enzima histidina descarboxilase, ausente naturalmente nos tecidos dos alimentos (LEITÃO *et al.*, 1988, LUTEN *et al.*, 1992, HUSS, 1999).

De acordo com ACTIS *et al.* (1999), a intoxicação alimentar histamínica tem grande probabilidade de ocorrer após o consumo de alimentos contaminados por uma microbiota conhecida como bactérias produtoras de histamina. Alguns autores até apontam a formação de histamina como bom indicador de contaminação e de práticas higiênicas deficientes em pescado (BALDINI, 1982, TAYLOR, 1985, LEITÃO, 1988, BRANDÃO, 1996, FÉBROUT *et al.*, 2000).

O processo patológico da intoxicação histamínica caracteriza-se por um período curto de incubação (minutos a poucas horas) e também por um período curto de duração (algumas horas). Os sintomas mais freqüentemente observados são: diminuição da pressão sangüínea em consequência de vasodilatação; urticária; cefaléia; palpitações cardíacas; tonturas; desfalecimento; segura na boca e garganta; eritema no rosto e pescoço, disfagia, podendo ocorrer choque anafilático (HARVIMA *et al.*, 1999). Segundo TAYLOR *et al.* (1978), peixes contendo altos níveis de histamina nem sempre evidenciam deterioração, aumentando assim a probabilidade de que produtos aparentemente inalterados, porém potencialmente tóxicos, possam estar sendo oferecidos ao consumidor. Quando os níveis acumulados no alimento atingem valores superiores a 100mg/100g, o risco de intoxicação é elevado e o produto se torna impróprio para consumo humano (IENISTEA, 1973). Para a prevenção da formação de altos níveis de histamina no pescado, deve-se assegurar que o mesmo não seja mantido em temperaturas na faixa de 15°C a 35°C, por períodos muito prolongados, uma vez que é neste intervalo que as bactérias produtoras de histamina evidenciam máxima atividade (LEITÃO *et al.*, 1983a). KIM *et al.* (2000), estudando a influência da temperatura de abuso na produção de histamina em pescado salgado inoculado com bactérias histamina-positivas, observaram que o maior nível de produção de histamina foi obtido à temperatura de 25°C. Em relação ao pH do substrato, IENISTEA (1973) observou que o valor ótimo para a produção de histamina variava entre 5,0 e 5,5, ao passo que ARNOLD, BROWN (1978) constataram que a atividade máxima da histidina-descarboxilase situava-se na faixa de pH de 5,5 a 6,5.

Segundo alguns autores (TAYLOR, 1990, SHALABY, 1994), outro aspecto relevante é que a atividade tóxica de histamina é potencializada pela presença de outras aminas biogênicas, como a tiramina, a cadaverina e a putrescina, formadas pela descarboxilação microbiana dos respectivos aminoácidos encontrados na forma livre, ou seja, tirosina, lisina e arginina. De acordo com vários pesquisadores (SHALABY, 1994, FLETCHER

et al., 1999, KIM *et al.*, 1999), esse mecanismo ainda não está bem elucidado, mas sabe-se que essas outras aminas inibem as enzimas histamina metil transferase e mono e di-amino-oxidases, que durante o processo metabólico catabolizam a histamina exógena oriunda do alimento contaminado.

Em relação à microbiota de importância no processo de descarboxilação da histidina livre presente em alimentos, autores como ARNOLD, BROWN (1978), CATTANEO, CANTONI (1978), LEITÃO *et al.* (1983b), (1997) e FLETCHER *et al.* (1999), em pesquisas conduzidas em diferentes países, constataram que bactérias da família *Enterobacteriaceae* são as mais ativas, destacando como principal espécie *Morganella morganii*, seguida de espécies dos gêneros *Klebsiella*, *Hafnia* e *Escherichia*. Segundo TAYLOR (1986) e ABBABOUCH (1991), *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei* são as bactérias mais comumente responsabilizadas em surtos de intoxicação histamínica.

A maioria dos estudos relacionados à presença de histamina em pescado e caracterização da microbiota são restritos às espécies de origem marinha. Já em relação aos peixes de origem fluvial ou lacustre, os dados da literatura são muito escassos. No Brasil, a atividade de piscicultura vem gradativamente ocupando uma posição de destaque, tanto no aspecto de produção como no econômico, representando uma alternativa significativa para o pescado de origem marinha. Além disso, as atividades recreativas envolvendo peixes de água doce, como os "pesque-e-pague", vêm sendo implantadas com sucesso em vários estados do País, demonstrando ser uma atividade produtiva, competitiva e lucrativa. Nestas condições, pesquisas que forneçam informações tecnológicas e/ou que abordem aspectos de saúde pública são relevantes. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo a avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota bacteriana total e histamina-positiva presentes na superfície de algumas espécies de peixes de origem fluvial ou lacustre, de importância em projetos de aquicultura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material e procedimento de amostragens

Os estudos foram efetuados analisando-se 3 espécies diferentes de peixes a saber, a tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), a carpa (*Cyprinus carpio*) e a truta arco-íris (*Oncorhynchus myrkis*). Exemplares destas espécies foram capturados em tanques de criação do Instituto de Pesca, localizados nas cidades de Pindamonhangaba (tilápias), São Paulo (carpas) e Campos do Jordão (trutas). As amostragens foram efetuadas em 4 épocas diversas ao longo do ano, correspondentes às diferentes estações. Em cada amostragem foram coletados 5 exemplares de cada espécie em estudo, embalados em sacos plásticos e acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo em escamas, seguido de transporte imediato ao laboratório do Núcleo de Microbiologia do ITAL, Campinas, SP. Assim, no total foram examinadas 60 unidades de amostra, sendo estudadas 20 unidades para cada espécie de peixe.

2.2 Procedimento experimental

2.2.1 Contagem microbiana total de psicrotróficos e mesófilos e de bactérias presuntivamente histamina-positivas em ágar Níven

A obtenção de amostras para a análise microbiológica foi feita na superfície de cada exemplar de peixe, utilizando-se a técnica de zaragatoa (swab), que era friccionada em 2 (duas) áreas de 2x5cm (10cm²), delimitadas por moldes metálicos na região dorsal de cada peixe examinado, totalizando assim 20cm² de área amostrada/exemplar. A seguir, as zaragatoas eram colocadas em tubos contendo 5mL de água peptonada 0,1%, seguido de agitação em agitador vibratório tipo vortex. A partir das suspensões iniciais foram preparadas diluições decimais sucessivas em água peptonada 0,1%, seguido da adição de 1mL de cada diluição em placas de Petri. A seguir, adicionou-se o meio de diferenciação para bactérias histamina-positivas (ágar Níven), contendo triptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, L-histidina 2,7%, HCl 0,5%, NaCl 0,5%, CaCO₃ 0,1%, ágar 2,0%, e vermelho de cresol 0,02% (NIVEN *et al.*, 1981), utilizando-se a técnica de *pour plate*, com sobrecamada do mesmo meio. Em continuação, as placas foram incubadas nas temperaturas de 35°C e 20°C, por períodos de 48 e 72 horas, respectivamente, caracterizando-se a população de mesófilos (35°C), psicrotróficos (20°C) totais que cresceram nesse meio, e diferenciando-se as colônias típicas presuntivamente positivas, caracterizadas pela presença de um halo arroxeadado, indicativo da alcalinização do meio pela presença da amina. Os resultados foram expressos em Log UFC/cm².

2.2.2 Identificação das culturas presuntivamente histamina-positivas e confirmação de capacidade de produção de histamina

As culturas típicas presuntivamente histamina-positivas foram submetidas à identificação de gênero ou espécie, de acordo com KRIEGH, HOLT (1994) e com auxílio do sistema bioquímico miniaturizado Crystal-BD (BBL), que utiliza substratos cromogênicos e convencionais modificados.

Após identificação, as culturas presuntivamente histamina-positivas foram confirmadas quanto a esta capacidade, por meio de uma seqüência de testes propostos por YOSHINAGA, FRANK (1982), a saber:

- Inoculação da cultura em tubos contendo ágar Níven modificado (triptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, L-histidina 2%, NaCl 0,5%, vermelho de bromocresol 0,02%, ágar 1,5%).
- Crescimento em caldo de Níven modificado, acrescido de 0,1% de glicose e mantido em tubos contendo tubos de Duhran invertidos.

As culturas presuntivamente histamina-positivas foram consideradas confirmadas pela produção de gás no caldo de Níven, com desenvolvimento de coloração roxa intensa devido à alcalinização do meio.

2.2.3 Avaliação presuntiva da produção *in vitro* de outras aminas biogênicas

As culturas mencionadas no item 2.2.2 também foram analisadas quanto à capacidade de descarboxilação de arginina, lisina e tirosina, com produção das respectivas aminas. O meio de cultivo utilizado foi o proposto por YAMANII, UNTERMANN (1992) (peptona bacteriológica 0,2%, NaCl 0,5% aminoácido teste 1%, vermelho de clorofenol 0,2%), sendo a reação positiva baseada na mudança de coloração do indicador para uma tonalidade arroxeadada e elevação do pH inicial de 5,3 para valores acima de 7,1.

As culturas testadas foram incubadas nas temperaturas de 5,15 e 30°C, por períodos máximos de 6 dias.

2.2.4 Quantificação de histamina produzida *in vitro* por culturas selecionadas

Com base na freqüência de ocorrência na microbiota contaminante e na capacidade de produção de histamina, previamente testadas, foram selecionadas algumas culturas para estudos complementares de quantificação da produção de histamina. Assim, essas culturas foram inoculadas em caldo de Níven seguido de incubação a 5, 15 e 35°C, com dosagem de histamina nos intervalos de 1, 3 e 6 dias. A quantificação dos teores de histamina foi feita de acordo com a metodologia proposta por FOO (1975) e CATTANEO, CANTONI (1978), empregando cromatografia ascendente em papel, eluição das bandas em metanol e leitura em espectrofotômetro a 500nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que se refere às contagens de bactérias totais em ágar Níven, observou-se que as populações iniciais foram relativamente baixas, com um máximo de Log 4,76 UFC/cm², não atingindo os limites máximos estabelecidos nas especificações de qualidade de pescado que é de Log 7,0 UFC/cm² (HUSS, 1993). Na época de inverno, em Campos do Jordão, onde a temperatura média da água estava ao redor de 8°C, houve a prevalência de microbiota psicrotrófica, enquanto no verão (temperatura média da água ao redor de 21°C) uma microbiota mesófila predominou em todas as regiões. Nas outras estações do ano, nas quais as oscilações de temperatura não foram pronunciadas, foi observado um relativo equilíbrio entre a microbiota mesófila e psicrotrófica (Tabela 1).

É importante destacar que os valores de contagem total de bactérias em ágar Níven observados, provavelmente são inferiores aos que seriam constatados pelo uso de meios como ágar-padrão de contagem ou ágar tripticase soja, que têm uma composição e valor de pH mais adequados ao crescimento microbiano de um modo geral. No entanto, NIVEN *et al.* (1981), estudando o ágar Níven em comparação com o meio ágar-padrão para contagem (Plate Count Agar, DIFCO), observaram que as contagens bacterianas totais eram mais baixas do que as obtidas em ágar-padrão apenas um ciclo logarítmico, valor

esse considerado irrelevante por esses mesmos autores, que citaram ainda a inviabilidade da utilização de meios de cultura para contagem-padrão quando se objetivava a identificação de microbiota produtora de histamina, uma vez que estes meios não possibilitam a diferenciação. LEITÃO *et al.* (1983a) consideraram o meio de ágar Níven como sendo o mais adequado para identificar as bactérias presuntivamente histamina-positivas, uma vez que as colônias típicas se apresentam maiores que as demais e são de uma coloração roxa característica, envoltas em um halo dessa mesma cor. Quanto ao pH mais baixo desse meio de cultura, convém mencionar que é um fator intrínseco importante, uma vez que valores de pH mais adequados à produção da histamina se encontram na faixa de 5,0 a 5,5 (IENESTEVA, 1973). Por outro lado, foi observado na presente pesquisa que as contagens de bactérias histamina-positivas foram muito reduzidas, em praticamente todas as amostras analisadas, indicando ser esta população bastante restrita nos peixes de origem fluvial. No total de unidades de amostras analisadas (60), foram isoladas apenas 49 culturas presuntivamente histamina-positivas. Os dados se encontram na Tabela 2.

TABELA 1. Microbiota mesófila (35°C) e psicrotrófica (20°C) em superfície de peixes de origem fluvial ou lacustre.

Natureza da amostra	Contagem (Log UFC/cm ²)*							
	Época I (Primavera 17°C)**		Época II (Verão 21°C)**		Época III (Outono 18°C)**		Época IV (Inverno 8°C)**	
	20°C	35°C	20°C	35°C	20°C	35°C	20°C	35°C
Carpa	2,04	2,04	2,38	4,46	3,54	1,54	4,76	2,53
Tilápia	2,49	2,19	1,70	4,59	2,92	2,25	2,88	1,40
Truta	3,27	2,39	3,46	3,68	3,54	2,66	4,07	1,60

*Média de 5 repetições por espécie de peixe.

**Temperatura média dos tanques de criação na época da coleta.

TABELA 2. Espécies de culturas presuntivamente histamina-positivas, isoladas da superfície de peixes de origem fluvial ou lacustre.

Microrganismo	Origem das culturas						Total	
	Carpa		Tilápia		Truta		N ^o	%
	20°C	35°C	20°C	35°C	20°C	35°C		
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-	-	01	-	-	-	01	2,0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	03	-	03	02	01	-	09	18,4
<i>Aeromonas veronii</i>	01	-	-	-	-	-	01	2,0
<i>Citrobacter freundii</i>	03	-	-	-	-	-	03	6,1
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	-	-	01	01	-	-	02	4,1
<i>Kluyvera ascorbata</i>	-	-	-	01	-	-	01	2,0
<i>Morganella morganii</i>	01	-	02	01	01	-	05	10,2
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	07	-	03	04	01	01	16	32,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	02	-	-	-	02	4,1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	02	-	-	-	-	-	02	4,1
<i>Pseudomonas putida</i>	03	-	01	-	-	01	05	10,2
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-	02	-	-	-	02	4,1
TOTAL	20	0	15	09	03	02	49	100

De início, observou-se que a maioria das culturas presuntivamente histamina-positivas foi isolada à temperatura de 20°C indicando, portanto, a predominância de espécies psicrotróficas na microbiota presuntivamente produtora de histamina das amostras de peixes estudadas. Na temperatura de 35°C, apenas 11 (20,5%) das culturas evidenciaram este comportamento.

Outra observação interessante é que, independentemente da temperatura de incubação, houve uma prevalência de bactérias presuntivamente histamina-positivas nos peixes provenientes de águas mais quentes, características das regiões de São Paulo e Pindamonhangaba, em comparação aos peixes oriundos de águas mais frias, caso específico da região de Campos do Jordão. Assim, 44 culturas (89,8%) eram provenientes das primeiras regiões e apenas 5 (10,2%) foram isoladas das trutas capturadas em Campos do Jordão.

Por outro lado, analisando-se a prevalência de bactérias presuntivamente histamina-positivas em função da espécie de peixe, constatou-se a maior ocorrência em tilápias (24 culturas, 49,0%), seguido de carpas (20 culturas, 40,8%), e finalmente de trutas (5 culturas, 10,2%). É evidente que estes comentários devem ser analisados com precaução, pois inúmeros fatores, além da espécie de peixe e condições de temperatura, podem influir na natureza da microbiota contaminante, entre eles a qualidade e o teor de matéria orgânica nas águas dos tanques, contaminação fecal do manancial, entre outros.

A reduzida presença das bactérias histamina-positivas nas amostras analisadas vem confirmar observações de outros autores, mesmo trabalhando com amostras diversas. Assim LEITÃO *et al.* (1983a), estudando bactérias histamina-positivas em pescado de origem marinha, observaram uma ocorrência de reduzidas populações desses microrganismos nesse tipo de peixe, atribuindo tal fato às deficiências do ágar Níven. No entanto, de acordo com esses mesmos autores, independente de ser adequado como substrato, o ágar Níven é um excelente meio de diferenciação, que possibilita a evidente caracterização de culturas histamina-positivas. GENNARI *et al.* (1999), estudando a microbiota de sardinhas frescas (*Sardinella pilchardus*), capturadas no mar Mediterrâneo, observaram a predominância das bactérias deteriorantes, principalmente *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.* e *Shewanella sp.*, e em menor proporção, as da família *Enterobacteriaceae*, sendo que *Morganella morganii* foi a única espécie bacteriana confirmada como produtora de histamina, em um total de 57 culturas isoladas.

Em relação à identificação da microbiota presuntivamente histamina-positiva na presente pesquisa caracterizou-se a predominância de espécies da família *Vibrionaceae* (26 culturas, 53,1%), *Pseudomonadaceae* (11 culturas, 22,4%) e *Enterobacteriaceae* (9 culturas, 18,4%). Quando consideradas individualmente, conforme mostra a Tabela 2, houve a prevalência de *Plesiomonas shigelloides* (32,6%), *Aeromonas hydrophila* (18,4%) e *Morganella morganii* (10,2%) entre as espécies presuntivamente histamina-positivas.

Ao lado da eventual capacidade de produção de histamina, a presença de *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides* reveste-se de grande importância no aspecto de

saúde pública. Estas espécies têm como habitat principal o ambiente aquático, principalmente fluvial, e por essa razão são detectadas com frequência na microbiota de peixes de águas fluviais ou lacustres. Conforme relatado por KIROV (1997), existem fortes evidências em relação à patogenicidade destas espécies, podendo provocar gastroenterites e, por vezes, infecções extra-intestinais (endocardites, pneumonia, conjuntivite, infecções renais, etc.)

As culturas isoladas e identificadas como prováveis produtoras de histamina foram submetidas a testes confirmatórios propostos por YOSHINAGA, FRANK (1982), como descrito no item 2.2.2. Os resultados obtidos constam da Tabela 3.

TABELA 3. Bactérias produtoras de histamina isoladas da superfície de peixes de origem fluvial ou lacustre, confirmadas segundo YOSHINAGA, FRANK (1982).

Microorganismos*	Número de presuntivos	Confirmados**	%
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	01	0	0,0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	09	03	33,3
<i>Aeromonas veronii</i>	01	0	0,0
<i>Citrobacter freundii</i>	03	03	100
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	02	0	0,0
<i>Kluyvera ascorbata</i>	01	0	0,0
<i>Morganella morganii</i>	04	04	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	17	05	29,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	02	0	0,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	02	01	50,0
<i>Pseudomonas putida</i>	05	01	20,0
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	02	0	0,0
TOTAL	49	17	34,7

* Culturas incubadas a temperaturas de origem do isolamento (20°C ou 35°C).

**Número de espécies microbianas que apresentaram reações positivas com até 48h de incubação.

Uma observação prática de grande importância foi a constatação de que espécies que apresentaram reação intensa em ágar Níven, como *M. morganii*, foram integralmente confirmadas como histamina-positivas, segundo os procedimentos de YOSHINAGA, FRANK (1992). Já as demais culturas, que apresentaram reação positiva menos intensa, tiveram um percentual reduzido de confirmação no teste citado. Exceção feita a uma cultura de *Morganella morganii*, todas as demais bactérias confirmadas como produtoras de histamina foram originalmente isoladas a 20°C.

LEITÃO, SILVEIRA (1993), estudando a microbiota produtora de histamina em pescado de origem marinha, constataram que a temperatura para essas bactérias atuarem com maior intensidade situa-se na faixa entre 10 e 25°C. Essa observação é concordante com os dados de BRANDÃO (1996) e KIM *et al.* (2000) que comprovaram que as descarboxilases bacterianas são mais ativas em temperaturas inferiores a 30°C.

A Tabela 4 apresenta os resultados presuntivos dos testes de descarboxilação *in vitro* de aminoácidos relevantes pelas culturas histamina-positivas, capazes de gerar outras amins biogênicas, que podem potencializar a ação da histamina. De um modo geral, observou-se que a 5°C nenhuma das culturas testadas evidenciou atividade descarboxilante, indicando novamente que a refrigeração seria a principal medida preventiva ou barreira para evitar a formação de amins no pescado.

TABELA 4. Descarboxilação de diferentes aminoácidos por bactérias isoladas de peixes de origem fluvial ou lacustre, sob diferentes condições de incubação.

Incubação	Espécies bacterianas e descarboxilação de aminoácidos*									
	<i>A. hydrophila</i>			<i>M. Morganii</i>			<i>P. shigelloides</i>			
	ARG	LIS	TIR	ARG	LIS	TIR	ARG	LIS	TIR	
1 dia	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15°C	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	30°C	+	-	-	+	+	+	+	+	-
3 dias	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15°C	+	-	+	+	+	+	+	-	-
	30°C	+	-	+	+	+	+	+	+	-
6 dias	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	30°C	+	-	+	+	+	+	+	+	-

*Aminoácidos =ARG= arginina, LIS= lisina, TIR = tirosina.

Em temperaturas de 15°C, os resultados foram variáveis com *M. morganii*, revelando maior atividade comparativamente às outras espécies. Este comportamento é similar ao constatado em relação à produção de histamina, sendo que as culturas de *A. hydrophila* e principalmente de *P. shigelloides* foram bem menos ativas que *M. morganii*. Também foi observado que *A. hydrophila* descarboxilou a lisina apenas no sexto dia de incubação a 15°C, enquanto *P. shigelloides* não mostrou nenhuma atividade descarboxilante sobre a tirosina.

No entanto, em relação à arginina, foi constatado que todas as bactérias selecionadas mostraram ter ação descarboxilante, observando-se resultados positivos (+) em todas elas, no primeiro dia, à temperatura de 15°C.

Em resumo, constatou-se que *Morganella morganii* foi a bactéria que apresentou maior potencial de descarboxilação dos aminoácidos estudados, nas diferentes condições de incubação analisadas. Muitos autores descrevem ser esta bactéria a que possui maior atividade descarboxilante sobre os aminoácidos que se encontram na forma livre na superfície do pescado, especialmente a histidina (TAYLOR, 1986, 1990, CHEN *et al.*, 1989, LISTON, 1990, ABABOUCHE, 1991, KIM *et al.*, 2000). BRANDÃO (1996) obteve resultados semelhantes ao estudar o potencial de descarboxilação de outros aminoácidos por enterobactérias isoladas de peixes de origem fluvial ou lacustre, encontrando que *M. morganii* demonstrou ter potencial para descarboxilar a maioria dos aminoácidos pesquisados, quando incubado em temperatura de 36°C.

Os aminoácidos testados neste estudo têm importância em relação à eventual formação de aminas que potencializam o efeito tóxico da histamina em pescado; assim sendo, os dados obtidos relativos ao potencial de descarboxilação dos mesmos, levam a concluir que, de maneira geral, temperaturas acima de 15°C, facilmente observadas em condições precárias de armazenamento de pescado, podem possibilitar a formação de outras aminas biogênicas como a cadaverina, tiramina, e especialmente a putrescina.

Os resultados referentes à avaliação quantitativa da produção de histamina pelas três bactérias selecionadas estão na Tabela 5.

TABELA 5. Avaliação quantitativa da produção de histamina (mg/100g) por bactérias inoculadas em caldo de Níven (NIVEN *et al.*, 1981) sob diferentes condições de incubação*.

Microrganismo	Produção de histamina (mg/100g)**								
	1 dia			3 dias			6 dias		
	5°C	15°C	30°C	5°C	15°C	30°C	5°C	15°C	30°C
<i>A. hydrophila</i>	nd***	4,0	4,6	nd	4,9	4,10	nd	4,5	6,20
<i>M. morgani</i>	3,1	8,5	107,0	nd	124,0	114,0	3,6	110,0	65,3
<i>P. shigelloides</i>	nd	nd	2,9	nd	nd	17,7	nd	8,40	47,5

* média de análises em triplicata

**mg/100g = miligramas por 100 gramas

***nd = não detectada

Pela análise dos resultados contidos na Tabela 5, verificou-se que tanto *A. hydrophila* quanto *P. shigelloides* não demonstraram ter uma intensa capacidade de produção de histamina, sendo que *P. shigelloides* produziu uma quantidade mais acentuada apenas no sexto dia de incubação, a 30°C. Por outro lado, *A. hydrophila* evidenciou produção baixa e praticamente constante a partir do primeiro dia, nas temperaturas de 15 e 30°C, atingindo seu máximo no sexto dia a 30°C.

A produção de histamina a 5°C foi muito baixa ou nula, comprovando novamente, a importância da refrigeração adequada no controle da produção da amina. Em relação à *M. morgani*, observou-se que a cepa testada apresentou um máximo de produção de histamina a 15°C no terceiro dia de incubação (124mg/100g), demonstrando ser esse binômio tempo/temperatura o ideal para que essa bactéria produza quantidades de histamina acima do nível crítico de 100mg/100g, considerado como potencial para causar uma intoxicação (IENISTEA, 1973, TAYLOR, 1985). No sexto dia de incubação, esses valores sofreram um pequeno decréscimo, provavelmente devido à ação das histaminases (LEITÃO, 1988, BRANDÃO, 1996). Convém ainda destacar que valores de histamina acima de 100mg/100g foram produzidos por *M. morgani* tanto a partir do primeiro dia a 30°C (107mg/100mL) como no terceiro dia a 15°C (124,14mg/100mL). Quando comparados com dados de outros autores como ARNOLD, BROWN (1978), LEITÃO *et al.* (1983) e FLETCHER *et al.* (1999), os resultados obtidos nessa pesquisa são concordantes, no sentido de destacar *M. morgani* como o principal microrganismo produtor de histamina em peixes. Estes resultados também deixam evidente que a produção de histamina atingiu valores mais

altos em temperaturas iguais ou superiores a 15°C, confirmando que o armazenamento de pescado em temperaturas de abuso (>15°C), é condição essencial para transformar esse alimento em veículo de intoxicação histamínica. Por outro lado, a refrigeração adequada (temperaturas inferiores ou iguais a 5°C) seria provavelmente a principal barreira para impedir a produção de histamina em níveis potencialmente tóxicos.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABABOUCHE, L. Histamine food poisoning: an update. **Fish Technology News**, **1**(11):3-5, 1991.
- ACTIS, L.A., SMOOT, J.C., BARANCIN, C.E., *et al.* Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. **Journal of Microbiology Methods**, **39**(1):79-90, 1999.
- ARNOLD, S.H., BROWN, D. Histamine toxicity from fish products. **Advances in Food Research**. New York, **24**:114-154, 1978
- BALDINI, V.L.S. Aminas biogênicas e a deterioração do pescado. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**. Campinas, **19**:389-402, 1982.
- BRANDÃO, L.G.B. **Potencial de formação de aminas biogênicas em peixes de piscicultura**. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Universidade federal de Minas Gerais, 1996, 62p.
- CATTANEO, P., CANTONI, C. Identificazione e dosaggio rapido dell'istamina nelle carni di pesce. **Industrie Alimentari**, **17**:303-307, 1978.
- CHEN, C.M., WEI, C.I., KOBURGER, J.A., MARSHALL, M.R. Comparison of four agar media for detection of histamine producing bacteria in tuna. **Journal of Food Protection**, **52**(11):808-813, 1989.
- FLETCHER, G.C., BREMER, P.J., OSBORNE, C.M. Controlling bacterial histamine production in hot-smoked fish In: TUIJTELAARS, A.C.J., SAMSON, R.A.; ROUMBOTS, F.M.; NOTERMANS, S. (eds), **Food Microbiology and Food Safety Into the next Millenium**, Veldhoven, The Netherlands, 1999, p.168-179.
- FOO, L.Y. Simple and rapid paper chromatographic method for the simultaneous determination of histidine and histamine in fish samples. **Journal of AOAC**, **60**:183-185, 1975.
- FRÉBORT, I., SKOUPA, L., PEC, P. Amine oxidase-based flow biosensor for the assessment of fish freshness. **Food Control**, Oxford, **11**(1):113-18, Feb. 2000.
- GENNARI, M., TOMASELLI, S., COTRONA, V. The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) sea and stored in ice. **Food Microbiology**, **16**(1):15-28, 1999
- HARVIMA, R.J., TUOMISTO, L., HUSMAN, T. Repeated hand urticaria due to contact with fishfood. **Scandinavian Journal of Work Environmental and Health**, Helsinki, **25**(2):151-152, 1999.

- HUSS, H.H. **Assurance of Seafood Quality Technological Laboratory.** Technical University Lyngby, Denmark, 1993, 169p.
- IENISTEA, C. Significance and detection of histamine in food. In HOBBS, B.C.; CHRISTIAN, J.H.B. (ed) **The Microbiological Safety of Foods.** London, Academic Press, 1973, p.327-343.
- KIM, S.H., AN, H., PRICE, R.J. Histamine formation and bacterial spoilage of albacore harvested off the US Northwest coast. **Journal of Food Science**, **64**:340-343, 1999.
- KIM, S.H., BEGÓNA, B.G., BARROS-VELÁZQUEZ, J., PRICE, R.J., AN, H. Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore **Journal of Food Protection**, **63**(2):244-251, 2000
- KIROV, S.M. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species, In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J.; (Ed.) **Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers**, 2ed., ASM Press, Washington, D.C.; USA, 1997, p. 265-287.
- KRIEG, N.R., HOLT, J.L. (Ed.) **Bergey's manual of Systematic Bacteriology.** Baltimore, USA, Williams & Wilkins, Vol. I, 1984.
- LEITÃO, M.F.F., BALDINI, V.L.S., UBOLDI EIROA, M.N., DESTRO, M.T. Bactérias produtoras de histamina em pescado de origem marinha. **Coletânea do ITAL**, Campinas, **13**:75-82, 1983a.
- _____, BALDINI, V.L.S., SALES, A.M. Histamina em pescado e alimentos industrializados. **Coletânea do ITAL**, Campinas, **13**:123-130, 1983b.
- _____, Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial ou marinha. In: **Controle de Qualidade do Pescado.** Santos, Leopoldianum, p.40-58, 1988.
- _____, SILVEIRA, N.F.A. Influência da temperatura ambiental na natureza e potencial deteriorador da microbiota bacteriana de peixes em ambientes lacustres tropicais. **Coletânea do ITAL**, Campinas, **23**(1):85-97, 1993.
- _____, RIOS, D.P.F.A., GUIMARÃES, J.G.L., BALDINI, V.L.S., PINTO, C.S.R.M. Alterações químicas e microbiológicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) armazenado sob refrigeração a 5°C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **17**(2):160-166, 1997.
- LIMA DOS SANTOS, C.A. M. The storage of tropical fish in ice. A review. **Tropical Science**, London, **23**(2):97-127, 1981.
- LISTON, J. Microbiology in fishery sciences. In: CONNELL, J.J. (Ed.). **Advances in fish Science and Technology.** Survey Fishing News Books. 1990, p.138-157.
- LUTEN, J.B., BOUQUET, W., SEUREN, L.A.J., BURGGRAAF, M.M., RIECKWEL-BOOY, G., DURAND, P., ETIENNE, M., GOUYOU, J.P., LANDREIN, A., RITCHIE, A., LEQLERC, M., GUINET, R. Biogenic amines in fishery products: Standardization methods within EC. In: HUSS, H., JAKOBSEN, LISTON, J. (Ed.). **Quality assurance in the fish Industry: Proceedings of International Conference.** Copenhagen, Denmark, 1992, p.427-439.
- NÍVEN, C.F.Jr., JEFFREY, M.B., CORLETT, D.A. Differential plating medium for quantitative detection of histamine production bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C. **41**:321-322, 1981.
- SERRAR, D. The development of monoclonal antibody based ELISA for the determination of histamine in food application to the fishery products and comparison with HPLC assay. **Food Chemistry**, **49**:305-310, 1994.
- SHALABY, A.R. Separation, identification and estimation of biogenic amines in food by thin-layer chromatography. **Food Chemistry**, **49**:305-310, 1994.
- TAYLOR, S.L., LIEBER, E.R., LEATHERWOOD, M. A survey of histamine levels in commercially processed scombroid fish products. **Journal of Food Quality**, Westport. **1**:393-397, 1978.
- TAYLOR, S.L. **Histamine poisoning associated with fish, cheese and others foods.** World Health Organization Geneva, 1985, 47p.
- _____. Histamine food-poisoning: toxicology and clinical aspects. **Critical Reviews in Toxicology**, **17**(2):91, 1986.
- _____. Histamine intoxication. In: CLIVER, D.O. (Ed.). **Foodborne diseases.** San Diego Academic Press, 1990, p.164-168.
- YAMANII, M.I., UNTERMANN, F. Development of a histidine decarboxylase medium and its application to detect other aminoacid decarboxylases. **International Journal of Food Microbiology**, **2**:273-278, 1985.
- YOSHINAGA, D.H., FRANK, H. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna. **Applied and Environmental Microbiology**, **44**:447-452, 1982.