

DEPARTAMENTO DE INDÚSTRIA, INSPEÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS
PRODUTOS ALIMENTÍCIOS DE ORIGEM ANIMAL

Diretor: Prof. Dr. Paschoal Mucciolo

OCORRÊNCIA DE HALÓFILOS VERMELHOS EM
SAL E REPRODUÇÃO DO "VERMELHÃO" EM
CHARQUE, PELE SALGADA DE BOVINO E PEIXE
SALGADO.

("OCCURRENCE OF RED HALOPHILIC ORGANISMS IN SOIAR
SALT AND THE "REDDENING" REPRODUCTION ON "CHAR-
QUE", SALTED HIDES AND SALTED FISH")

I. S. Schneider
Assistente-Docente

Está bem estabelecido que o "vermelhão", alteração que ocorre em produtos protéicos salgados, é devido ao crescimento de uma ou mais espécies de germes halófilos cromogênicos.

Em 1958, em colaboração com NIVEN JR. (9), isolamos de charque um microorganismo que, pelas características morfológicas, culturais e bioquímicas, foi identificado como *Halobacterium cutirubrum*. No ano seguinte, ainda em colaboração com NIVEN JR. (10), estudamos outros aspectos do metabolismo do germe por nós responsabilizado como causa do aparecimento do "vermelhão" em charque, bem como verificamos seu comportamento face a alguns agentes físicos e químicos.

Desde que o sal marinho empregado no preparo de produtos salgados foi sempre apontado como o carreador dos halófilos causadores do "vermelhão" SPRUIT e PIJPER (5), STUART (2), GUTHEIL (7), ROBERTSON (1), propuzemo-nos verificar as condições bacteriológicas do sal usado por algumas de nossas indústrias a fim de indicar e extensão de sua responsabilidade na incidência do defeito em produtos salgados.

MATERIAL E MÉTODO

Noventa amostras de sal classificadas como sal grosso para salga de charque, sal moído para salga de tripas, fino e refinado usado para salsicharia e laticínios, provieram de estabelecimentos industriais localizados nos Estados de São Paulo e Goiás, todos registrados na D. I. P. O. A., do Ministério da Agricultura. A funcionários dessa Divisão devemos a gentileza da coleta das amostras (*) que chegaram ao laboratório acondicionadas em sacos de papel impermeável, de plástico ou em recipientes de vidro em quantidades variáveis de 100 a 300 gramas.

Mais cinco amostras de sal refinado, para mesa e cosinha foram adquiridas no comércio varejista da Capital da São Paulo em embalagem original de um quilograma.

(*) Nossos agradecimentos ao Dr. WALTER FONSECA, Inspetor da DIPOA, pelas facilidades na coleta e remessa das amostras de sal

Dessa forma reunimos ao todo 95 amostras que foram semeadas em quantidade aproximada de 2 gramas em meio de enriquecimento já descrito em trabalho anterior (9) e deste, após incubação por 14 dias a 32.°C, foram passadas para superfície de placas contendo o meio de DUSSAULT modificado (9), para posterior trabalho de isolamento e identificação.

Numa segunda etapa, as culturas puras obtidas das amostras de sal foram semeadas em produtos cárneos salgados (charque, pele salgada de bovino e peixe salgado) com o objetivo de tentar reproduzir o "vermelhão".

Durante as primeiras tentativas de reprodução empregamos produtos salgados adquiridos no varejo, mas constatamos crescimento irregular, falho, ou extremamente escasso. A fim de evitar essa dificuldade pareceu-nos mais correto partir de produtos salgados estéreis com os quais pudéssemos realizar com segurança as provas de reprodução. Decidimos, por isso, preparar, em laboratório, os produtos cárneos salgados que deveriam ser usados na experiência.

Para a salga da carne, do peixe e das peles de bovino empregamos sal comum industrial (grosso) previamente esterilizado a seco a 140.°C. Pouco antes das sementeiras, os produtos salgados eram cortados em pedaços de aproximadamente 2 x 3 cm. e cada pedaço era imerso em salmoura a 20% fervente a fim de assegurar a destruição da flora superficial de contaminação no material que ia servir à reprodução dos halófilos cromogênicos e serem testados. Este tratamento do material de cultura funcionou a contento, já que os testemunhos não semeados e incubados paralelamente aos inoculados não revelaram crescimento, exceto em uma única ocasião.

A inoculação dos pedaços de cada um dos produtos salgados foi feita pela passagem de uma alça do material de cada uma das amostras isoladas em cultura pura. A cada placa de PETRI contendo o material inoculado e os testemunhos, acrescentavam-se 5ml de salmoura estéril a fim de prevenir dessecação excessiva durante a incubação a 32.°C por tempo mínimo de 10 dias.

RESULTADOS

Das 95 amostras de sal examinadas, 82 revelaram presença de halófilos cromogênicos. A distribuição da frequência pode ser apreciada no Quadro I.

QUADRO I

Ocorrência de Halófilos Cromogênicos Segundo o Tipo de Sal			
Tipo de sal	Número de amostras examinadas	Halófilos cromogênicos (vermelhos)	
		Presentes	Ausentes
Sal grosso	35	35	0
Sal moído	31	29	2
Sal fino	8	7	1
Sal refinado industrial	16	8	8
Sal refinado para mesa e cosinna	5	3	2
	<u>95</u>	<u>82</u>	<u>13</u>

Foram isoladas 82 amostras de halófilos cromogênicos de sal que se enquadraram no gênero *Halobacterium* (8). Dadas as dificuldades mencionadas no final deste trabalho, preferimos não proceder à classificação por espécie.

REPRODUÇÃO DO “VERMELHÃO” SÔBRE PRODUTOS SALGADOS

As 82 amostras de halófilos cromogênicos isolados de sal e semeadas sôbre produtos protéicos salgados reproduziram a alteração da maneira apresentada no quadro II.

QUADRO II

Reprodução do “Vermelhão” Sôbre Produtos Salgados, com Halófilos Isolados de Sal									
Produtos salgados semeados	N.º de semead.	C R E S C I M E N T O						NÃO CRESCERAM	
		Abundante		Bom		Escasso		N.º	%
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Pele salg. bovino	220	27	12,27	74	33,63	91	41,36	28	12,72
Peixe salg.	156	15	9,67	21	13,46	55	35,25	65	41,66
Charque	221	16	7,23	25	11,76	99	44,79	81	36,15

INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO SOBRE A FLORA HALÓFILA DO SAL

Deixando de lado a ação purificadora química do envelhecimento, resolvemos indagar qual a influência dessa prática sobre a flora halófila utilizando amostras de sal em que observação anterior já havia demonstrado presença de germes desse grupo. Estas amostras se encontravam há cerca de três anos em condições de laboratório, na embalagem original, em temperatura ambiente e, delas nos utilizamos para verificar quais as condições bacteriológicas após esse tempo. É de se notar que o sal em condições naturais, nos atêrros das salinas, sofre ação das chuvas, dos ventos e do sol, o que não aconteceu durante os três anos em que as conservamos no laboratório. A ação dos agentes naturais limitou-se, portanto, ao tempo em que o sal esteve nas salinas para o processo de purga. Tivemos, dessa forma, oportunidade de reexaminar 20 amostras de sal moido, 13 de sal grosso, 4 de sal fino e 3 de sal refinado industrial.

Dessas 40 amostras de sal, 39 mostraram conter ainda bactérias halófilas cromogênicas viáveis, ao passo que apenas uma das amostras de sal refinado foi negativa, o que equivale a um índice de sobrevivência de 97,5%.

DISCUSSÃO

O isolamento em cultura pura dos halófilos cromogênicos é trabalho extremamente demorado, porque estes crescem e proliferam em companhia de outros contaminantes de desenvolvimento, em geral, mais rápido. Outro fator que complica este trabalho, é o polimorfismo extremo destes microorganismos, que pode induzir a dúvidas e mesmo enganos.

A determinação taxonômica do gênero *Halobacterium* é, por sua vez, tarefa difícil, porque mal delimitada, exigindo urgente revisão em bases mais sólidas. A nosso ver não se justifica a existência de cinco espécies de *Halobacterium*, pois a diferença entre elas é extremamente sutil devido à inconsistência das bases bioquímicas e ao pouco valor dos caracteres morfológicos.

Os elementos de classificação oferecidos pelo manual de BERGEY(8) não são suficientes para uma distinção segura e, neste ponto, desejamos mencionar as provas de solubilidade do pigmento, que em nossas mãos de pouco, ou nenhum valor se mostraram, pois as espécies, diferentes entre si pelas provas bioquímicas, comportaram-se de forma idêntica frente aos solventes testados, exceto com o ácido sulfúrico concentrado, que mostrou nuances de cor ligeiramente diferentes mas não o bastante para distinção de espécies.

Com respeito à motilidade, que divide o gênero em móveis, levemente móveis e imóveis, confessamos que, dadas as dificuldades técnicas no preparo das suspensões, o que se observa é um movimento que mais parece movimento browniano, tornando-se difícil afirmar se o que se verifica é motilidade, leve motilidade ou movimento browniano. Quanto à verificação de flagelos, surge novo problema devido a grande sensibilidade destas espécies à pressão-osmótica. Em cada vintena de preparações, pudemos, quando muito, surpreender flagelos desgarrados dos corpos bacterianos e, muito raramente, fazendo parte do conjunto para se afirmar de que se tratava de flagelo polar ou bipolar.

Fato da mais alta relevância prática é o que se refere à sobrevivência dos agentes do “vermelhão” em sal envelhecido por longo período de tempo, contrariando as opiniões externadas por alguns técnicos e de há muito tempo acolhidas pela indústria de alimentos salgados.

Acreditam alguns técnicos que o “sal verde” mantido nos aterros das salinas durante determinado período de tempo, sofre depuração que o torna livre de grande parte dos contaminantes químicos, bem como de grande parte das bactérias, inclusive aquelas responsáveis pelo “vermelhão”. Assim, DUARTE (4) e SAMPAIO FERNANDES (3) referem que o emprêgo de sal “curado” resulta em produtos salgados de excelente qualidade e isentos do “vermelhão”. Aham os mencionados autores que o fator tempo seja suficiente para expurgar o sal de suas impurezas químicas, e bacteriológicas, e essa crença foi durante muitos anos esposada pelos práticos da indústria de charque que sempre incriminaram o sal novo como responsável pelo aparecimento do “vermelhãc”.

A constatação de halófilos cromogênicos em sal, após mais de quarenta e oito meses de envelhecimento parece-nos indicar a ineficiência da prática preconizada por vários técnicos e adotada pelo Instituto Nacional do Sal, ao que tudo indica com o mesmo objetivo. Assim sendo, a estocagem atualmente preconizada pelo Instituto Nacional do Sal pode ter influência apenas quanto à parte química, porquanto os responsáveis pelo “vermelhão” não são afetados por tal prática.

A ocorrência de halófilos vermelhos em sal grosso ou moído era de se esperar pois que a maioria dos autores verificou tal fato. A verificação, porém, dos mesmos germes no sal refinado e de mesa surpreendeu-nos, já que êstes, de acôrdo com a legislação em vigor, no E. de S. Paulo (artigo 548, §8 e artigo 550, § único do Regulamento de Policiamento da Alimentação Pública) devem ser esterilizados e isentos de germes. Considerando que os halófilos cromogênicos são termolábeis, sendo destruídos em temperatura de 65.°C em 5 minutos (9), somos levados a admitir ocorrência de

contaminação posterior à esterilização ou a falhas neste último processo

A reprodução do “vermelhão” sobre produtos protéicos salgados foi tentada por ROBERTSON (1), mas esse pesquisador não utilizou culturas puras, tendo obtido reprodução com crescimento misto. Nós mesmos (9) isolamos um dos agentes do “vermelhão” de charque, reproduzindo-o em cultura pura, sobre outros produtos salgados. Neste trabalho, os halófilos foram isolados de sal marinho e depois reproduzidos sobre vários produtos salgados

A reprodução, partindo de culturas puras não ocorre com a mesma facilidade que se observa em condições naturais, nem ocorre com a mesma abundância, intensidade de odor e cor avermelhada que se observam na alteração natural. Parece-nos que em condições naturais, os agentes desta alteração são favorecidos no seu crescimento por outros contaminantes halófilos ou halotolerantes, desenvolvendo-se mais abundantemente, fato que abre campo para novas pesquisas.

Para a reprodução do “vermelhão” as peles salgadas prestam-se melhor que o charque ou o peixe salgado, oferecendo maior percentagem de resultados positivos e crescimento mais rápido e abundante. Este fato, cuja explicação permanece obscura, representa mais um aspecto que exige indagações posteriores.

CONCLUSÕES

- 1 — De 95 amostras de sal examinadas, 82 eram contaminadas por bactérias halófilas cromogênicas (86,31%);
- 2 — Das 21 amostras de sal refinado, industrial e de mesa, 11 mostraram presença de halófilos cromogênicos, contrariando a legislação vigente no E. de S. Paulo que exige esterilização para tal tipo de produto;
- 3 — Os halófilos cromogênicos isolados de sal, em cultura pura reproduziram, sobre produtos protéicos salgados (pele de bovino salgada, peixe salgado e charque), a alteração vulgarmente conhecida por “vermelhão”;
- 4 — O envelhecimento de 40 amostras de sal conservado, na embalagem original, em laboratório por cerca de 3 anos não conseguiu eliminar a flora halófilica, exceto em uma amostra.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The author studies bacteriologically 90 samples of different grades of industrial solar salt and also 5 samples of refined table salt, in order to know the extension of the occurrence of chromogenic halophilic organisms in these products. The percent of contamination of the different grades of salt was high (82 out of 95 samples).

The occurrence of this kind of organisms in industrial solar salt is almost a common fact but the finding of the same kind of bacteria in refined salt is not a normal one because according to the sanitary regulations this grade of salt must be sterilized and do not contain bacteria, mainly halophils, which are thermolabil organisms being killed in 5 minutes at 65°C.

From the 82 halophils isolated from 95 samples of salt, only 64 were included in the genus *Halobacterium* but no species were determined due to the peculiar difficulties in studying these bacteria and also to the insufficient number of tests and sharp differential characteristics for a more reliable classification. The interpretation of the biochemical tests and the morphological findings is also difficult (ex: motility, slow motility and no motility). It seems to us that there is no sufficient reason for the existence of 5 species of *Halobacterium* because the difference between species is very fault of sufficient sharp biochemical and morphological characteristics.

From the cultures isolated from salt, 80 were reproduced on the surface of different salted protein products (hides, fish, meat) and 2 failed to do so. The growth on the salted products is less luxurious and has not so a bad smell and color shade as compared to naturally infected products. The best material for the reproduction test of 'reddening' were the salted hide pieces. We do not know yet the reason of that fact.

There exists the opinion between technicians and industry men that the stocking of marine salt eliminates many chemical and also bacterial contaminants from the salt. In order to test this point, we reexamined 40 positive samples of salt after holding them for about 36 months in laboratory conditions. After that long time, only one of the samples was negative for halophils and the remainder 39 were still positive. This experience proves that stocking of solar salt is not sufficient for the destruction of the red halophils which are the causing agents of "reddening" of salted protein products.

BIBLIOGRAFIA

1. ROBERTSON, M. E., 1931 — A note on the cause of certain red colorations of salted hides and a comparison of the growth and survival of halophilic or salt-loving organisms and some ordinary organisms of dust and putrefaction on media of varying salt concentrations. *J. Hygiene*, **31** (1): 84-95
2. STUART, L. S., FREI, R. W. and JAMES, L. H., 1933 — Microbiological studies of salt in relation to the reddening of salted hides. *Tech. Bull. N. 383* U. S. Dept. Agric
3. SAMPAIO FERNANDES, J., 1939 — Indústria do sal. Relatório apresentado em 1937, ao Sr. Ministro da Agricultura Ser. Publ. Agrícola Rio de Janeiro, Brasil
4. DIOCLÉCIO D. DUARTE, 1941 — A indústria extrativa do sal e a sua importância na economia do Brasil. *Serv. Inf. Agr. Min. da Agricultura*, Rio de Janeiro, Brasil
5. SPRUIT, C. J. P. and PIJPER, A. 1952 — An obligate halophilic bacterium from solar salt. *Antonie van Leeuwenhoek*, **18**: 190-200
6. FLANNERY, W. L., 1956 — Current status of knowledge of halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **20** (2): 49-66
7. GÜTHEIL, C. G., 1956 — Considerações sobre a ocorrência de bactérias halófilas vermelhas na indústria do charque. *Bol. n. 27, Inst. Technol. R. G. do Sul, P. Alegre*
8. ROBERT S. BREED, MURRAY, E. G. D., and SMITH, N. R., 1957 — *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th ed. The William and Wilkins Co. Baltimore, USA
9. SCHNEIDER, I. S. and NIVEN JR., C. F., 1958 — Estudo da alteração denominada "vermelhão" do charque. I. Isolamento e identificação de um halófilo vermelho — *Halobacterium cutirubrum*. *Arq. Bras. Nutrição*, **14** (2) 59-76
10. SCHNEIDER, I. S. and NIVEN JR., C. F. 1959 — Estudo da alteração denominada "vermelhão" do charque. II. Aspectos metabólicos — Ação de agentes físicos e químicos. *Arq. Bras. Nutrição*, **15** (1): 43-52