

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

RECUPERAÇÃO DE CEPAS DE *Vibrio cholerae*
SUBMETIDAS A "STRESS" - TEMPERATURAS DE
EBULIÇÃO E CONGELAMENTO

Hauston Barbosa de Almeida

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia
de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade
Federal do Ceará, como parte das exigências para
obtenção do título de Engenheiro de Pesca

Fortaleza - Ceará
1994.1

B S L C M

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A447r Almeida, Hauston Barbosa de.

Recuperação de cepas de *Vibrio cholerae* submetidas a "stress" : temperaturas de ebulação e congelamento / Hauston Barbosa de Almeida. – 1994.

27 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 1994.

Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

1. Cólica. 2. Pescados. I. Título.

CDD 639.2

Regine Helena S. dos Fernandes Vieira
Prof. Adjunto 4
Orientadora

Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira
Prof. Adjunto 4
Presidente

José Cals Gaspar Junior
Prof. Adjunto

José Wilson Calíope de Freitas
Prof. Adjunto

Prof. Adjunto Luis Pessoa Aragão
Chefe do Dep. de Engenharia de Pesca

Prof. Adjunto. Moisés Almeida Oliveira
Coordenador do Curso de Eng. de Pesca

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, pessoa pela qual tenho muita estima e admiração, pela sua dedicação e paciência.

Ao professor Gustavo Hitzschky F. Vieira pelo auxílio dado na confecção deste trabalho.

A amiga Cleidenora, pela sua amizade e ombro sempre acolhedor.

A Ludmila, Oscarina, Terezinha, Hilda, Fabiano, Maria Tereza, amigos e companheiros de laboratório.

Aos meus irmãos, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus avós, tios, primos e familiares que me ajudaram nesta jornada.

A todos os meus professores.

RECUPERAÇÃO DE CEPAS DE *Vibrio cholerae* SUBMETIDAS A
"STRESS" - TEMPERATURAS DE EBULIÇÃO E CONGELAMENTO.

Hauston Barbosa de Almeida

1. INTRODUÇÃO

O *Vibrio cholerae* é o agente etiológico da cólera, doença responsável por grandes surtos, e até por pandemias, como a mais recente, a sétima, ainda em curso. Iniciou-se em 1961, quando o bacilo responsável pela doença alastrou-se através de movimentos migratórios, a partir de um foco endêmico na Indonésia, propagando-se a quase toda a Ásia, à região oriental da Europa, ao norte da África e à península Ibérica, atingindo a Itália em 1973, ano em que se verificou um caso nos Estados Unidos, de origem não identificada; em 1974 ocorreu um caso importado, no Canadá; chegando ao Peru em 1991 logo depois ao nosso país (Brasil, 1993).

Um dos principais vetores da cólera é o alimento, sendo o pescado implicado em surtos. Sua microbiota contaminante é função da contaminação do seu ambiente natural. A sobrevivência da bactéria *Vibrio cholerae* em ambiente marinho é maior que na água doce, decaindo quando se tem microbiota competitiva numerosa (Leitão, 1988).

O único reservatório comprovado do *Vibrio cholerae* é o trato intestinal do homem. Isto leva a crer que a manutenção da doença se dá através do ciclo: homem contamina a água com *Vibrio cholerae* e este se aloja no pescado que após capturado, e não submetido a uma cocção adequada, pode infectar o homem.

Apesar do brasileiro não possuir, à imitação do peruano, o hábito de ingerir pescado cru, ainda assim este alimento poderá ser veículo da doença, se estiver contaminado e não for devidamente cozido. É sabido que os crustáceos devem ser submetidos a um curto período de fervura, para que não tenham a textura de sua carne alterada, então é possível que se o camarão estiver contaminado este tempo de fervura não seja suficiente para matar as cepas do *Vibrio cholerae*. Não se sabe se o tempo de estocagem a temperaturas abaixo de zero influí na viabilidade destas cepas.

O processo patológico desencadeado pelo *Vibrio cholerae* é, certamente, o mais acentuado de todas as doenças diarréicas, sendo de grande importância no cenário da Saúde Pública, já que a cólera pode ser caracterizada como uma doença pandêmica, ou seja, pode alastrar-se, de forma repentina, por países e continentes (Sack et al apud Leitão, 1988).

O Brasil, em decorrência de suas dimensões continentais, das deficiências de saneamento básico, do alto índice de infecções diarréicas infantis que diminui a eficiência do sistema imunológico de seu povo, da delicada situação sócio-econômica de grande parte da população, constitui-se em um alvo fácil para disseminação da cólera (Brasil, 1992).

Em nossa pesquisa trabalhamos com o camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, habitante natural de ambientes marinhos costeiros, lamosos.

Os crustáceos foram infectados com cepas de *Vibrio cholerae* e posteriormente foram testadas as resistências das cepas a temperaturas de congelamento (-22 a -25°C) ao longo de 25 dias e à temperatura de ebulação por 2, 4, 6, 8, 10 e 12 minutos.

2.CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE

2.1.Morfologia da espécie

Bastonetes curtos ($1,5-2,5\mu$ x $0,2-0,4\mu$), ligeiramente curvados, móveis por intermédio de um único flagelo polar (monotríquio), Gram negativo. Nas culturas, estas formas curvas tendem a desaparecer, dando lugar a formas de involução(Bier, 1970)

2.2.Distribuição e temperatura

Através de observações,a CNPC constatou que há maior sobrevivência em águas costeiras e estuarinas que em alto mar, não sendo detectado em pescado de alto mar (Brasil, 1993)

A bactéria é mesófila, reproduzindo-se entre 15 e 42°C , com ótimo entre $30-35^{\circ}\text{C}$; possui baixa resistência térmica, sendo destruída pelo aquecimento a 55°C durante 15 minutos(Sakazaki apud Leitão, 1988).

2.3.pH

O pH que propicia o crescimento da bactéria situa-se na faixa de 7,0 a 9,0; porém tolera pH de 5,5 a 10,0 (CNPC, 1993).

Sendo o *V. cholerae* extremamente sensível a pH ácidos, crê-se que a sua instalação no intestino deva-se a uma neutralização transitória, ou diluição do suco gástrico, seja pela ingestão de alimentos ou de grandes volumes de líquidos (Sakazaki apud Leitão, 1988).

2.4.Concentração de Cloreto de Sódio

O *V. cholerae* é originário da água salgada, sendo que ao longo do tempo ele se adaptou a ambientes estuarinos (salinidade flutuante devido a influência da maré) e até a sistemas de água doce.

Abaixo de 0,3% de NaCl a viabilidade desta bactéria passa a depender da concentração de nutrientes, e da temperatura alta. A sazonalidade deste *Vibrio* na água mantém relação com níveis mais elevados de cloretos (Brasil, 1993).

2.5. Patogenia

A patogenia do *V. cholerae* caracteriza-se por uma diarréia secretória, que é resposta à ação da enterotoxina produzida pelo microorganismo sobre os enterócitos do intestino delgado (Brasil, 1993).

A porta de entrada, no organismo humano, do *V. cholerae* é a boca. Conseguindo sobreviver à acidez gástrica, a bactéria se instala no intestino delgado onde o pH alcalino favorece seu crescimento. Depois de sua instalação e multiplicação, ela produz e libera a sua enterotoxina desencadeando a doença propriamente dita (Brasil, 1993).

2.6. Antibioticoterapia

Certos antibióticos profiláticos têm sido utilizados para controlar a cólera e evitar sua disseminação. (Feachen apud Souza, 1992).

O antibiótico mais utilizado para terapia da enfermidade cólera é a tetraciclina. Na Tanzânia 1977, todas as cepas dessa bactéria eram sensíveis à tetraciclina. Entretanto, seis meses mais tarde, 76% destas

cepas apresentavam-se resistentes àquele antibiótico (Mhalu et al apud Souza, 1992).

2.7. Profilaxia

1- Evitar o uso de águas contaminadas no preparo de alimentos, principalmente quando estes não forem submetidos a cozimento.

2- Atentar para a captura e o consumo de peixes e crustáceos provenientes de águas contaminadas.

3- Manusear alimentos em condições adequadas de higiene.

4- Não armazenar alimentos em recipientes contaminados, bem como evitar o contato com moscas e outros insetos.

5- Lavar bem as mãos após a utilização do sanitário.

2.8. Higiene de alimentos

Hortifrutigranjeiros devem ser lavados em água corrente e submersos em uma solução de hipoclorito de sódio (15ml/litro), permanecendo em infusão nesta solução durante 30 minutos.

A água não tratada deve receber por litro, 0,03ml ou 2 gotas de solução de hipoclorito de sódio; após 30 minutos esta água estará pronta para consumo humano.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. TRATAMENTO DA CEPA

As cepas de *V.cholerae* 01 utilizadas na presente pesquisa foram previamente estocadas em Agar Triptona Soja (TSA) 1% de Cloreto de Sódio(NaCl) e incubadas em B.O.D., (23°C). Posteriormente foram repicadas com fins de renovação, em Caldo Triptona Soja (TSB) 1% de NaCl por 24 horas a 35°C. Em seguida uma aliquote da cultura foi transferida para o meio de Agar Tiosulfato - Citrato - Bile - Sacarose (TCBS - Difco) para comprovação de suas purezas. Assim foram isoladas colônias sacarose +, crescidas em meio seletivo para *Vibrio* e inoculadas nas amostras de camarão.

3.2..Amostra

A matéria prima utilizada para servir de substrato ao crescimento do *V. cholerae* 01 foi camarão sete-barbas, *Xyphopenaeus kroyeri* (Heller) capturado na costa cearense.

Nos dois experimentos foram utilizados camarões congelados, transportados ao laboratório em caixas isotérmicas.

O tempo de estocagem das amostras variou nos dois experimentos. No primeiro a montagem foi quase imediata à recepção enquanto que no segundo, o camarão demorou estocado em congelador, cerca de 20 dias.

Na segunda fase da pesquisa quando foi testada a resistência das cepas de *V. cholerae* 01 inoculadas em camarão e levadas a temperaturas de ebulação com tempos variados (2, 4, 6, 8, 10, e 12 minutos), a matéria-prima, à imitação do primeiro experimento, foi utilizado quase imediatamente à sua chegada. A repetição dessa prática foi feita um dia depois. O camarão, durante o tempo de espera, foi deixado em congelador.

3.2.1. Cloração da amostra

Nas duas fases da nossa pesquisa as amostras de camarão foram submetidas a uma cloração através de imersão durante 15 minutos em uma solução de Hipoclorito de Cloro a 10ppm. A concentração de Cloro foi determinada por titulação com tiosulfato de Sódio 0,1N segundo A.O.A.C. (1980).

3.2.2. Contagem da população bacteriana nas amostras de camarão

Após a cloração procedeu-se à Contagem Padrão em Placa(CPP) da microbiota presente nas amostras de camarão. No desenrolar dos experimentos (2) foram feitos acompanhamentos dessas contagens (controle), objetivando-se quantificar a microbiota total em Agar Contagem de Placa(PCA) e a microbiota sacarose + (se houvesse) em meio TCBS.

3.2.3. Recipientes utilizados para estocagem das amostras

Os recipientes utilizados na pesquisa eram plásticos, em forma de copo, providos de tampa e com capacidade de 100 mililitros. Os mesmos passaram por uma imersão em uma solução de Hipoclorito de Cloro a 10ppm por 30 minutos, logo após foram secos em estufa a 50°C.

3.3. Inoculação da amostra - 1^a fase (congelamento)

No decorrer da pesquisa a inoculação de *V. cholerae* em camarão seguiu as etapas:

3.3.1.Crescimento da cultura da bactéria em TSB 1% de NaCl por 24 horas a 35°C.

3.3.2.Quantificação do inóculo após 24 horas por comparação da tabela de Mac Farland ,Paik (1988), nos primeiro e segundo experimentos.

3.3.3.Imersão do camarão em TSB 1% NaCl com cultura de *V. cholerae* por 5 minutos (Cerca de 500g). A mesma quantidade foi imersa em TSB 1% NaCl sem cultura, durante 5 minutos. Esse último servindo de controle do experimento.

3.3.4.Logo após o tempo de imersão em TSB 1% NaCl com e sem cultura de *V. cholerae* a amostra foi dividida em 15 lotes de 25g sendo pesada em recipientes previamente desinfectados, secos e cobertos, junto ao bico de Bunsen. Posteriormente os recipientes foram estocados em congelador (-22 a -25°C) e retirados um a um para as contagens nos dias estabelecidos (1 a 13, 20 e 25 dias).

3.3.5..As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em liquidificador com solução salina (0,9% NaCl) estéril seguindo as relações 1:10 (P/V). Do homogeneizado eram retiradas aliquotas para as diluições necessárias e posteriormente passadas para as placas de contagem.

Inicialmente a amostra era inoculada em TCBS através da técnica de "Spread Plate", em seguida a amostra era plaqueada em PCA 1% NaCl, utilizando a técnica "Pour Plate" (Soares, Casimiro & Aguiar, 1987).

Para o controle da primeira fase o procedimento foi igual ao acima citado.

3.4. Inoculação da amostra - 2^a fase (temperatura de ebulição)

Na segunda fase do experimento a inoculação foi processada da seguinte maneira:

3.4.1.. Crescimento da cultura em TSB 1% NaCl 24 horas a 35°C, sendo quantificada por comparação com a tabela Mac Farland (Paik, 1988).

3.4.2. A amostra de camarão pesou aproximadamente 250g e foi clorada em solução de Hipoclorito de Sódio a 10ppm por 15 minutos. Logo após a cloração a amostra teve a sua microbiota estimada através de CPP em PCA 1% NaCl e TCBS.

3.4.3. A inoculação da amostra de camarões foi através de sua imersão em TSB 1% NaCl, com cultura de *Vibrio cholerae*, por 5 minutos ; a amostra foi então dividida em 8 lotes de

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira fase dos experimentos (resistência das cepas de *V. cholerae* à temperaturas de congelador, -22 a -25°C) a CPP de bactérias de camarão *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) logo após a imersão em solução de Hipoclorito de Sódio 10 ppm/15 minutos, foi de log 4,82 UFC/g (Tabela 1). Em TCBS esse número foi bem menor, log 1,63 UFC/g. Essas colônias crescidas em TCBS, por serem sacarose +, poderiam, após a inoculação, ser confundidas com as de *V. cholerae* o que dificultaria a contagem dessas. Entretanto suas morfologias eram diferentes daquelas apresentadas pelo vibrião : enquanto essas são pequenas, delicadas, aquelas eram grandes à semelhança de vibrios marinhos. Mais tarde essas colônias foram identificadas como *V. alginolyticus* e *Proteus*. Esse último pertence à família das Enterobacteriaceae, produtora de H₂S, capaz de crescer em TCBS, com uma coloração amarela ou esverdeada com centro negro (Furniss et al, 1978).

O *Vibrio alginolyticus* é freqüentemente isolado de peixes, crustáceos, água e sedimentos marinhos (Gjerd & Boe, 1981; Joseph et al, 1982 apud Colwell & Grimes, 1984)

É possível se visualizar nas tabelas 1 e 2, e nas figuras (1, 3, 5, 6), a resistência das cepas de *Vibrio*

cholerae ao congelamento nos 25 dias estabelecidos para a duração dos experimentos. Apesar dos inóculos de *Vibrio cholerae* crescidos em TSB variarem (o primeiro experimento foi de 10^9 e o segundo foi de 10^7 UFC/ml) a tendência descendente das curvas foi a mesma para ambos os casos.

Tabela 1: Logarítmo do número de Unidades Formadoras de Colônias Sacarose + por grama da amostra. Teste da resistência do *V. cholerae* a temperaturas abaixo de zero (-22 a -25°C).

Primeiro experimento			Segundo experimento		
Dias	Log UFC/g Problema TCBS	Log UFC/g Controle TCBS	Dias	Log UFC/g Problema TCBS	Log UFC/g Controle TCBS
1	5.53	3.28	1	5.43	0.00
2	6.23	2.48	2	5.27	0.00
3	5.32	3.18	3	5.33	0.00
4	6.17	2.95	4	5.50	0.00
5	6.21	0.00	5	5.29	0.00
6	6.48	0.00	6	4.83	0.00
7	5.08	0.00	7	5.42	0.00
8	5.07	0.00	8	5.03	0.00
9	----	0.00	9	5.35	0.00
10	4.47	0.00	10	4.16	0.00
11	4.47	0.00	11	4.34	0.00
12	4.30	0.00	12	4.46	0.00
13	4.99	0.00	13	5.33	0.00
20	4.60	0.00	20	4.89	0.00
25	4.62	0.00	25	4.67	0.00

Tabela 2: Logarítmico do número de Unidades Formadoras de Colônias em PCA 1% NaCl, por grama da amostra. Teste da resistência do *V. cholerae* a temperaturas abaixo de zero (-22 a -25°C).

Primeiro experimento			Segundo experimento		
Dias	Log UFC/g problema PCA	Log UFC/g Controle PCA	Dias	Log UFC/g Problema PCA	Log UFC/g Controle PCA
1	6.34	4.97	1	5.12	4.32
2	6.49	4.20	2	4.97	3.94
3	6.01	4.06	3	4.95	4.42
4	6.27	4.09	4	5.01	4.26
5	5.75	3.54	5	4.98	4.01
6	6.00	4.52	6	4.81	4.36
7	5.82	3.79	7	4.12	4.06
8	6.47	3.98	8	4.96	4.12
9	4.32	3.91	9	5.07	4.02
10	4.44	3.86	10	4.89	4.21
11	4.42	3.09	11	4.80	4.15
12	4.60	3.63	12	4.82	4.13
13	4.76	4.03	13	4.67	4.26
20	4.61	3.95	20	4.59	4.10
25	4.77	4.07	25	4.27	3.97

Nossos dados estão de acordo com aqueles citados pela Organização Mundial de Saúde (1991) os quais afirmam que estudos realizados sobre os efeitos do congelamento de *Vibrio cholerae*, em carne, revelaram a recuperação de bactérias viáveis em carnes "inteiros" de bovino, sugerindo que alguns alimentos tendem a exercer um efeito protetor que permite a sobrevivência de alguns patógenos entéricos. Nossas amostras foram camarões inteiros. Entretanto a viabilidade na nossa pesquisa foi observada na faixa de temperaturas entre -22 e -25°C contrariando a afirmação

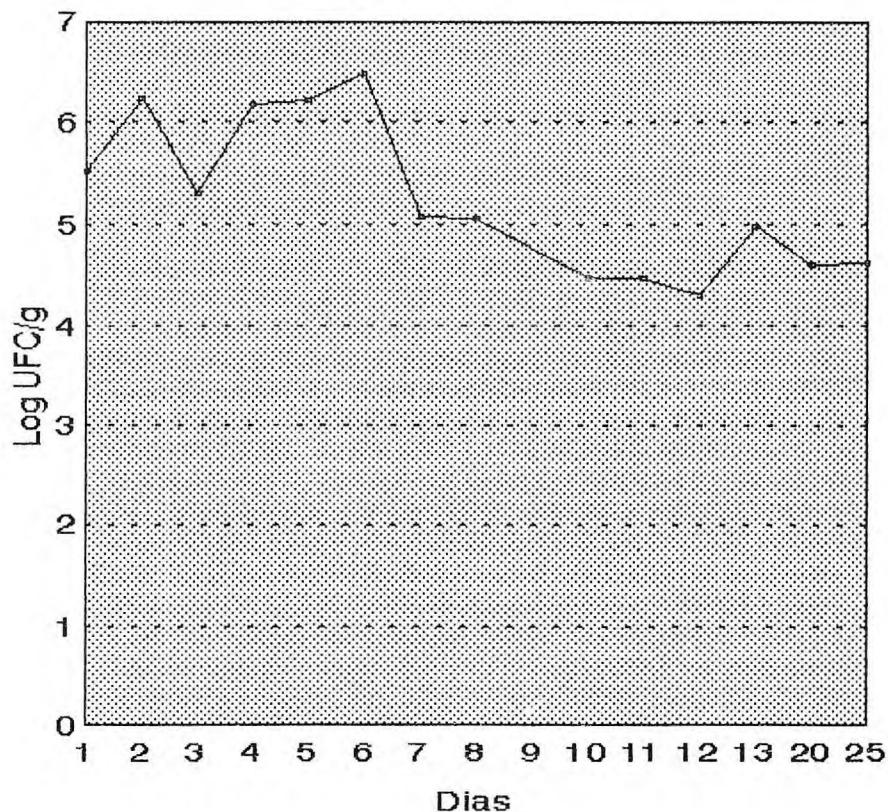
publicada pela OPS no mesmo trabalho citado anteriormente, de que o *V. cholerae* perderia sua viabilidade a -20°C.

O efeito das baixas temperaturas na sobrevivência do *V. cholerae* pode variar. O congelamento em temperaturas mais altas é mais letal do que em temperaturas mais baixas. Muito mais organismos *V. cholerae* sofrem danos ou morte a intervalos de temperatura entre -2 e -10°C do que a -30°C (OMS/OPS, 1991).

No primeiro experimento, as colônias Sacarose + e que não eram *V. cholerae* desapareceram em TCBS-controle no 5º dia(Tabela 1). No 2º experimento, desde o 1º dia, nenhuma colônia cresceu em TCBS usados como controle. Entretanto, nas placas-controle de PCA, embora tenha havido um decréscimo ao longo da estocagem em congelador, houve uma certa irregularidade deste comportamento nos dois experimentos (Tabela 2, figuras 4 e 7). Este fato é aceitável tendo em vista que as psicrófilas crescem bem em temperaturas abaixo de zero e certamente o uso de TSB após a cloração proporcionou a recuperação das cepas fragilizadas no pré-tratamento com cloro. Isto pode sugerir que o TSB não teria sido um meio adequado para funcionar como controle, e possivelmente, a H₂O destilada estéril o fosse, uma vez que é destituída de nutrientes.

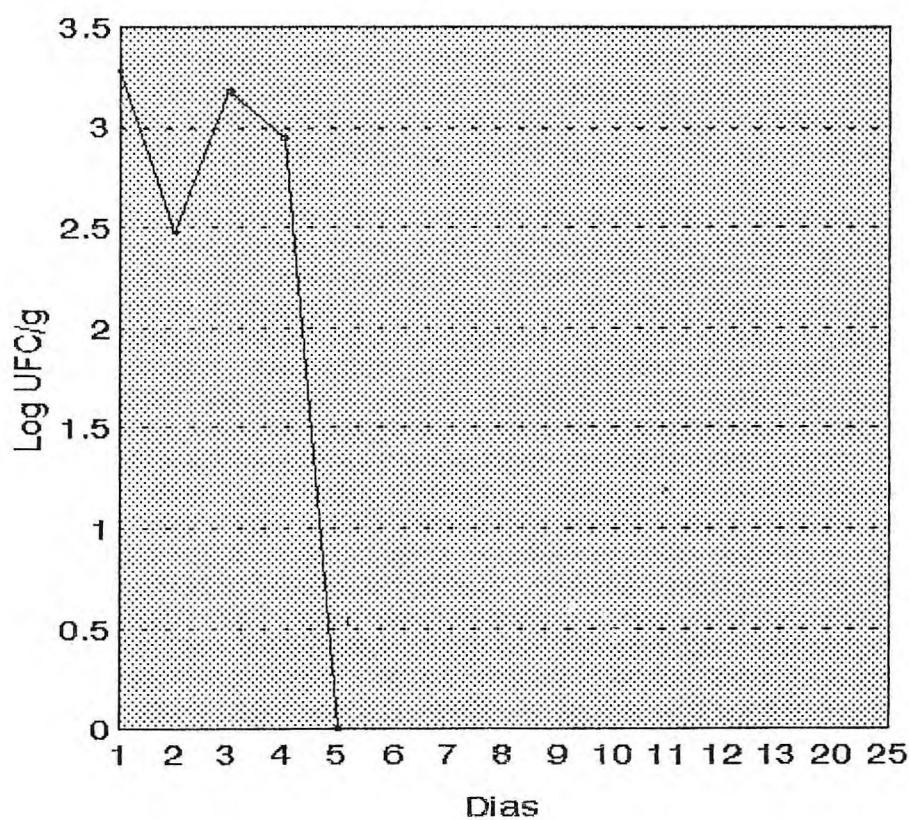
**Log UFC/g Vibrio cholerae em TCBS
Fase-1 experimento-1, problema**

FIGURA 1



**Log UFC/g Sacarose + em TCBS
Fase-1 experimento-1, controle**

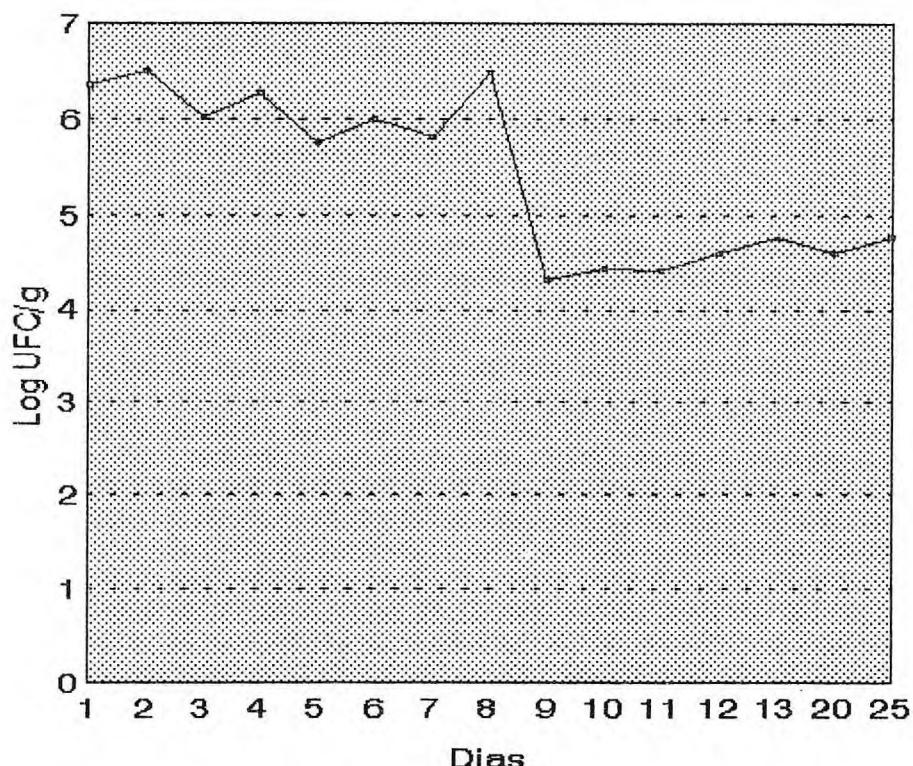
FIGURA 2



Log UFC/g em PCA

Fase-1 experimento-1, problema

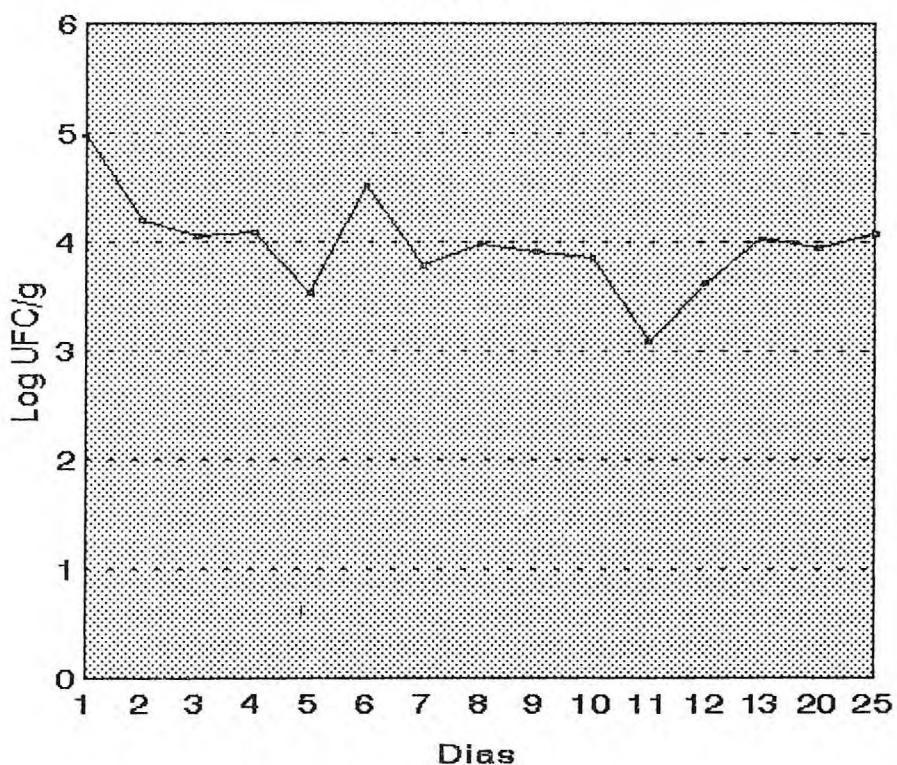
FIGURA 3



Log UFC/g em PCA

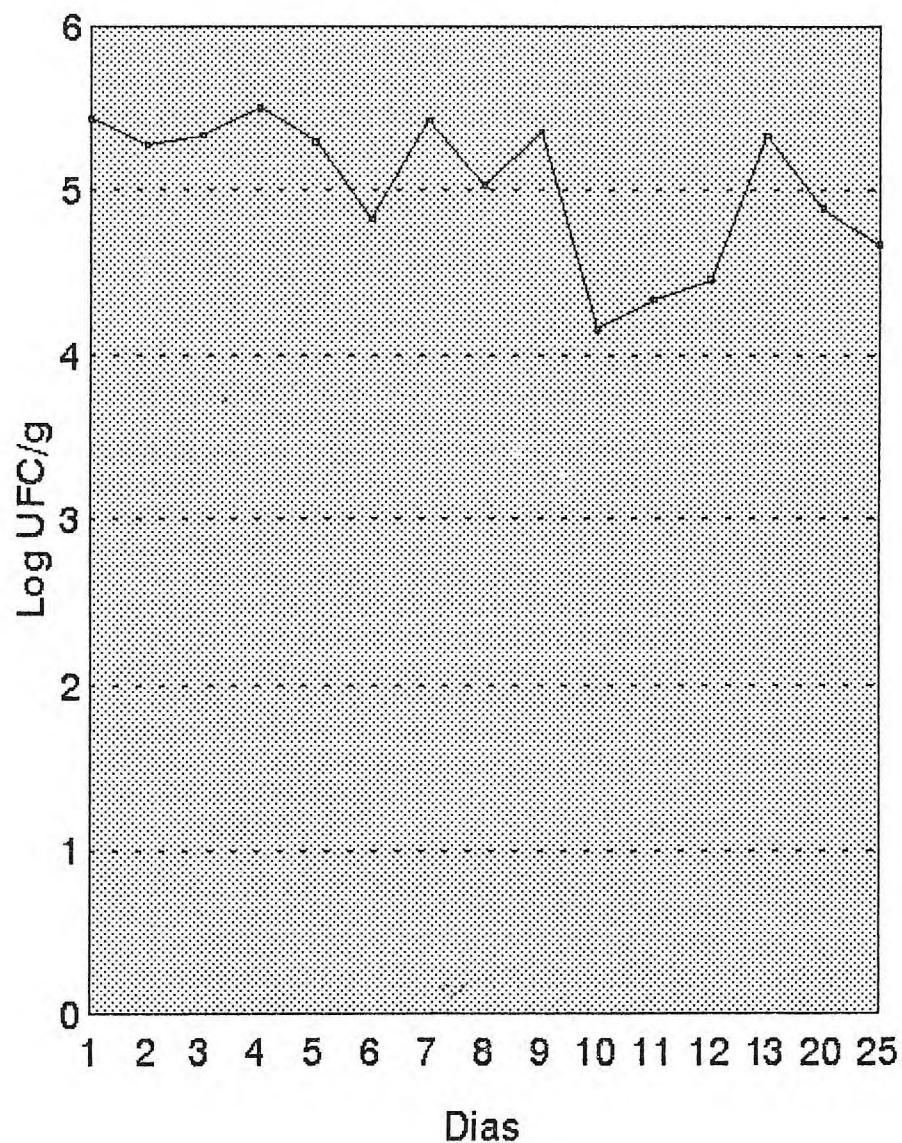
Fase-1 experimento-1, controle

FIGURA 4



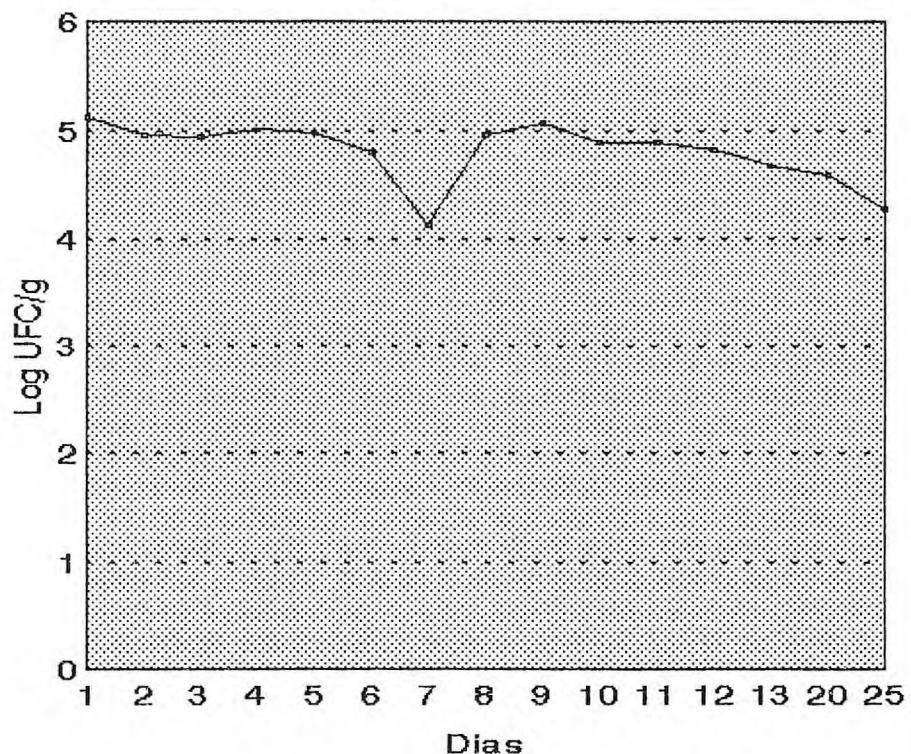
Log UFC/g *Vibrio cholerae* em TCBS
Fase-1 experimento-2, problema

FIGURA 5



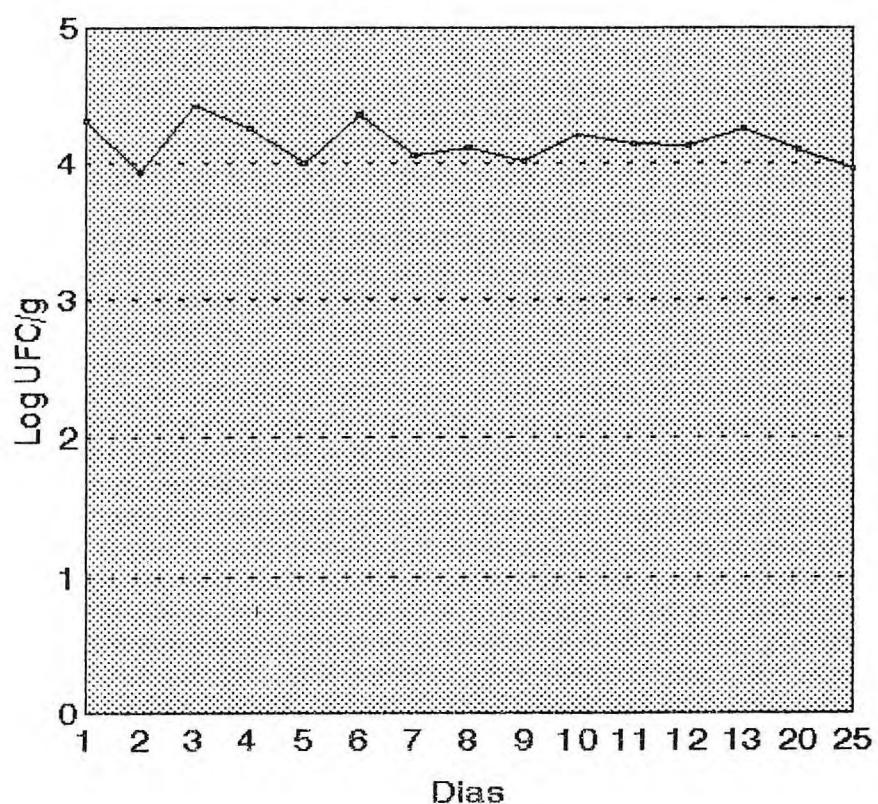
Log UFC/g em PCA Fase-1 experimento-2, problema

FIGURA 6



Log UFC/g em PCA Fase-1 experimento-2, controle

FIGURA 7



Na 2^a fase do trabalho (recuperação de cepas de *V. cholerae* após sofrerem temperaturas de ebulação em tempos variados) foram feitos também 2 experimentos. Os inóculos do 1º e 2º experimento foram de 10^9 e 10^7 UFC/ml respectivamente. As amostras de camarão após a cloração apresentaram em meio de PCA, no 1º e 2º experimentos, números bacterianos correspondentes aos logaritmos 2,62 e 2,74 UFC/g, respectivamente. Essas mesmas amostras não apresentaram, após a cloração, nenhum crescimento em TCBS.

Após o inóculo (tempo zero) a população bacteriana nos dois experimentos foi triplicada em relação aos valores encontrados logo após a cloração da amostra (Tabela 3)

Na mesma tabela é possível se verificar que as amostras de camarão submetidas à fervura, a partir de 2 minutos, não apresentaram crescimento em TCBS, excessão os tempos 6 e 8 minutos do 1º experimento, cujos números nos sugerem um possível erro experimental.

Conforme a Fundação Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (Basil, 1993) a temperatura de 60°C é letal para o *V. cholerae*, razão pela qual a cocção é suficiente para eliminar a bactéria.

Tabela 3: Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias em PCA 1% NaCl e Sacarose + em TCBS, por grama da amostra. Teste da resistência de cepas de *V. cholerae* a temperaturas de ebulição em diversos intervalos de tempo (2, 4, 6, 8, 10 e 12 minutos).

Tempo em minutos	Logaritmo do número de UFC/g			
	primeiro experimento		segundo experimento	
	TCBS	PCA	TCBS	PCA
0	7.06	6.17	6.02	5.18
2	0.00	3.60	0.00	2.30
4	0.00	3.37	0.00	1.78
6	3.30	3.55	0.00	1.00
8	2.00	3.07	0.00	1.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.00	0.00	0.00	0.00

Entretanto, Makukutu & Guthrie (1986), quando contaminaram quatro tipos de alimentos com *V. cholerae* 01 e não 01 e estocaram em temperaturas entre 45 e 60°C, verificaram através de crescimento em TCBS por 48 horas que eles sobreviveram bem, ao final de 1 hora, a essa prova térmica.

Em estudos processados nos Centers for Disease Control (CDC) foi concluído que caranguejos precisam ser fervidos no mínimo por 8 minutos ou cozidos em vapor por 25 minutos sob pena de, estando contaminados com *V. cholerae*, estes ainda apresentarem viabilidade (OMS/OPS, 1991).

Os dados relativos ao crescimento de bactérias em meio PCA (Tabela 3) mostram que somente após 8 minutos de fervura a microbiota total das amostras estaria eliminada.

5.CONCLUSÕES

- 1.Cepas de *Vibrio cholerae*, inoculadas em camarão, resistiram até o 25º dia em temperatura de congelador (-22 a -25°C) nos dois experimentos.
- 2.Cepas de *Vibrio alginolyticus* e *Proteus* presentes na microbiota do camarão resistiram à cloração no pré-tratamento.
- 3.Bactérias psicrófilas presentes nas amostras de camarão, resistiram bem em temperaturas de congelador (-22 a -25°C) nos dois experimentos até o 25º dia de observação.
- 4.As cepas de *Vibrio cholerae*, inoculadas em camarão, não resistiram a 2 minutos de ebulação.
- 5.A microbiota total presente resistiu até 8 minutos em temperatura de ebulação.

6.BIBLIOGRAFIA

Segundo - NBR - 6023 - ABNT.

- 1- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS.
Official methods of analysis, 17.ed. Washington:1980
, 1015p.
- 2- BRASIL, Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Prevenção da Cólica, Subcomissão Nacional de Diagnóstico Laboratorial. Cólica: manual de diagnóstico laboratorial. Brasília: 1992. 32p. il.
- 3- _____, Fundação Nacional de Saúde. Cólica: transmissão e prevenção em alimentos e ambiente. Brasilia: 1993 . 43p.
- 4- COLWELL, R.R., GRIMES, D.J. Vibrio diseases of marine fish populations. Helgolander Meeresuntersuchnger, v.37, p.265-287, 1984.
- 5- DIFCO, Manual: Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10 .ed. Detroit: DIFCO Laboratories, 1984. 1155p.
- 6- FURNISS, A.L, LEE, J.V., DONOVAN, T.J. The Vibrios. London: Her Majestys Statinery Office, 1978 p.32-42.

- 7- LEITÃO, Mauro Faber de Freitas. Microbiologia de alimentos. In: ROITMAN, Isaac, TRAVASSOS, Luiz R., AZEVEDO, João Lúcio (Eds.) Tratado de microbiologia. São Paulo: Manole, 1988, v.1, cap.1, p.3-81.
- 8- MAKUKUTO, Caleb A., GUTHRIE, Rufus K. Behavior of *Vibrio cholerae*. Applied and Environmental Microbiology, v.52, n.4, p.824-831, oct. 1986.
- 9- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Desenvolvimento de Programas de Saúde. Saúde Pública Veterinária. Riscos de Transmissão de cólera por alimento. Tradução por V.L.V. - HPV/BRA [S.l.]: Organização Panamericana de Saúde, 1991.
- 10- PAIK, George. Reagents, Stains, and Miscellaneous Test Procedures. In: LENNETTE, EDWINH. (Ed.). Manual of clinical Microbiology. 3.ed. Washington, DC: American Scirty for Microbiology, 1980. pt.11, Media, reagents and stains, cap 98, 1000-1004.
- 11- SOARES, Juarez Braga, CASIMIRO, Antônio Renato S.de, AGUIAR, Laurênia Maria B. A. Microbiologia básica Fortaleza: Edições UFC, 1987. 174p il. (Série: laboratório em microbiologia).