

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DO SAL (CLORETO DE SÓDIO) DE ORIGEM MARINHA ¹

NIBER DA PAZ MOREIRA DA SILVA *, **DJAIR ERNANDEZ ****, **LUIZ ALBERTO PEREIRA **** e **FRANCISCO CAPELA ALVES ****

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

SUMÁRIO: Foram analisadas 19 amostras de SAL (NaCl), tipo grosso, oriundas de diferentes salinas, para verificação da flora microbiana e presença de bactérias nocivas em Microbiologia Alimentar.

O material apresentou grande contaminação por microrganismos saprófitas, bactérias aeróbias e anaeróbias, Gram positivas e negativas, proteolíticas, pigmentadas, esporuladas, leveduras e fungos.

A alta incidência das bactérias halofílicas "vermelhas", responsáveis pela deterioração de carnes, pescados e outros produtos salgados foi estudada. A frequência, em 15 amostras de SAL, de bactérias esporuladas termorresistentes foi calculada em 33%, possuindo um SAL germe termofílico. Para anaeróbios a positividade foi de 80%, havendo esporulação em 40% das culturas isoladas. Os índices para leveduras e fungos foram de 73% e 93%, respectivamente.

SENDO os trabalhos referentes à poluição microbiana do SAL (NaCl), de origem marinha, relativamente escassos, e havendo falta de informações sobre as especificações microbiológicas admissíveis no produto de consumo alimentar, parece-nos oportuno estudar o problema. Estando, também, o assunto dentro do "Programa de Higiene Alimentar" da WHO, no "Programa de Padronização de Alimentos" da FAO/WHO preparando o "CODEX ALIMENTARIUS", e em futura cogitação as normas para o SAL,

¹ Recebido para publicação em 16-12-74 e aprovado em 23-4-75.

Trabalho realizado no Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

* Pesquisador em Biologia (IOC), Bolsista do CNPq.

** Estagiários no DMI, IOC.

tipo internacional, resolvemos fazer uma análise de algumas amostras do nosso produto, visando à verificação da presença de bactérias e outros microrganismos considerados nocivos em Microbiologia Alimentar.

É fato constatado ser o SAL marinho veículo de bactérias proteolíticas, aeróbias pigmentadas, outras anaeróbias, esporuladas, responsáveis pela deterioração de alimentos, quando o SAL é usado como agente conservador, sem ser refinado, ou submetido a processo de beneficiamento que permita a sua esterilização. Muitas indústrias têm defrontado o problema do crescimento de bactérias halofílicas nas suas mercadorias. O aparecimento de coloração vermelha resultante do desenvolvimento de microrganismos nos produtos salgados é observado há muitos anos. Vários pesquisadores estudaram a ação dos germes halofílicos pigmentados no pescado (1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 20, 21, 23, 35) e outros descreveram na salga da carne a instalação dessas bactérias (8, 15, 16, 26, 30) produzindo o denominado "vermelhão" do charque. Na indústria de couros e peles, da mesma forma, a questão do SAL como portador de bactérias tem sido considerada. (1, 3, 24, 25, 27, 28, 32, 33) A ação prejudicial dos halofílicos causando alterações não se restringe, apenas, ao pescado, charque, couros e peles, sendo que outras indústrias enfrentam o problema, pois estes microrganismos têm sido isolados de bacon (17, 31), azeitonas e pepinos. (22, 34). Conforme acentua Flannery (13) o crescimento halofílico tem perturbado até a indústria petrolífera no sistema de injeção de água salgada.

Outro aspecto da importância da qualidade do SAL empregado foi bem focalizado na produção de laticínios por Santos, (29), em 1965, ressaltando a exigência de ser o SAL bacteriologicamente puro, portanto refinado e esterilizado, particularmente na elaboração do queijo e manteiga.

Além do prejuízo econômico decorrente do desenvolvimento dos halofílicos nos alimentos, muito mais grave a considerar é o problema de saúde pública. Kawabata e Sakaguchi (22) citam, anualmente, no Japão, 2.000 surtos de intoxicação alimentar, envolvendo cerca de 20.000 a 30.000 casos, dos quais 50 a 60% estão relacionados a pescado ou seus produtos.

Os agentes etiológicos não foram identificados em mais de 80% dos surtos, sendo que espécies bacterianas conhecidas foram determinadas em 50 a 60% dos casos diagnosticados. Recentemente, as "bactérias halofílicas patogênicas" estão sendo consideradas possíveis agentes quando os casos de intoxicação alimentar têm origem desconhecida. DEMPSTER et als, (8), em 1973, estudaram as fontes de contaminação de carnes cozidas, salgadas ou não, prontas para o consumo. No caso dos produtos salgados, as carnes cruas e as salmouras são as fontes, em potencial, de bactérias patogênicas.

Baseados nesses dados realizamos, então, uma experiência inicial com 4 amostras de SAL grosso, originárias de salinas do Ceará, Rio Grande do Norte e Estado do Rio de Janeiro.

Posteriormente, foram selecionadas mais 15 amostras deste último Estado para um estudo mais detalhado. O exame constou de determinação quantitativa e análise morfológica da flora microbiana presente no nosso SAL de origem marinha.

MATERIAL E MÉTODOS

19 amostras de SAL, tipo grosso, (17 do Estado do Rio de Janeiro, 1 do Ceará e 1 do Rio Grande do Norte) sendo que 15 amostras foram acondicionadas em vidraria estéril, preservadas para não perder a umidade e transportadas com os cuidados necessários para não haver alteração na sua flora microbiana.

MEIOS:

1) Para crescimento, isolamento e manutenção de germes halofílicos — Meio de Dussault e LaChance (9) segundo "Microbiological Test, Section 8", África do Sul, com pequena modificação:

Sulfato de magnésio 5 g, nitrato de magnésio 1g, cloreto férrico 0,025 g, proteose peptona 5 g, glicerol 10 g, o SAL (NaCl) a ser examinado 200 g, em 1000 ml de água destilada, aquecendo até a ebulição para dissolver. Ajustado o pH a 7.5. Esterilizado por autoclavagem a 121°C, durante 15 minutos, o meio era dividido em duas porções iguais: a uma juntamos leite desnatado a 10% e a outra agar (Difco) a 3%. Antes de usar, fundimos a metade com o agar, misturando-a à porção com o leite, previamente aquecida.

Trabalhamos de acordo com a fórmula original, tendo observado que o uso do leite natural, desnatado, quando misturado, frequentemente, coagulava mesmo que a distribuição do meio fosse feita dentro do menor tempo possível. Conseguimos bom resultado substituindo-o por leite desnatado em pó, tipo Mococa, que adicionamos, depois de esterilizado, ao volume total do meio com o agar a 3%, depois de fundido. A mistura foi distribuída em placas de Petri de 15 x 100 mm, em volume de 15 a 18 ml, e em tubos (15 x 150 mm) inclinados. O teste de esterilidade realizado em estufa a 37°C, por 24 horas.

2) Meios para bactérias anaeróbias e microaerófilas — Tarozzi (4) e Clausen (6).

3) Para bactérias saprófitas, esporuladas termorresistentes e termofílicas: caldo simples e agar simples (4).

4) Meio para cogumelos — Sabouraud: peptona 10 g, agar 25 g, em 1000 ml de água da torneira. Após aquecimento a 120°C, durante 20 minutos, foi adicionada glicose a 3% e extrato de malte a 0,5%. O pH ajustado a 7.0.

Depois de distribuído em tubos, esterilizado a 115-118°C por 20 minutos.

TÉCNICAS:

1) Para o isolamento e contagem de bactérias halofílicas aeróbias, com verificação da incidência das halofílicas vermelhas, o SAL foi trabalhado em bruto e em diluições. Na análise do SAL bruto pesamos 200 mg de cada amostra, triturando-a em gral estéril, e semeando em duas placas de Petri contendo o meio específico para bactérias halofílicas. Na primeira, colocamos os 200 mg do SAL triturado, umedecido com 0,2 ml de água destilada estéril e espalhamos, uniformemente, com espátula de Drigalski, sobre a superfície do meio. O material retido na espátula foi esgotado na segunda placa de Petri. As placas semeadas foram incubadas a 37°C, por 48 horas e, depois, deixadas em temperatura ambiente (25 a 28°C) durante 20 dias.

Fizemos, também, uma semeadura repetida dos SAIS, em diferentes diluições para isolamento de colônias. Pesamos 1g de cada SAL, em recipiente estéril, obtendo diluições a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e a 10^{-5} . Em segunda prova, diluições a 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 e 1/1600. Para cada diluição semeadas no meio de Dussault e LaChance 0,2 ml, por espalhamento em superfície e, ainda, em placas de Petri com agar simples. O material repicado esteve incubado a 37°C, por 48 horas e, posteriormente, deixado em temperatura ambiente (25 a 28°C).

Realizamos a leitura após 20 dias de incubação, estando os resultados nas TABELAS I, II e III, correspondentes à média de contagem nas placas para cada amostra de SAL.

2) Determinação da presença de bactérias anaeróbias no SAL: a partir de diluições de cada amostra a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram feitos repiques, em profundidade; nos meios de Tarozzi e Clausen. Depois de incubação a 37°C, por 48 horas, e em temperatura ambiente (25 a 28°C) por 8 dias, fizemos com os tubos apresentando crescimento uma prova confirmatória. Utilizamos o meio bacteriológico básico, o agar simples, para isolamento das anaeróbias,

partindo das culturas positivas, depois de fazer uma sementeira em superfície. Colocamos as placas em Jarra, tipo Brewer, fizemos três lavagens com mistura gasosa de CO₂ e N (5 para 95%) e incubamos acima de 72 horas.

Como testemunha, para verificar o crescimento em condições de estrita anaerobiose, usamos *Clostridium septicum* e *novyi* semeados em agar sangue.

3) Verificação de bactérias saprófitas, esporuladas termorresistentes e termofílicas: pesamos, esterilmente, 1 g de cada SAL, e em água destilada esterilizada preparamos diluições a 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, semeando, posteriormente, 0,2 ml de cada diluição em caldo simples. Para obter o crescimento dos microrganismos saprófitas incubamos alguns tubos a 37°C, por 24 horas. Na diferenciação das bactérias esporuladas termorresistentes, fizemos um aquecimento, em banho-maria a 73-75°C, durante 30 minutos, antes de incubar a 37°C, 24 horas.

Finalmente, para bactérias termofílicas colocamos os tubos de caldo simples semeados em água a 100°C, por 10 minutos, e incubamos depois a 37°C, durante 24 horas.

4) No estudo dos cogumelos usamos, para o isolamento e identificação dos crescidos no meio de Dussault e LaChance, o meio de Sabouraud, anteriormente citado, trabalhando de acordo com a técnica micrológica.

RESULTADOS

Os resultados da experiência preliminar, com reduzido número de amostras de SAL, oriundas de algumas salinas nacionais, estão expressos nas TABELAS I e II e na Fig. 1. Pela análise quantitativa verifica-se alta incidência de bactérias halofílicas nas amostras A e B, revelada com a observação, somente, de 3 dias de incubação a 37°C, sendo o prazo habitual de, no mínimo, 20 dias, para obtenção do crescimento máximo de colônias. É interessante notar que a amostra representativa A, trazia indicação de estar o produto beneficiado, cor-

TABELA I

CONTAGEM DE BACTÉRIAS HALOFÍLICAS/g EM MEIO DE DUSSAULT E LACHANCE

Dias	S A L			
	A	B	C	D
3	8.000	500	—	—
26	97.750	21.000	—	1.500

TABELA II

CONTAGEM DE BACTÉRIAS AERÓBIAS SAPRÓFITAS /g EM MEIO DE AGAR SIMPLES

Dias	S A L			
	A	B	C	D
3	500	250	650	1.550
26	450	300	In c§	1.450

§ = Incontável

AMOSTRAS DE SAL:

- A — Estado do Rio de Janeiro (produto beneficiado)
- B — Estado do Rio de Janeiro (sal grosso)
- C — Rio Grande do Norte (sal grosso)
- D — Ceará (sal grosso)

respondendo, realmente, à granulometria exigida para o consumo. Comparando-se os dados, conclui-se pela ausência das halofílicas na amostra C, índice de sua ótima qualidade, resultante, provavelmente, de condições climáticas regionais (Fig. 5).

Na contagem de bactérias aeróbias saprófitas houve uma inversão nos resultados, com maior contaminação para as amostras C e D (TABELA II), oriundas do Rio Grande do Norte e Ceará, respectivamente. Verificamos que os SAIS A e B apresentavam bactérias termorresistentes e

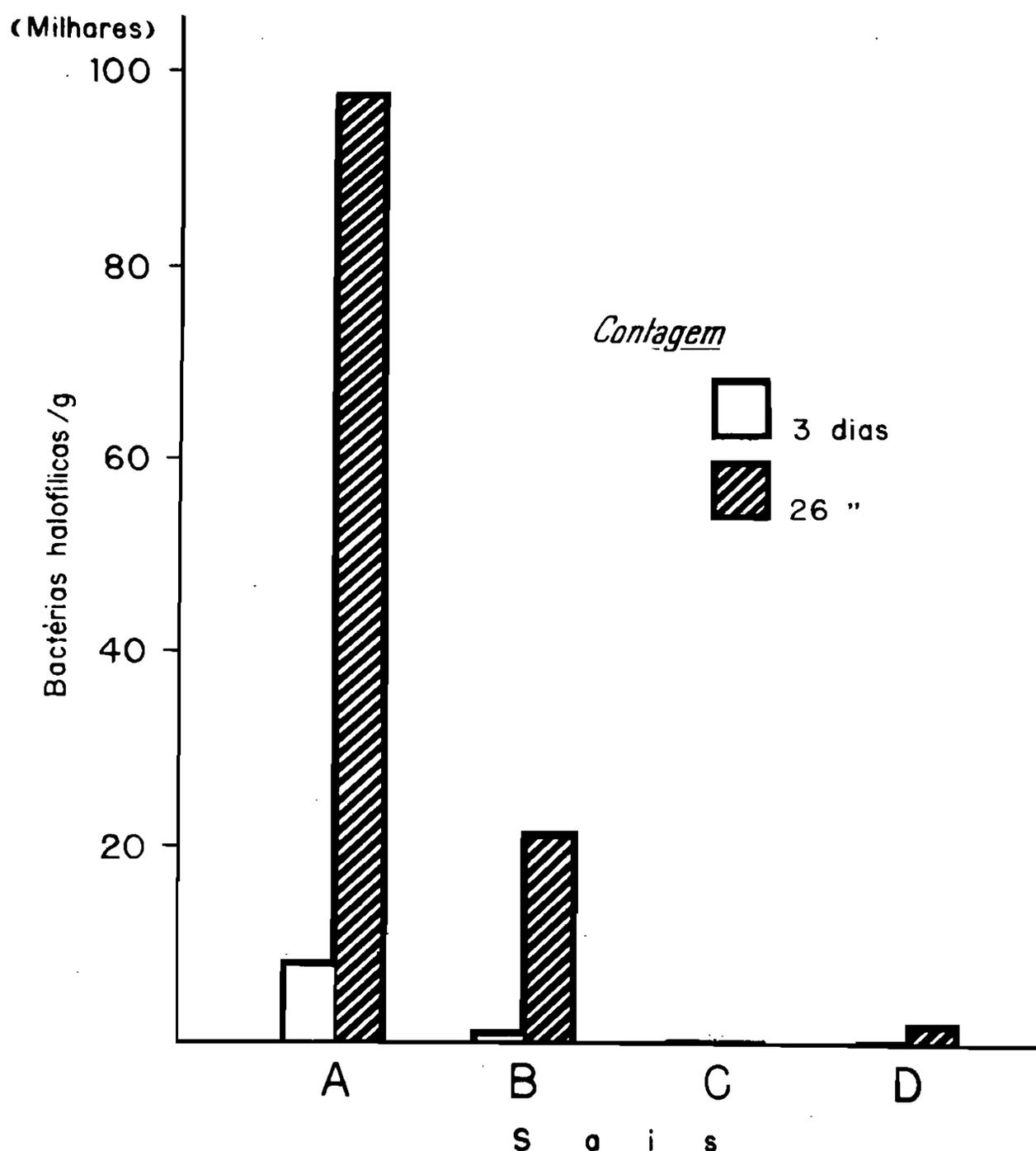


Fig. 1 — Incidência de microrganismos halofílicos em amostras de SAL (NaCl) após observação do crescimento com 3 e 26 dias.

que o D continha bactéria termofílica. Os anaeróbios cresceram nas amostras A e D e germes facultativos ou microaerófilos nos outros 2 SAIS.

O estudo realizado, depois, nas 15 amostras de SAL revelou, em todas, bactérias consideradas extremamente halofílicas, necessitando de 20% de cloreto de sódio para o seu desenvolvimento, apresentando-se pigmentadas em vermelho, alaranjado, amarelo e incolores.

Observando a Fig. 2 verifica-se a incidência das halofílicas vermelhas, confirmadas pela presença de pigmentos carotenóides nas colônias crescidas em placas (Figs. 3 e 4), e nas culturas obtidas por isolamento (Fig. 6).

Assim, todos os 15 SAIS apresentaram bactérias halofílicas vermelhas, em maior ou menor proporção e muitos, também, leveduras. Na contagem total (TABELA III) a amostra n.º 6 tinha menor quantidade de microrganismos, porém com predominância de halofílicas vermelhas (88,4%). No SAL com maior poluição microbiana, o de n.º 7, a presença destas era de 14,6%.

Na TABELA IV verifica-se que, com exceção de duas amostras de SAL, as demais acusaram contaminação por germes saprófitas, correspondendo a uma ausência de 13%. A frequência das bactérias esporuladas termorresistentes foi calculada em 33%, portanto, 1/3 do material estudado apresentou contaminantes resistentes ao calor.

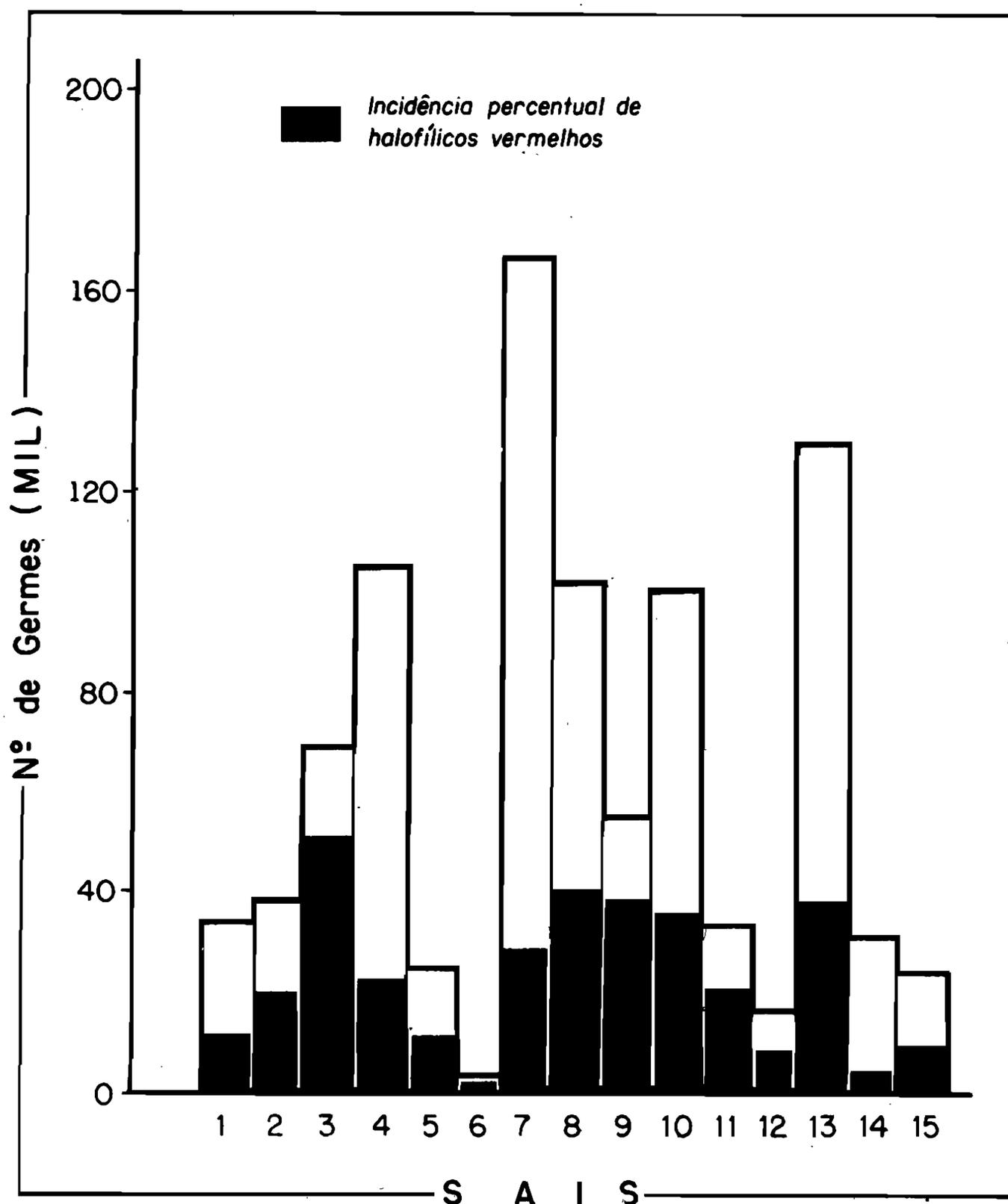


Fig. 2 — Incidência percentual de bactérias “halofílicas vermelhas” em amostras de SAL (NaCl), tipo grosso.

Entretanto, pela observação da referida TABELA, constata-se que o resultado para bactérias termofílicas foi negativo, sendo que uma amostra apresentou fungo resistente ao aquecimento a 100°C, durante 10 minutos.

No cultivo para bactérias anaeróbias (TABELA V), observamos que somente 3 SAIS não apresentaram microrganismos, crescendo em anaerobiose, o que significa um índice de 80% de positividade.

Quanto ao crescimento de germes microaerófilos foi visto, apenas, em 2 SAIS.

Realizamos o estudo morfológico qualitativo (TABELA VI), tendo encontrado, entre os germes aeróbios, bacilos Gram negativos (86%) e positivos (73%), isolados, em paliçada ou cadeia, longos e curtos, grossos e delgados, fusiformes e curvos, esporulados e muitos com mobilidade.

A presença de cocos, calculada em 60% das amostras, era bastante diversificada nos tipos isolados, aos pares, em tétrades, cubos, cachos e curtas cadeias. Conforme a TABELA VI, entre os anaeróbios encontramos 53% de bacilos Gram-positivos e

TABELA III
CONTAGEM DE GERMES HALOFÍLICOS
AERÓBIOS

Sais	Número de microrganismos/g	Halofílicos vermelhos %
1	36.000	30,5
2	38.000	52,1
3	69.800	73,0
4	105.400	21,2
5	24.200	43,3
6	2.600	88,4
7	166.200	14,6
8	114.000	39,4
9	54.600	70,3
10	106.800	35,4
11	33.600	61,0
12	15.600	57,6
13	129.400	29,7
14	30.200	12,6
15	23.200	40,2

13% de negativos, com constatação de esporos em 40% das culturas estudadas. As características morfológicas enquadram os microrganismos isolados nos grupos *Halo-*

bacterium, *Bacillus*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* etc. Finalmente, nas amostras dos SAIS examinados encontramos 73% com leveduras e 93% com fungos que serão objeto de outra publicação.

DISCUSSÃO

As intoxicações alimentares estão, comumente, associadas com bactérias originárias de animais, sendo a infecção resultante da ingestão de carnes e subprodutos contaminados.

São muitas as origens da contaminação dos alimentos, sendo que, no caso dos produtos salgados, as salmouras são reconhecidas como uma das fontes de bactéria "food-poisoning". DEMPSTER et als (8) fizeram a análise bacteriológica de 31 amostras de salmouras usadas em supermercados, encontrando 17 com mais de 10^7 microrganismos por mililitro. A incidência de *Escherichia coli* I, *Clostridium* spp e estafilococos coagulase positivo foi alta: 5 amostras apresentaram acima de 10^3 /ml de *E. coli*, 2 mais de 10^2 ml de *Clostridium* spp, e 6 contaminadas com estafilococos numa proporção de 10/ml.

A análise bacteriológica do nosso SAL, de origem marinha, apresentou, também, como resultado uma grande poluição com bactérias Gram negativas e positivas, estafilococos e bacilos anaeróbios esporulados tipo *Clostridium*, além das halofílicas pigmentadas em "vermelho", indesejáveis no processo da salga de carnes, pescados, vísceras e crustáceos.

Alimentos vegetais salgados, da mesma forma, são responsáveis por distúrbios entéricos. KAWABATA e SAKAGUCHI (22) descreveram gastroenteritis em 120 pessoas em um hospital de Yokohama, em 1955, que comeram pepinos salgados. Desconhecida a bactéria causadora, foi isolada do alimen-

TABELA IV
BACTÉRIAS

SAIS n.º	SAPRÓFITAS 37°C — 24 horas			ESPORULADAS Termorresistentes 75°C — 30'			TERMOFÍLICAS 100°C — 10'			OBSERVA- ÇÕES
	1/10	1/100	1/1000	1/10	1/100	1/1000	1/10	1/100	1/1000	
1	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	
2	++	—	—	—	—	—	—	—	—	
3	+++	++	—	++	—	—	—	—	—	
4	+++	++	++	++	—	—	—	—	—	
5	+++	++	—	+	—	—	—	—	—	
6	++	+	++	—	—	—	—	—	—	
7	+++	++	—	++	—	—	—	—	—	
8	++	+	—	—	—	—	—	—	—	
9	++	—	—	—	—	—	—	—	—	
10	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	
11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
13	+++	++	++	+++	+	—	—	—	—	Cog. *
14	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
15	++	+++	—	—	—	—	—	—	—	

Negativo = —

Positivo = +

* Presença de cogumelo resistente ao aquecimento a 100°C — 10'.

TABELA V

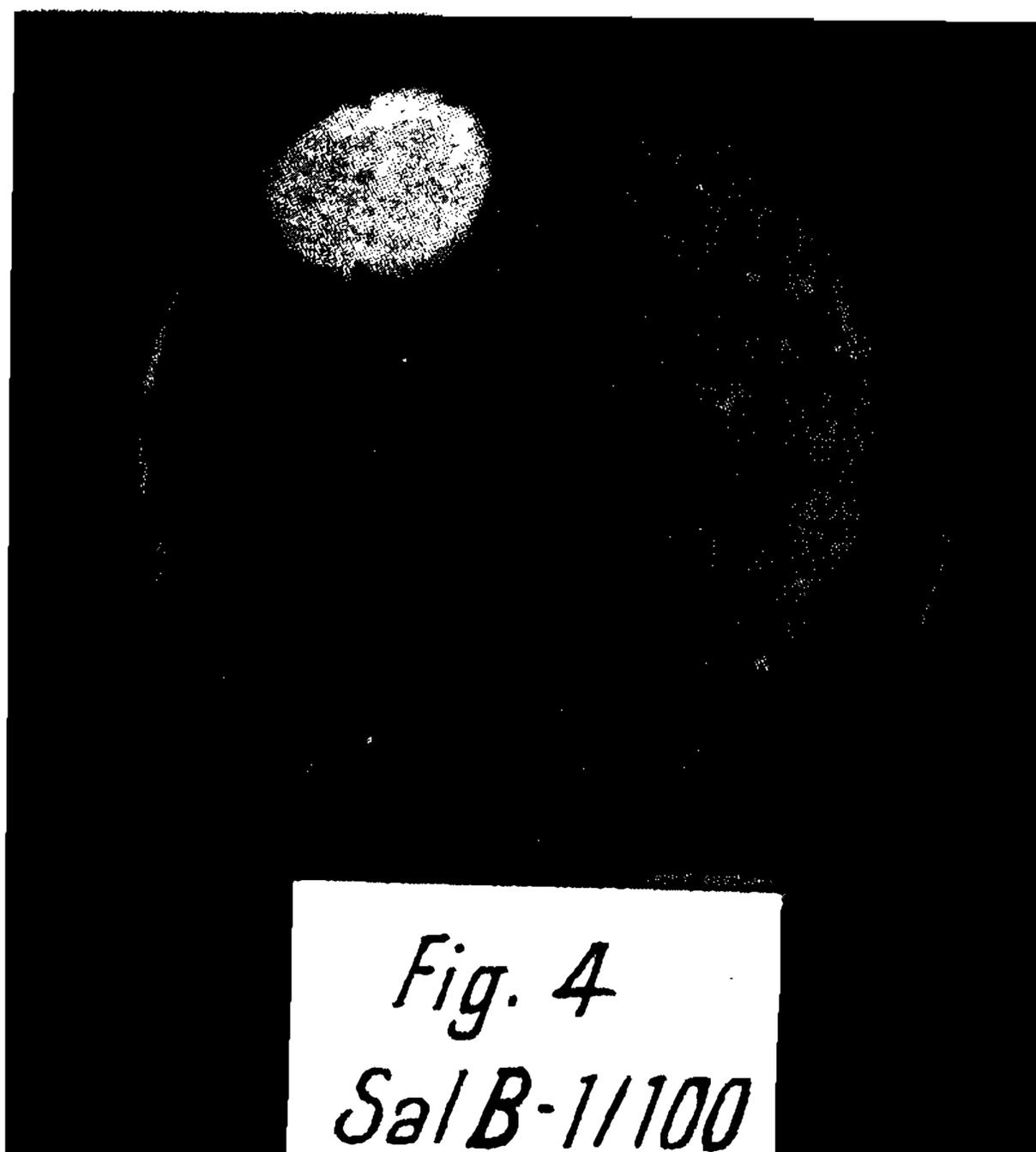
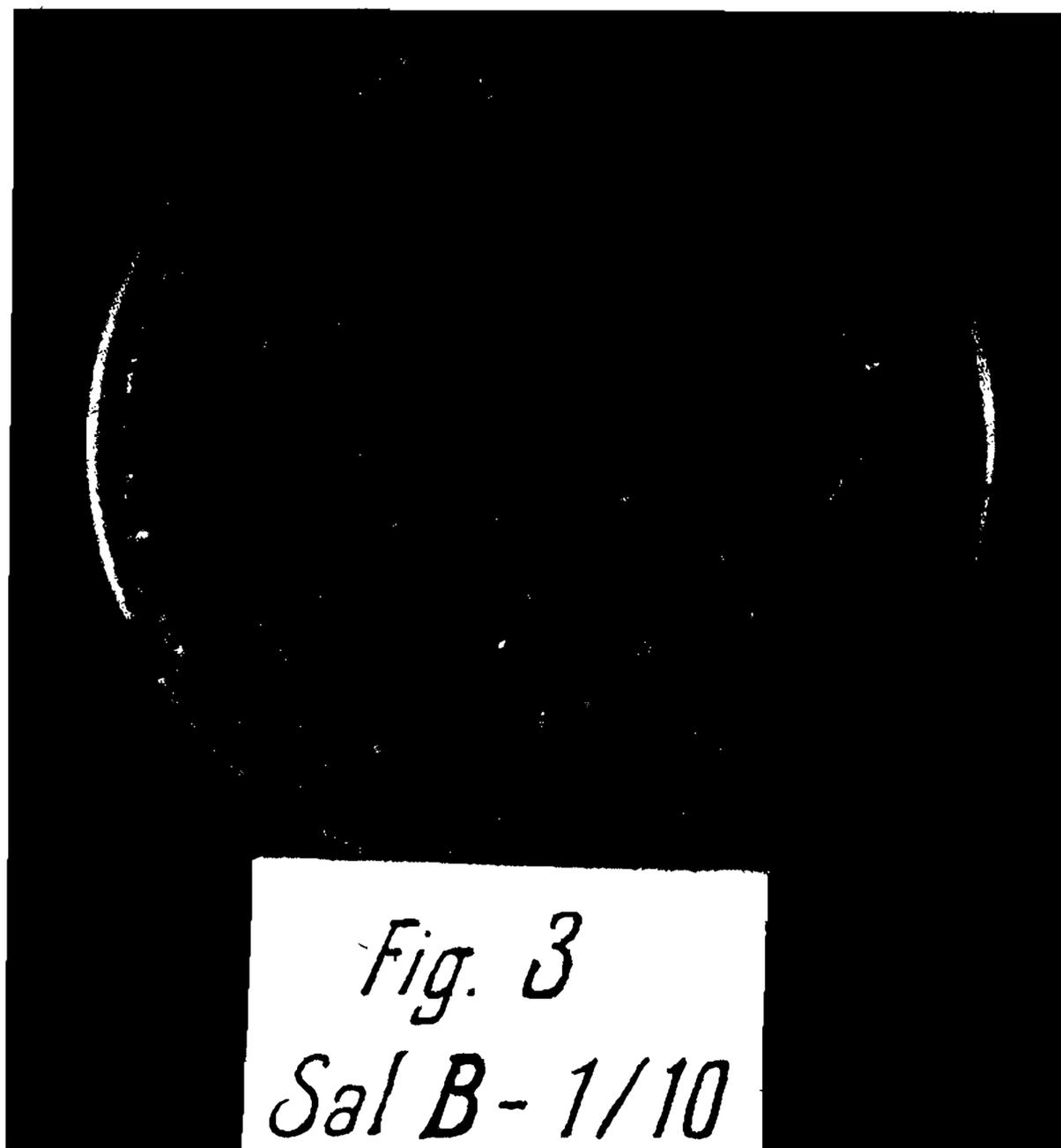
SAIS n.º	BACTÉRIAS			ANAERÓBIAS		
	MEIO DE TAROZZI			MEIO DE CLAUSEN		
	1/10	1/100	1/1000	1/10	1/100	1/1000
1	—	—	—	+	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	+	—	—
4	+	—	—	+	+	—
5	+	—	—	+	—	—
6	+	—	—	+	—	—
7	+	—	—	+	+	—
8	+	—	—	—	+	—
9	+	—	—	—	—	—
10	—	+	—	+	—	—
11	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—
13	+	+	+	+	+	+
14	—	—	+	—	—	+
15	+	—	+	—	—	+

Negativo = —
Positivo = +

TABELA VI

FREQÜÊNCIA DOS TIPOS MORFOLÓGICOS BACTERIANOS, DE FUNGOS E LEVEDURAS NAS AMOSTRAS DOS SAIS

BACTÉRIAS	BACILOS		COCOS	OBSERVAÇÕES
	Gram Negativos	Gram Positivos		
Aeróbias	86%	73%	60%	
Anaeróbias	13%	53%		40% Esporuladas
Cogumelos 93%				
Leveduras 73%				



Figs. 3 e 4 — SAL B nas diluições 1/10 e 1/100 — Crescimento de microrganismos halofílicos, destacando-se as colônias de bactérias "vermelhas".

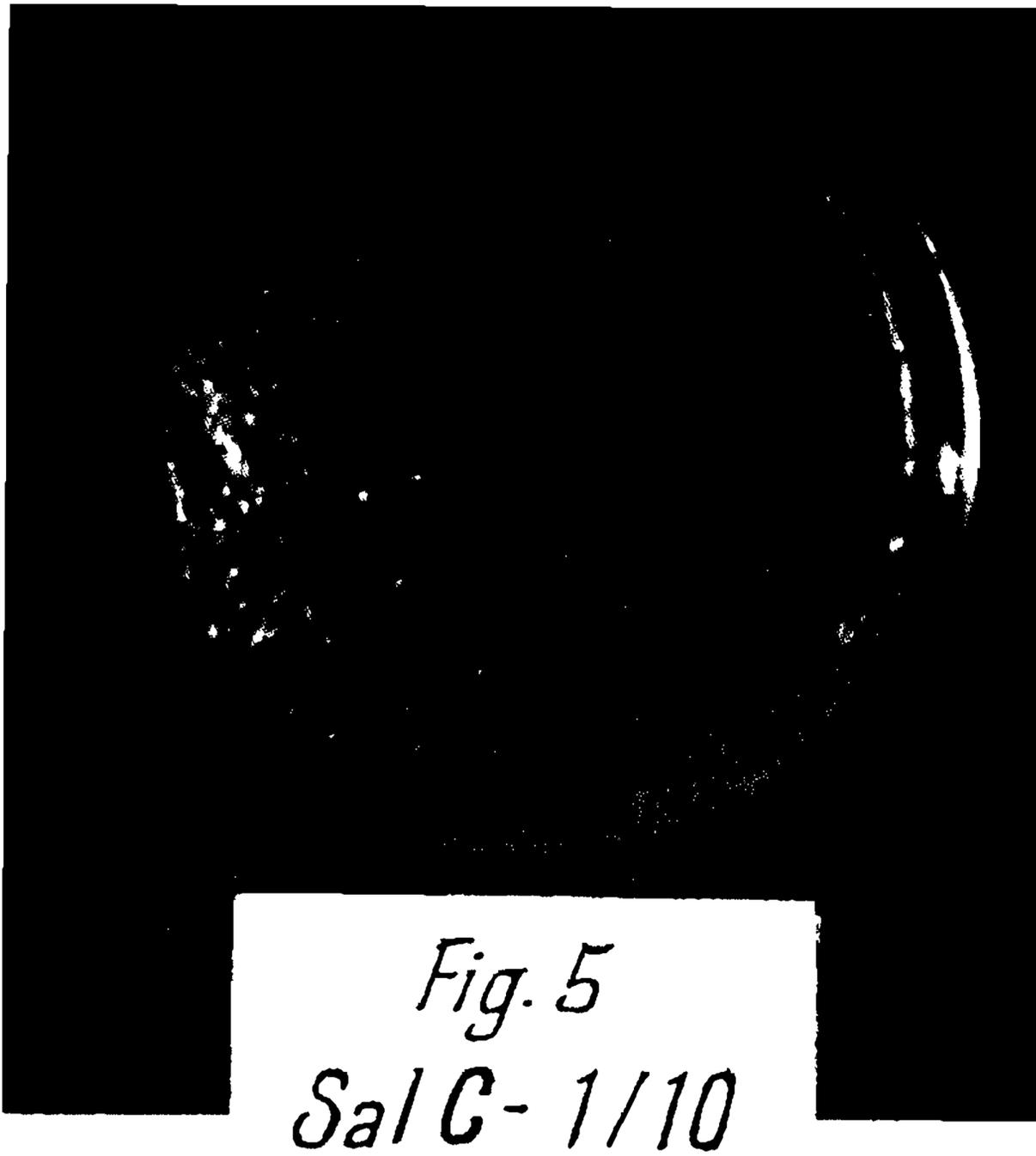
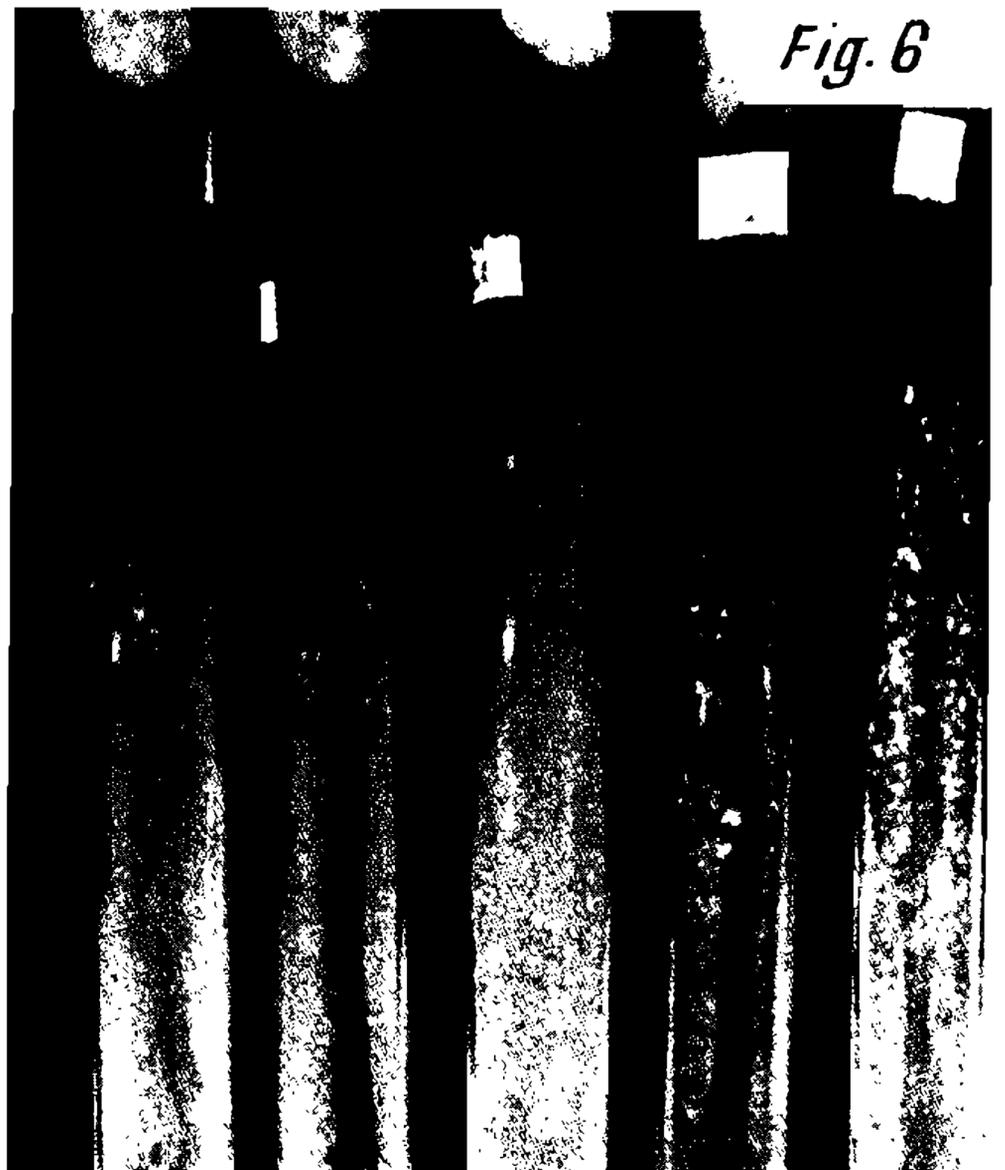


Fig. 5 — SAL C na diluição 1/10. Ausência de crescimento de bactérias halofílicas.

Fig. 6 — Culturas isoladas dos SAIS: crescimento em massa apresentando pigmento carotenóide.



to uma halofílica que aglutinou com o soro dos doentes e reproduziu o quadro clínico em voluntários que ingeriram o pepino artificialmente contaminado. Assim, a importância dos "halofílicos patogênicos" vem sendo considerada, principalmente, no Japão onde se estuda a sua distribuição na natureza, admitindo-se a sua origem na água do mar litorâneo.

Concluimos pela necessidade de melhor conhecimento da flora microbiana existente no nosso SAL, largamente empregado em determinadas regiões sem ser beneficiado, ou submetido a processo de esterilização que torne o produto qualificado para consumo alimentar.

S U M M A R Y

Microbiological study of marine salt (sodium chloride)

19 samples of marine salt (NaCl), granular type, from different salines, were analyzed to verify the microbial flora and the presence of "food-poisoning" bacteria.

The material presented a great contamination by saprophytic microorganisms, aerobic and anaerobic bacteria Gram positives and negatives, proteolytics, pigmented, sporulated, yeast and fungi.

The high incidence of "red halophilic bacteria", responsible for meat deterioration, fish and other salted products, was studied. The frequency, in 15 samples of salt, of sporulated heat-resistant bacteria was estimated at 33% containing one salt thermophilic germ. For anaerobic microorganisms the positiveness reached 80%, sporulation processed in 40% of the isolated cultures. The index for yeast and fungi was 73% and 93%, respectively.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ANDERSEN, H., 1954, The reddening of salted hides and fish. *App. Microbiol.*, 2: 64-69.
- 2 — BECKITH, T. D., 1911, The bacteriological cause of the reddening of cod and other allied fish. *Zentr. Bakt. Parasitenk., Orig., Abt. I.* (60): 351-354.
- 3 — BERGMANN, M., 1929, On the red discoloration of salted hides and on Salt stains. *J. Int. Soc. Leather Trades Chem.*, 13: 599-611.
- 4 — BIER, O., 1966, Bacteriologia e Imunologia, Ed. Melhoramentos, 13.^a Ed. São Paulo: pgs. 811, 815 e 855.
- 5 — BITTING, A. W., 1911, Preparation of the cod and other salt fish for market; including a bacteriological study of the cause of reddening. *U. S. Dep. Agr. Bur. Chem. Bull.* 133.
- 6 — CLAUSEN, O.G., 1956, Modified hydrosulphite medium (Bonnel) as a new aerobic and anaerobic control medium for sterility tests. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 38 (2): 107-118.
- 7 — CLOAKE, P.C., 1923, Red discoloration (so called "Pink" or "Pink-eye") on dried salted fish. *Food Invest. Board Spec. Rept.* 18.
- 8 — DEMPSTER, J.F., REID, N.S. and CODY, O., 1973, Sources of contamination of cooked, ready-to-eat cured and uncured meats. *J. Hyg., (Camb.)* 71: 815-823.
- 9 — DUSSAULT, H.P. and LACHANCE, R.A., 1952, Improved medium for red halophilic bacteria from salt fish. *J. Fish. Res. Board Can.*, 9: 157-163.
- 10 — EDINGTON, A., 1887, An investigation into the nature of the organisms present in "red" cod, and as to the cause of the red coloration. *Pa. Fishery Board, Scotland, Ann. Rpt.*, 6: 207-214.

- 11 — FARLOW, W.G., 1880, On the nature of the peculiar reddening of salted codfish during the summer season. *U.S. Comm. Fish and Fisheries, Pept. 1878 (6)*: 969-973.
- 12 — FARLOW, W.G., 1886, Vegetable parasites of codfish. *U.S. Fishery Comm. Bull.*, 6: 1-4.
- 13 — FLANNERY, W.L., 1956, Current status of knowledge of Halophilic Bacteria. *Bact. Rev.*, 20 (2): 49-66.
- 14 — GIBBONS, N.E., 1936, Bacteria associated with reddening of salt fish. *J. Biol. Board Can.*, 3: 70-76.
- 15 — GUTHEIL, N.C., 1957, Considerações sobre a ocorrência de Bactérias Halófilas Vermelhas na Indústria do Charque. *Rev. Quim. Ind.*, XXVI: 12-15.
- 16 — GUTHEIL, N.C., 1958, Sal na elaboração do Charque. *Brasil Salineiro, Inst. Bras. do Sal, Rio de Janeiro*.
- 17 — HANKINS, O.G., SULZBACHER, W.L., KAUFFMAN, W.R. and MAYO, M.E., 1950, Factors affecting the keeping quality of bacon. *Food Technol.*, 4: 33-38.
- 18 — HANZAWA, H. and TAKEDA, S., 1931, On the reddening of boned codfish. *Arch. Mikrobiol.*, 2: 1-22.
- 19 — HARRISON, F.C. and KENNEDY, M. E., 1922, The red discoloration of cured codfish. *Proc. and Trans. Roy. Soc. Can., Section 5 (16)*: 101-152.
- 20 — HESS, E., 1942, Studies on salt fish. IX Effect of environment upon the growth of red halophilic bacteria. *J. Fisheries Res. Board Can.*, 6: 10-16.
- 21 — HOYE, K., 1906, Recherches sur la moisissure de bacalao et quelque autres microorganismes halophiles. *Bagens Museums Aarbog*, 12: 3-64.
- 22 — KAWABATA, T. and SAKAGUCHI, G., 1963, Halophilic Bacteria as a Cause of Food Poisoning. *Microbiol. Quality of Foods*, Nueva York, N.Y. *Acad. Press*, pgs. 63-70.
- 23 — KELLERMAN, K.F., 1915, Micrococci causing red deterioration of salted codfish. *Zentr. Bak. Parasitenk., Abt. II*, 42: 398-402.
- 24 — LLOYD, D.J., MARRIOT, R.H. and ROBERTSON, M.E., 1929, "Red heat" in salted hides. *J. Int. Soc. Leather Trades Chem.*, 13: 538-569.
- 25 — LOCHHEAD, A.G., 1934, Bacteriological studies on the red discoloration of salted hides. *Can. J. Res.*, 10: 275-286.
- 26 — PACHECO, G. & SANTOS, M.L., 1950, Sobre um germen pigmentado do Charque Rosado. *Rev. Mil. Rem. Vet.*, 10 (3): 75-78.
- 27 — ROBERTSON, M.E., 1931, A note on the cause of certain red colorations on salted hides and a comparison of the growth and survival of halophilic or salt-loving organisms and some ordinary organisms of dirt and putrefaction on media of varying salt concentrations. *J. Hyg.*, 31 (1): 84-95.
- 28 — ROBERTSON, M.E., 1932, "Red Heat" — its causes and prevention. *J. Int. Soc. Leather Trades Chem.*, 16: 564-568.
- 29 — SANTOS, D.S., 1965, O SAL na Indústria de Lactícínios. *Bol. do Leite*, XXXVIII, 441: 1-9.
- 30 — SCHNEIDER, I.S. & NIVEN Jr. C.F., 1959, Estudo da alteração denominada "Vermelhão" do Charque. *Arq. Bras., de Nutr.*, 14: 59-76.
- 31 — SMITH, F.B., 1938, An investigation of a taint in rib bones of bacon. The determination of halophilic vibrios (n.spp.) *Proc. Roy. Soc. Queensland*, 49: 29-52.
- 32 — STUART, L.S., 1935, The morpholo-

gy of bacteria causing reddening of salted hides. *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, 30: 226-235.

- 33 — STUART, L.S., FREY, R.W. and JAMES, L.H., 1933, Microbiological studies of salt in relation to the reddening of salted hides. *U.S. Dep. Agr. Tech. Bull.* 383: 1.
- 34 — WEST, N.S., GILILLAND, J.R., and VAUGHN, R.H., 1941, Characteristics of coliform bacteria from olives. *J. Bacteriol.*, 41: 341-354.
- 35 — VENKATARAMAN, R. and SCREENIVASAN, A., 1954, Studies on the red halophilic bacteria from salted fish and salt. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 319: 17-23.