

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

APLICAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO  
DA FLORA MICROBIANA DE FRANGO NA AVALI  
AÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DA CAR  
CAÇA

José de Jesús Ibarra León  
Engenheiro Bioquímico

Prof. Dr. Fumio Yokoya  
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrí  
cola da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do t<sup>o</sup>  
tulo de Doutor em Ciências de Alimentos.

CAMPINAS  
1980  
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

## AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente ao "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" do México pela valiosa ajuda prestada através da bolsa concedida.

Ao Professor Doutor Fumio Yokoya, pela sua valiosa orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor André Tosello, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola.

Ao pessoal técnico do Laboratório de Microbiologia, pela cooperação e amizade prestada durante minha permanência nesta Faculdade.

Ao amigo Humberto Pitoli, pela revisão correção do texto.

Ao Professor e amigo Ramón Hinojosa Gutierrez, pelas sugestões e apoio prestados.

À minha esposa e filhos, que com valor suportaram as saudades da terra natal e da família.

Ao nobre e valente frango, que fez possível o presente trabalho.

CONTEÚDO

	página
ÍNDICE DE QUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1. RESUMO	01
2. SUMMARY	03
3. INTRODUÇÃO	05
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
4.1. Os microrganismos psicrotróficos na decomposição de frango refrigerado	09
4.2. A influência das condições de processamento na contaminação da carcaça e na sua vida de prate leira	13
4.3. Técnicas de amostragem de carcaças para conta gens microbiológicas.	21
4.4. Métodos para avaliar a contaminação microbiolôgi ca de frango e a sua vida de prateleira	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	
5.1. Material	28
5.2. Métodos	29
5.2.1. Amostragem de frango	29
5.2.2. Contagens microbiológicas	29

5.2.3. Parâmetros de crescimento da flora conta <u>minante</u> do frango frigorificado	30
5.2.4. Determinação do porcentual de psicotrô <u>fi</u> cos em uma única temperatura	31
5.2.5. Padrão de absorbância x número de micr <u>or</u> ganismos	32
5.2.6. Isolamento e caracterização dos psicotrô <u>fi</u> cos contaminantes da carcaça	32
5.2.7. Avaliação da população microbiana de car <u>ca</u> ças de frango pelo método proposto	37
5.2.8. Energia de ativação de culturas puras de psicotrô <u>fi</u> cos	39
6. RESULTADOS	41
6.1. Parâmetros de crescimento microbiano	41
6.3. Porcentagem de psicotrô <u>fi</u> cos na flora microbiana do frango	42
6.4. Identificação de psicotrô <u>fi</u> cos na flora microbiana de frango	42
6.5. Padrão de absorbância x número de micr <u>or</u> ganismos	43
6.6. Parâmetros de crescimento de culturas puras	43
6.7. Avaliação da contaminação microbiolô <u>gi</u> ca das car <u>ca</u> ças analisadas	43
6.8. Energias de ativação de culturas puras de psicotrô <u>fi</u> cos	44

7. DISCUSSÃO	
7.1. Contaminação microbiológica das carcaças	45
7.2. Parâmetros de crescimento da flora microbiana do frango armazenado sob refrigeração	49
7.3. Porcentagens de psicrotróficos na flora microbiana de frango incubada a diversas temperaturas	51
7.4. Gêneros microbianos contaminantes no frango frigorificado	53
7.5. Avaliação das populações microbianas total e de psicrotróficos pelo método proposto	56
7.6. Energias de ativação de culturas de psicrotróficos	59
8. CONCLUSÕES	60
EXEMPLO DE CÁLCULO	61
9. BIBLIOGRAFIA	94

ÍNDICE DE QUADROS

	página
QUADRO 1. Contagens microbianas em carcaças de frango obtidas pelas técnicas do cotonete de algodão e da retirada de pele (Yokoya and Zulzke, 1975)	23
QUADRO 2. Contagens microbianas em frango, expressas como número/cm <sup>2</sup> , após 0, 48, 96 e 144 horas de armazenamento a 4 - 5 °C das carcaças	63
QUADRO 3. Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4 - 5 °C, incubada a diversas temperaturas em infusão de miolo e coração (BHI) 1a. repetição	64
QUADRO 4. Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4 - 5 °C, incubada a diversas temperaturas em infusão de miolo e coração (BHI) 2a. repetição	65
QUADRO 5. Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4 - 5 °C, incubada a diversas temperaturas em infusão de miolo e coração (BHI) 3a. repetição	66

- QUADRO 6. Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4 - 5 °C, incubada a diversas temperaturas em infusão de miolo e coração (BHI) 4a. repetição 67
- QUADRO 7. Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4 - 5 °C, incubada a diversas temperaturas em infusão de miolo e coração (BHI) 5a. repetição 68
- QUADRO 8. Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4 - 5 °C, incubada a diversas temperaturas em infusão de miolo e coração (BHI) 6a. repetição 69
- QUADRO 9. Tempos de duplicação (hr) da flora microbiana de frango durante o armazenamento a 4 - 5 °C 70
- QUADRO 10. Proporção de psicrotróficos na flora microbiana de frango no início e após 144 horas de armazenamento a 4 - 5 °C; determinado pela incubação em BHI a 28 e 36 °C até final da fase exponencial de crescimento 71
- QUADRO 11. Porcentual de psicrotróficos na flora microbiana de frango imediatamente após o processamento, obtido através das contagens de microrganismos totais e psicrotróficos pelo

- método padrão na suspensão da carcaça e nesta suspensão incubada em BHI a 28 °C até absorvância de 0,6 a 0,9 72
- QUADRO 12. Resultados dos testes aplicados em culturas puras de psicrotróficos de frango isoladas no início da armazenagem frigorificada a 4-5 °C 73
- QUADRO 13. Resultados dos testes aplicados em culturas puras de psicrotróficos de frango no final da estocagem frigorificada 74
- QUADRO 14. Resultados dos testes aplicados em culturas puras de psicrotróficos de franco recém-processado, isolados da suspensão microbiana incubada em BHI a 28 °C 75
- QUADRO 15. Resultados dos testes aplicados em culturas puras de psicrotróficos de frango no final da estocagem, isoladas da suspensão microbiana incubada em BHI a 28 °C 76
- QUADRO 16. Contagens de microrganismos totais e de psicrotróficos na microflora da carcaça de frango recém-processada, obtidas após incubação em BHI a 28 °C e amostradas a diferentes absorvâncias da fase de crescimento 77



- QUADRO 17. Comparação das contagens microbianas totais-  
avaliadas pelo método proposto com aquelas  
obtidas por plaqueamento dos microrganismos-  
das carcaças no início do armazenamento a  
4 - 5 °C 78
- QUADRO 18. Comparação das contagens totais avaliadas pe  
lo método proposto com aquelas obtidas por  
plaqueamento dos microrganismos das carcaças  
armazenadas por 48 horas a 4 - 5 °C 79
- QUADRO 19. Comparação das contagens microbianas totais  
avaliadas pelo método proposto com aquelas  
obtidas por plaqueamento dos microrganismos-  
das carcaças armazenadas por 96 horas a  
4 - 5 °C 80
- QUADRO 20. Comparação das contagens microbianas totais  
avaliadas pelo método proposto com aquelas  
obtidas por plaqueamento dos microrganismos-  
das carcaças armazenadas por 144 horas a  
4 - 5 °C 81
- QUADRO 21. Comparação das contagens de psicrotróficos a  
v aliadas pelo método proposto com aquelas ob  
tidas por plaqueamento dos microrganismos das  
carcaças no início do armazenamento a 4 - 5  
°C 82

- QUADRO 22. Comparação das contagens de psicrotróficos a validadas pelo método proposto com aquelas obtidas por plaqueamento dos microrganismos das carcaças armazenadas por 48 horas a 4 - 5 °C 83
- QUADRO 23. Comparação das contagens de psicrotróficos a validadas pelo método proposto com aquelas obtidas por plaqueamento dos microrganismos das carcaças armazenadas por 96 horas a 4 - 5 °C 84
- QUADRO 24. Comparação das contagens de psicrotróficos a validadas pelo método proposto com aquelas obtidas por plaqueamento dos microrganismos das carcaças armazenadas por 144 horas a 4 - 5 °C 85
- QUADRO 25. Correlação entre os valores das contagens de microrganismos totais e de psicrotróficos obtidos pelo método proposto com aqueles obtidos pelo método padrão 86
- QUADRO 26. Velocidades de crescimento ( $\text{hr}^{-1}$ ) de microrganismos psicrotróficos isolados do frango e incubados em BHI 87

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA 1. Curva de crescimento microbiano a temperatura constante	08
FIGURA 2. Comparação de diversas técnicas de amostragem de carcaças de frango para contagem microbiana (Fromm, 1959)	24
FIGURA 3. Crescimento em BHI a 28 °C, da flora microbiana de frango imediatamente após o processamento	88
FIGURA 4. Relação entre a contagem total e a absorbância dos microrganismos do frango recém-processado, cultivados em BHI a 28 °C	89
FIGURA 5. Relação entre a contagem de psicotróficos e a absorbância dos microrganismos do frango recém processado, cultivados em BHI a 28 °C	90
FIGURA 6. Crescimento em BHI a 28 °C, de culturas puras de psicotróficos isoladas de frango com 7 dias de estocagem a 4 - 5 °C	91

FIGURA 7. Crescimento em BHI a  $28^{\circ}\text{C}$ , de culturas puras de psicotróficos isoladas de frango com 7 dias de estocagem a  $4 - 5^{\circ}\text{C}$

92

FIGURA 8. Gráfico de Arrhenius para culturas de psicotróficos isoladas de frango com 7 dias de estocagem a  $4 - 5^{\circ}\text{C}$  e incubadas em BHI

93

## 1. RESUMO

As contagens de microrganismos totais e de psicr<sub>o</sub>tróficos foram comparadas com as estimativas das contaminações ob<sub>t</sub>idas por meio de incremento na absorbância de meio de cultura inoculado com a flora contaminante de carcaças de frango logo a<sub>p</sub>ós o processamento e após a estocagem a 4 - 5 °C por 48, 96 e 144 horas.

Para a estimativa da flora contaminante, as sus<sub>p</sub>ensões microbianas obtidas da superfície da carcaça foram in<sub>o</sub>culadas em BHI e incubadas com agitação a diversas temperaturas na faixa de 26,5 °C até 43,0 °C, acompanhando-se o crescimento microbiano pelo aumento de absorbância.

Gráficos de logarítmo da absorbância contra tempo foram construídos para as temperaturas de incubação estudadas e das curvas traçadas foram calculados os valores de k (velocidade de crescimento, h<sup>-1</sup>) e R, definido pela equação:

$$R = \ln \frac{A_p}{A_o}$$

onde,

A<sub>o</sub> é a absorbância lida no tempo zero da incubação, e

A<sub>p</sub> é a absorbância obtida pelo prolongamento da tangente da curva de crescimento até tempo zero.

Através do gráfico padrão construído com dados de

absorbância contra número de microrganismos, foram calculadas as absorbâncias ( $A_{op}$ ) correspondentes as contagens totais e de psicotróficos nas carcaças após 0, 48, 96 e 144 horas de estocagem. Valores de  $R_1$  ( $R_1 = \ln \frac{A_o}{A_p}$ ) foram calculados para as absorbâncias corrigidas pelo gráfico padrão.

Baseando-se na equação de crescimento microbiano e na equação da constante  $R_1$ , foi desenvolvida uma relação matemática para se avaliar a contaminação das carcaças, utilizando-se dos dados de crescimento a 28 °C e do gráfico padrão.

Os valores obtidos pelo método proposto, quando comparados com aqueles do plaqueamento em meio sólido para contagem total ou de psicotróficos, proporcionaram coeficientes de correlação linear de 0,94; 0,91; 0,88 e 0,64 para contagem total após 0, 48, 96 e 144 horas de estocagem e valores de 0,94; 0,83; 0,82 e 0,86 para contagem de psicotróficos após 0, 48, 96 e 144 horas de estocagem das carcaças.

O método proposto no presente trabalho permite avaliar as contagens microbianas num tempo máximo de 11 horas, o qual abre promissoras perspectivas para a aplicação industrial do método.

## 2. SUMMARY

Total plate counts and psychrotrophics counts were compared with estimation of microbial load on chickens, obtained by increase of the absorbance of culture medium inoculated with the contaminant microflora of the carcasses immediately after processing and after 48, 96 and 144 h of storage at 4 - 5 °C.

For estimating the contaminant microflora on the carcasses, microbial suspensions obtained by sampling the skin were inoculated in BHI and incubated with agitation at different temperatures in the range of 26.5 ° to 43.5 °C, measuring the microbial growth through absorbance (A) increase.

Growth curves were constructed plotting  $\ln A$  vs. time for each incubation temperature and from the curves drawn there were calculated the  $k$  values (growth rate,  $h^{-1}$ ) and  $R$  values which is defined by the equation

$$R = \ln \frac{A_p}{A_0}$$

where,

$A_0$  is the absorbance at time zero of incubation, and

$A_p$  is the absorbance obtained by extending the tangent of the growth curve to zero time.

Using a standard curve constructed with absorbance

ce readings vs number of microorganisms, corrected absorbances (Aop) were calculated for the total plate counts and psychrotrophics counts obtained on the carcasses after 0, 48, 96 and 144 h of storing. Values of  $R_1$  ( $R_1 = \ln \frac{A_D}{A_{Op}}$ ) were calculated for the corrected absorbances using the standard curve.

For evaluation of microbial load on the carcasses, a mathematical relation was developed using the growth and  $R_1$  equations with growth data at 28 °C and the standard curve.

The values obtained by this method, when compared with those of plating, give correlation coefficients of 0.94, 0.91, 0.88 and 0.64 for total plate counts after 0, 48, 96 and 144 h storing and 0.94, 0.83, 0.82 and 0.86 for psychrotrophics-counts after 0, 48, 96 and 144 h of cold storage.

The proposed method in the present work allows the evaluation of microbial load in no more than 11 h, which is very promising for industrial applications.



### 3. INTRODUÇÃO

A produção cada vez maior de alimentos conservados sob refrigeração tem criado a necessidade de um melhor conhecimento dos microrganismos que se desenvolvem a baixas temperaturas e as suas interações com os produtos nos quais crescem. No caso de frango frigorificado, conhecer o número de microrganismos psicotróficos\* presentes imediatamente após o processamento, seria útil não só como parâmetro para se avaliar as condições sanitárias do abatedouro mas também como um dado básico para se prever a vida de prateleira da carcaça.

Wells (1959) e Walker et al (1959) desenvolveram métodos rápidos para avaliar a carga microbiana de carcaças de frango; esses métodos baseiam-se na mudança de cor da resazurina, pela redução do meio de cultura quando se atinge uma certa população microbiana.

Mallman et al (1958) usaram um meio seletivo para a contagem de psicotróficos em frango, usando como inibidor de mesófilos Gram-positivo o Nacconol NRSF e o cloreto de trifetil tetrazolio para correlacionar o crescimento microbiano com a redução do meio de cultura o qual é detectado pela mudança de cor

\*) Microrganismos que crescem bem às temperaturas de refrigeração (Frazier, 1972).

do indicador.

As desvantagens destes métodos são: a) não oferecer, nos primeiros , informação sobre a proporção de psicotróficos na população microbiana avaliada; b) o resultado da análise é obtido somente após 8 horas no caso de contagem total e 72 horas para contagem de psicotróficos, conseguindo-se tempos menores (só na contagem total) quando se trata de frango já em estado avançado de deterioração.

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um método rápido para avaliar a quantidade de psicotróficos em frango, usando para tal fim os parâmetros de crescimento da flora típica de carcaças, quando incubada em uma temperatura que permita o crescimento predominante ou competitivo dos psicotróficos dessa flora mista.

#### 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Existe uma relação direta entre o tempo de incubação a temperatura constante e o aumento no número de microrganismos (Stumbo, 1973) pela qual pode-se conhecer graficamente a população microbiana inicial embora essa flora, heterogênea no caso do frango, possua somente uns poucos microrganismos psicrotróficos que, no final de contas, são responsáveis pela decomposição da carcaça frigorificada. Uma idéia da proporção de psicrotróficos pode ser obtida pelo cálculo do valor R (quociente entre população inicial e população pseudo-inicial obtida pelo prolongamento da tangente da curva de crescimento exponencial até tempo zero), visto que Yokoya e Peres-Canhos (1975), acharam que o valor R de uma suspensão depende da espécie microbiana.

Para cada temperatura de incubação obtem-se uma curva como a mostrada na Figura 1 que nos permite conhecer a população inicial ( $C_0$ ) e calcular o valor  $R = \ln \frac{C_p}{C_0}$  com o qual tem-se uma idéia da proporção de psicrotróficos na suspensão microbiana obtida de uma carcaça.

Este valor R quando calculado a partir de leituras de absorbância, que são diretamente proporcionais à concentração microbiana, ficaria expresso como  $R = \ln \frac{A_p}{A_0}$ .

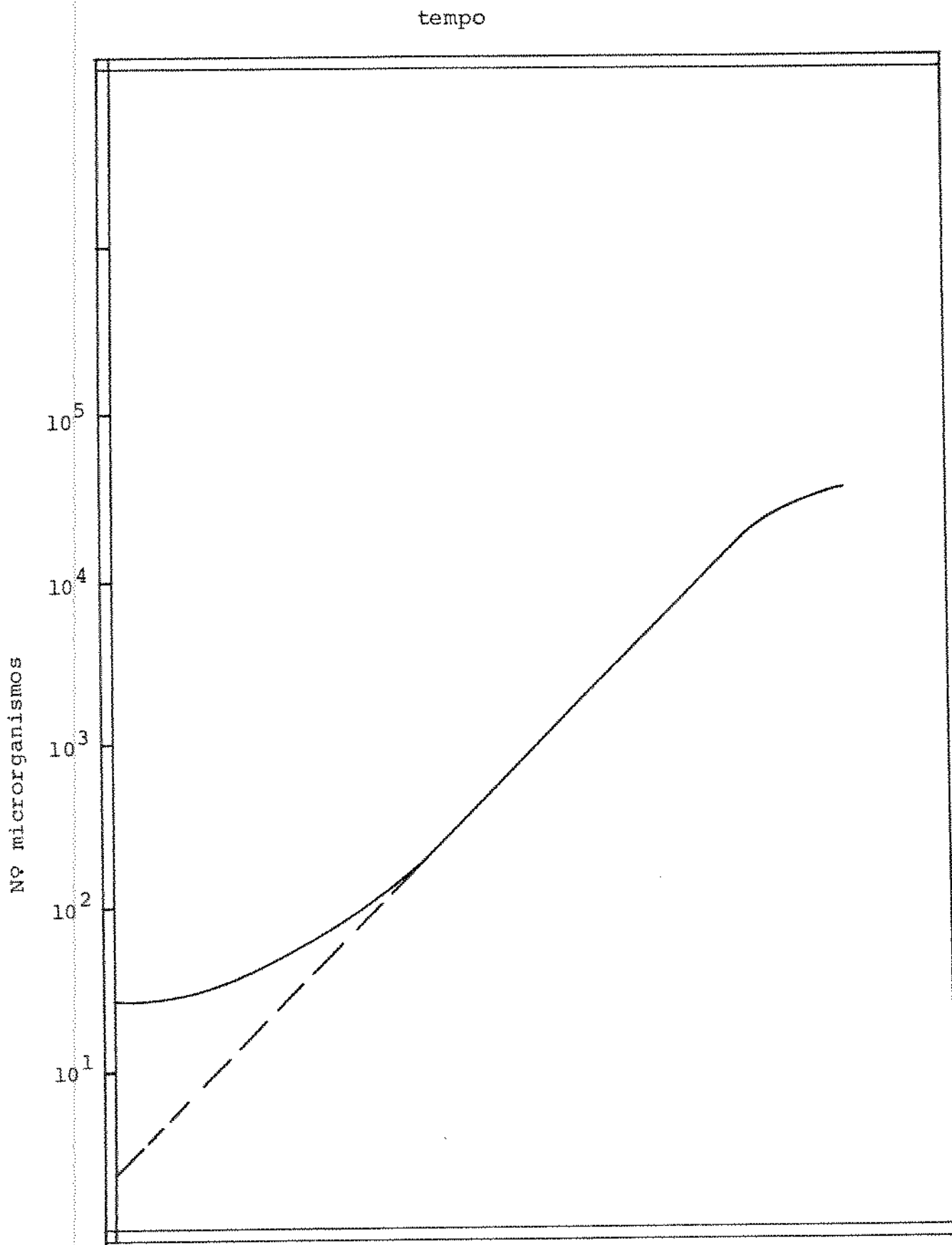


FIGURA 1 - Curva de crescimento microbiano a temperatura constante

#### 4.1. Os microrganismos psicrotróficos na decomposição de frango frigorificado

Apesar de que muitas bactérias podem ser encontradas numa carcaça de frango imediatamente após o processamento, somente umas poucas são potencialmente perigosas ao homem e, na maioria dos casos, menos de 10% da flora microbiana inicial é deterioradora (Barnes, 1976; Barnes and Impey, 1975). As bactérias patogênicas implicadas com envenenamento por ingestão de carne de frango são principalmente *Salmonellae* e *Clostridium perfringens* e, menos frequentemente, *Staphylococcus aureus*. Se estes microrganismos estiverem presentes depois do processamento e ocorrerem condições higiênicas insatisfatórias na cozinha ou nos estabelecimentos de distribuição, eles podem sobreviver e havendo condições de temperatura e umidade favoráveis, multiplicam-se causando infecção ou intoxicação quando o alimento é ingerido. Estas bactérias são mesófilas\* e não se reproduzem a temperaturas da estocagem frigorificada, portanto quando se considera a conservação de frango sob refrigeração, é importante considerar o número total de bactérias patogênicas presentes e o efeito das condições de estocagem sobre a sua sobrevivência -

\*) Aqueles microrganismos cujas temperaturas ótimas de crescimento estão entre 25° a 40°C e mínima de crescimento por volta de 10°C (Farrel and Rose, 1965).

mais do que a sua possibilidade de reprodução (Barnes and Thornley, 1966; Barnes, 1976; Ayres et al, 1950).

Por outro lado, as bactérias psicrotróficas, apesar de não serem patogênicas, são mais importantes economicamente porque são deterioradoras e limitam a vida de estocagem das carcaças, aumentam os gastos no transporte dos alimentos e podem produzir enormes perdas à indústria.

Os estudos de Ayres et al (1950); Nagel et al (1960); Wells (1961) e, Barnes e Impey (1975) têm demonstrado a presença maciça de microrganismos psicrotróficos (principalmente *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium*) no momento da decomposição da carcaça frigorificada, embora imediatamente após o processamento sejam minoria, como se pode observar no quadro abaixo (Barnes e Impey, 1975).

Condições Bacteriológicas de Carcaças de Frango Evisceradas Imediatamente após o Processamento

Contagem a (°C)	Microrganismos/cm <sup>2</sup>
37	7,9 x 10 <sup>3</sup>
20	9,7 x 10 <sup>3</sup>
4	1,6 x 10 <sup>3</sup>

A proporção de psicrotróficos aumenta com o tempo da estocagem frigorificada predominando no momento da decomposição. O quadro seguinte (Barnes, 1976) mostra os diferentes gêneros de microrganismos psicrotróficos frequentemente encontrados em carcaças de frango estocadas sob refrigeração.

Principais Gêneros de Microrganismos Psicrotróficos Encontrados em Carcaças de Frango Estocadas a 1-4°C

Gêneros	Porcentagem de Psicrotróficos	
	Início estocagem (100-1000 N <sup>o</sup> /cm <sup>2</sup> )	No momento da decomposição (10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> N <sup>o</sup> /cm <sup>2</sup> )
<i>Flavobacterium</i>	20	não encontrados
<i>Acinetobacter</i>	50	10
<i>Pseudomonas</i>	10	70-80
<i>Alteromonas</i> *	1	10
<i>Aeromonas</i> , leveduras, <i>Chromobacterium</i> , outros	19	0-10

\*) Atualmente incluídas em *Pseudomonas putrefaciens*.

O aspecto mais importante da influência dos microrganismos psicrotróficos reflete-se na vida de prateleira da carcaça frigorificada, ou seja, no tempo necessário para se atingir a decomposição do frango, manifestada pelo mal cheiro e o desenvolvimento de uma camada branca gelatinosa sobre a pele.

Esse tempo depende principalmente da temperatura de estocagem , mostrando-se no quadro abaixo alguns dados relacionados com este fator.

#### Vida de Prateleira de Frango Frigorificado

Temperatura de estocagem (°C)	Dias até decomposição ( $10^7-10^8$ N <sub>9</sub> /cm <sup>2</sup> )	Referência
10	2 - 3	Ayres <u>et al</u> (1950)
10	3 - 4	Barnes e Thornley(1966)
10	3 - 4	Barnes e Thornley(1975)
4-5	6 - 7	Ayres <u>et al</u> (1950)
4-5	5 - 6	Barnes e Impey (1975)

É esta vida de prateleira tão relativamente curta e o fato de que a maioria do frango se comercializa sob refrigeração o que motiva grande volume de pesquisas a fim de se encontrar métodos que aumentem a sua vida de prateleira.



#### 4.2. A influência das condições de processamento na contaminação da carcaça e na sua vida de prateleira

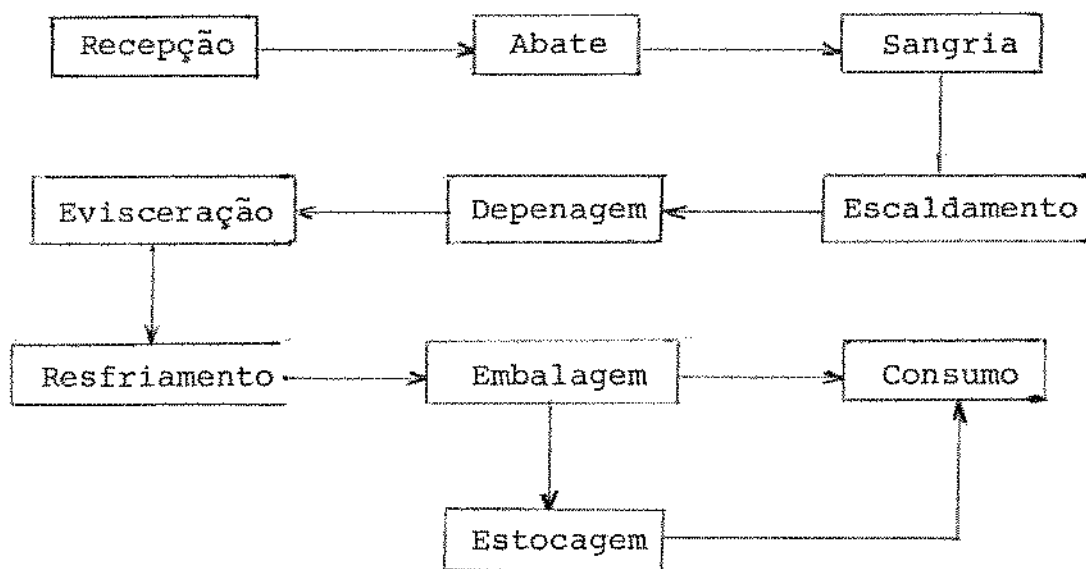
Na atualidade são comercializados dois tipos de frango refrigerado: eviscerado e não eviscerado. No Brasil se produz apenas o primeiro. O segundo é encontrado principalmente na Inglaterra.

A decomposição do frango refrigerado não eviscerado é produzida por bactérias intestinais formadoras de sulfeto de hidrogênio que se difunde através dos intestinos e músculos. Na pele, essa substância, em presença de ar, se combina com pigmentos sangüíneos, formando sulfahemoglobina de cor verde (Barnes, 1976) sendo, portanto, o esverdeamento da pele um indicador da decomposição deste tipo de frango.

Já no frango eviscerado refrigerado a decomposição se manifesta pelo mal cheiro que é ocasionado pelos produtos metabólicos resultantes do crescimento de microrganismos psicrotróficos sobre a pele (Barnes and Shrimpton, 1957; Barnes, 1976).

A produção industrial de frango eviscerado envolve as operações mostradas no diagrama seguinte.

### Principais Operações no Processamento de Frango Eviscerado



As etapas sobre as quais tem-se feito muitas pesquisas são o escaldamento, o resfriamento, a embalagem e a estocagem frigorificada. São raros os estudos sobre os outros passos, como a remoção das penas, das vísceras e outras partes da carcaça, durante os quais ocorre o espalhamento de microrganismos que contaminam o produto, dispendendo-se muitos esforços para se diminuir essa contaminação.

Clark (1968) estudou o efeito do escaldamento no crescimento de psicrotróficos inoculados em pele de frango previamente tirada da carcaça. Ele experimentou três alternativas: escaldamento durante 2 minutos em água a 54°C; durante 1 minuto em água a 59°C e sem escaldamento. Observou que *Pseudomonas* cresceu melhor que *Achromobacter* quando a pele foi escaldada,

sobretudo na água a 59°C. Porém *Achromobacter* cresceu mais na pele não escaldada. Este fato sugere, portanto, que as carcaças escaldadas a 59°C podem ter vida de prateleira mais curta que aquelas tratadas a 54°C, o que explica a vida de prateleira maior mencionada por Ziegler and Stadelman (1955 a) quando usaram água a 54°C no escaldamento das carcaças.

Essary et al (1958) estudaram o efeito de diferentes temperaturas e tempos de escaldamento na vida de prateleira de frango frigorificado e acharam que o tratamento a 53°C durante 60 segundos aumentava em mais um dia a vida de prateleira do que quando se usava água a 59°C durante o mesmo tempo. Neste estudo também observou-se que a vida de prateleira era 3 a 8 dias maior quando as carcaças eram resfriadas durante 4 horas comparadas com as resfriadas por 16 horas e processadas nas mesmas condições.

Clark and Lentz (1969), num trabalho sobre o efeito das condições de operação na qualidade microbiológica das carcaças, concluíram que a contagem de psicotróficos aumentava após o resfriamento, apesar da contagem total microbiana ter diminuído. Pensa-se, portanto, que a etapa de resfriamento é decisiva na determinação da vida de prateleira do frango frigorificado, já que, segundo os autores acima, o percentual de psicotróficos presentes na carcaça cresce nesta fase.

Mead (1975) classifica os métodos de resfriamento de frango em "úmidos", que envolvem o uso de água com ou sem ge-

lo, e "secos", que usam ar frio ou outros gases como agentes resfriadores. Algumas vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de resfriamento são apontados nos trabalhos de Mead (1975) e Thomson et al (1974).

Casale et al (1965) estudaram o efeito dos três métodos de resfriamento de carcaças na contaminação microbiana e na sua vida de prateleiras. A contaminação menor se obteve naquelas carcaças tratadas com água+gelo, seguidas daquelas resfriadas com água a  $0,6^{\circ}\text{C}$  e, finalmente, a contaminação maior apresentou-se naquelas resfriadas com ar a  $4,4^{\circ}\text{C}$ . As contagens imediatamente após o resfriamento variaram de menos de 100 a 72.000 microrganismos/cm<sup>2</sup>. A decomposição se apresentou aos 7 dias de estocagem a  $6,6^{\circ}\text{C}$  nas carcaças resfriadas pelos métodos úmidos e, nas resfriadas com ar a vida de prateleira foi um pouco menor.

Essary et al (1960) fizeram uma pesquisa sobre o efeito do tempo de resfriamento com água adicionada ou não de clorotetraciclina, na qualidade microbiológica das carcaças e demonstraram que tempos maiores resultavam numa contagem mais alta. Também observaram que o uso de tetraciclina na água de resfriamento abaixava a contagem microbiana, sendo que a menor contagem foi obtida quando as carcaças eram resfriadas durante 2 horas com água com clorotetraciclina, mas não fazem menção ao nível de antibiótico usado na água.

Num trabalho feito por McVicker et al (1958), com

parou-se o efeito microbicida de clorotetraciclina ou oxitetraciclina em concentrações de 10 ppm cada na água de resfriamento - que, por sua vez, continha 20 ppm de cloro. As carcaças foram colocadas em gelo e estocadas na geladeira a  $7,2^{\circ}\text{C}$ . O maior efeito bactericida se obteve com clorotetraciclina e, no caso de oxitetraciclina, as contagens microbianas foram ligeiramente inferiores às daquelas de frangos não tratados com antibióticos. Os frangos tratados com clorotetraciclina se estragaram após 16 dias de estocagem, enquanto que os não tratados, aos 10 dias.

Kohler et al (1955) resfriaram carcaças inteiras e retalhadas, em água contendo 0, 3, 10 ou 30 ppm de clorotetraciclina, variando o tempo de resfriamento de 5 minutos a 24 horas e estocando a carne a  $3,0^{\circ}\text{C}$ . Eles concluíram que o tempo necessário para as carcaças atingirem  $10^7$  microrganismos/g foi 7 dias para o caso das não tratadas e de 14 a 21 dias para os frangos tratados com 10 ou 30 ppm de clorotetraciclina.

Num outro estudo sobre o uso de antibióticos no processamento de frango, Ayres et al (1956) usaram clorotetraciclina em concentrações de 0, 1, 3, 10, 30, 90 e 270 ppm assim como 3, 10 e 30 ppm de, respectivamente, oxitetraciclina, tetraciclina ou estreptomicina na água de resfriamento a  $1,7^{\circ}\text{C}$  e resfriamento durante 2 horas em todos os casos.

As contagens totais nos frangos tratados com 30 ppm de clorotetraciclina mantiveram-se em volta de  $10^5$  microrga

nismos/cm<sup>2</sup> nos primeiros 4 dias de estocagem, enquanto que, nos frangos não tratados, foram de quase 1 milhão/cm<sup>2</sup>.

Após 4 dias de estocagem das carcaças, a ação bactericida da clorotetraciclina em função das concentrações usadas apresentou-se em ordem decrescente da maneira seguinte: 30 270 90 10 3 1 0. Após sete dias de estocagem o comportamento foi 30 90 270 3 10 1 0.

A conclusão principal tirada deste trabalho é que concentrações de 3 ou 10 ppm de clorotetraciclina foram as mais eficientes no prolongamento da vida de prateleira das carcaças. Semelhante observação foi feita por Wells et al (1957) e Vaughn et al (1957) usando antibióticos do grupo das tetraciclina.

Walker and Ayres (1958) quantificaram os resíduos de clorotetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina em carcaças resfriadas com água contendo 10 e 30 ppm de cada agente microbicida e avaliaram o efeito do antibiótico residual na resistência dos microrganismos causadores da decomposição do frango refrigerado. Os resultados mostraram que durante as primeiras 48 horas após o processamento a concentração na carcaça diminuía rapidamente, estabilizando-se 2 dias depois. As concentrações residuais dos respectivos antibióticos mudaram segundo o tratamento aplicado durante o resfriamento. Foram maiores enquanto era maior a concentração de antibiótico na água e maior o tempo de res

friamento. As análises mostraram mais antibiótico residual nos frangos resfriados com água contendo 30 ppm do antibiótico que - naquelas resfriadas na água com 10 ppm. O mesmo aconteceu com as carcaças resfriadas durante 120 minutos comparativamente com as resfriadas durante 10 minutos. Um fato interessante constatado - neste estudo foi que a diminuição da quantidade de antibiótico - residual na pele durante a estocagem esteve acompanhada por um acrêscimo na parte interna do músculo até se estabilizar. Os au tores concluíram também que os microrganismos isolados de frango tratado com antibióticos eram mais resistentes a estes que aque- les cujo resfriamento foi em água sem antibióticos.

A Food and Drug Administration dos Estados Unidos aprovou o uso das tetraciclinas na água de resfriamento de fran- go (Walker and Ayres, 1958) estabelecendo, porém, que os resi- duos na carcaça, imediatamente após o processamento não ultrapas- sem 7 ppm, devendo estar ausentes no momento de ser consumido.

O uso de cloro na água de resfriamento de frango e no resto da água utilizada pelo abatedouro tem como objetivo e liminar tanto as bactérias deterioradoras como as de interesse em saúde pública. A ação germicida do cloro restringe-se às bac- térias contidas na água, retiradas da carcaça pela agitação, já que quando o cloro entra em contato com a matéria orgânica é ina tivado. O uso apropriado do cloro na água envolve como parâme - tros principais a vazão de água/carcaça e a concentração de clo- ro residual.

Mead and Thomas (1973 a) testaram três vazões de água (2,5; 5 e 8 l/carcaça) e três concentrações de cloro residual, 10 a 15; 25 a 30 e 45 a 50 ppm a fim de estudar o seu efeito no número de bactérias da água de resfriamento num sistema de três tanques em série. As vazões acima foram também usadas sem adição de cloro. Observou-se que ainda com a concentração menor de cloro residual, 10 a 15 ppm, registrou-se um número de microrganismos 4 vezes menor (no primeiro tanque) do que com água não clorada. A redução maior se obteve logicamente com a vazão de 8 l/carcaça e 45-50 ppm de cloro residual cuja água, após o resfriamento, apresentou contagens menores de 50 microrganismos/ml.

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Mead and Thomas, 1973 b) estabelece um mínimo de 1,9 a 3,8 l de água/carcaça para sistemas de resfriamento em tanques com agitação por parafuso e permite o uso livre de cloro.

Ziegler and Stadelman (1955 b) resfriaram carcaças em água contendo 0, 10 e 20 ppm de cloro residual e observaram que o uso de cloro por si só aumentava a vida de prateleira em 1 a 2 dias. O tempo até decomposição foi quase igual nas duas concentrações de cloro usadas.



#### 4.3. Técnicas de amostragem de carcaças para contagens microbiológicas

Tem-se estudado várias técnicas de amostragem da carcaça de frango a fim de se avaliar a contaminação microbiana existente. As mais utilizadas partem dos seguintes métodos básicos:

- Fricção com cotonete de algodão
- Fricção com cotonete de alginato
- Mergulho de carcaças em soluções salinas
- Corte de pele de superfície conhecida
- Pressão com gel nutritivo sobre a pele do frango.

A amostragem com cotonete de algodão consiste em friccionar este sobre uma superfície conhecida de pele, colocando-se depois o cotonete numa solução salina estéril. Em seguida, agita-se, preparam-se diluições decimais e faz-se o plaqueamento das diluições para contagem das colônias formadas.

O cotonete de alginato usa-se da mesma forma que o de algodão.

Já na técnica de tirar a pele, corta-se um pedaço de superfície conhecida, utilizando-se de bisturi ou faca e de uma placa furada para delimitar a área. Coloca-se a pele numa solução salina estéril, agita-se, preparam-se diluições e plaqueia-se.

Na técnica do mergulho, colocam-se as carcaças em recipientes com água estéril, agita-se fortemente, preparam-se diluições e plaqueia-se.

Finalmente a técnica do gel consiste em pressionar este contra uma superfície conhecida de pele, seguindo-se sua incubação para contagem das colônias desenvolvidas.

Patterson (1972) comparou as contagens obtidas pelos métodos do cotonete de algodão com a técnica da retirada de pele e com a técnica combinada cotonete de algodão-retirada da pele. O estudo consistiu em amostrar diversas partes da carcaça e os resultados evidenciaram que as áreas mais contaminadas foram o pescoço seguido das costas e do ventre. Dos métodos de amostragem usados, o melhor foi aquele combinando cotonete de algodão-retirada da pele, seguido pelo método da retirada da pele sem combinação alguma.

Mead and Thomas (1973 a) concluíram que a amostragem de carcaças, retirando-se a pele com uma faca, apresentava contagens maiores do que quando os frangos eram mergulhados em solução salina e agitados.

Ayres et al (1950), num estudo sobre os tipos de microrganismos deterioradores de frango refrigerado, acharam contagens maiores pela técnica da retirada da pele do que pela fricção do cotonete de algodão.

Fromm (1959) fez uma pesquisa com o objetivo específico de comparar os cinco métodos já descritos e concluiu que a detecção maior de microrganismos se obteve com a técnica da retirada da pele, seguida pelas técnicas do cotonete de alginate e cotonete de algodão.

Yokoya and Zulzke (1975) compararam as contagens obtidas pelos métodos do cotonete de algodão e da retirada de pele e obtiveram contagens bem maiores pelo uso desta última técnica.

A Figura 2 e o Quadro 1, de Fromm (1959) e Yokoya and Zulzke (1975) respectivamente, mostram as contagens obtidas segundo os métodos usados.

QUADRO 1 - Contagens Microbianas em Carcaças de Frango Obtidas pelas Técnicas do Cotonete de Algodão e da Retirada de Pele (Yokoya and Zulzke, 1975).

Repetição	Cotonete de algodão (Nº/cm <sup>2</sup> x 10 <sup>-6</sup> )	Retirada da pele (Nº/cm <sup>2</sup> x 10 <sup>-6</sup> )
1	3,70	7,30
2	0,48	1,00
3	0,092	0,14
4	0,084	0,13
5	0,17	0,39
6	0,22	0,37
7	3,30	4,30

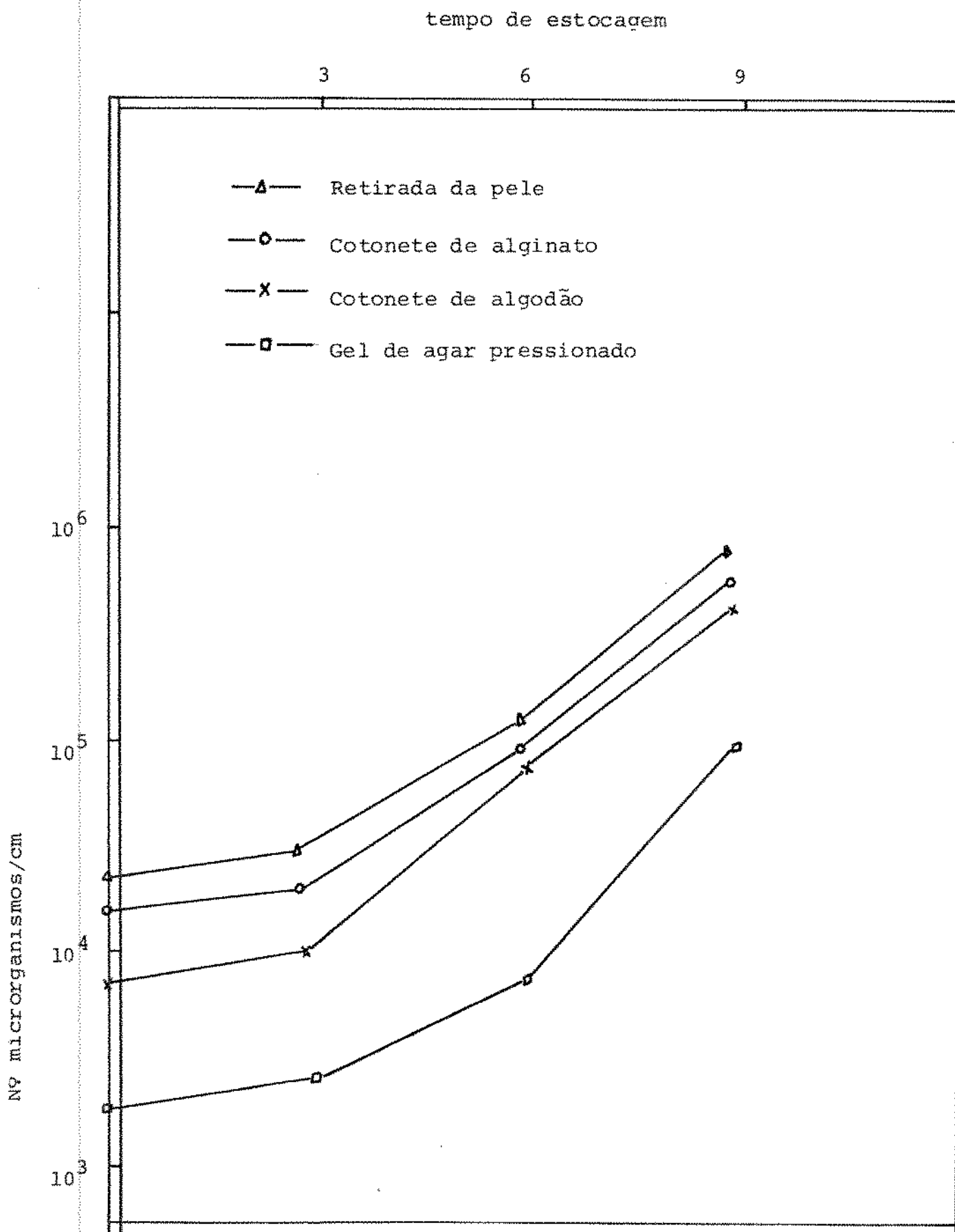


FIGURA 2 - Comparação de diversas técnicas de amostragem de carcaças de frango para contagem microbiana (Fromm, 1959)

#### 4.4. Métodos para avaliar a contaminação microbiológica de frango e a sua vida de prateleira

Para se ter uma idéia da qualidade microbiológica do frango frigorificado tem-se usado como critério principal de avaliação aquele que consiste em cheirar as carcaças, método organoléptico que geralmente exige o trabalho de uma equipe treinada e que somente proporciona duas alternativas de resposta: bom ou estragado. Existe, portanto, uma necessidade de se conhecer a qualidade microbiológica das carcaças a fim de se avaliar a sua vida de prateleira e as condições sanitárias no processamento. Até agora, os métodos propostos podem-se classificar em: a) diretos, como contagem total, contagem de psicrotróficos e meios seletivos; b) indiretos, entre os quais microscopia de esfregaços da pele, redução da resazurina, redução do cloreto de trifenil tetrazólio e fluorescência sob luz ultravioleta.

Mallman et al (1958) desenvolveram um meio seletivo para contagem de psicrotróficos em frango chamado Fitona Nacconol Agar, o qual continha Nacconol NESF como inibidor de bactérias mesófilas Gram-positivo. Eles observaram que as contagens microbianas no seu meio, quando incubado a 20 °C durante 72 horas, apresentavam estreita correlação com aquelas em que as bactérias eram incubadas a 4,5 °C durante 7 dias em Agar Nutriente e, no momento da decomposição, as contagens eram praticamente iguais. Porém, nos primeiros dias de estocagem, a população mi

crobiana em Agar Nutriente foi maior que a do meio seletivo. Neste mesmo trabalho, usou-se o meio seletivo sem agar e adicionado de cloreto de trifenil tetrazólio para avaliar a qualidade microbiológica das carcaças através da redução do composto acima, o que permitia reduzir o tempo de resposta.

Silliker et al (1958) propuseram o uso do meio B de King et al (1954) para a determinação simultânea da contagem total e de *Pseudomonas* fluorescentes. A contagem total se considerou como a totalidade das colônias formadas e as que apresentavam fluorescência sob luz ultravioleta foram enumeradas separadamente. As contagens totais assim obtidas foram comparadas com aquelas obtidas em Agar Glicose Extrato de Levedura, mas não houve uma correlação aceitável.

Brant (1975) fez um resumo dos meios seletivos para psicotróficos usados na avaliação da qualidade microbiológica de carnes, entre as quais frango.

Dentre os métodos indiretos, Walker et al (1959) usaram a redução de resazurina em meio líquido para avaliar a contaminação microbiológica de frango refrigerado. No caso de carcaças frescas, os tempos de redução foram maiores que 8 horas e em frango estragado em volta de 60 minutos.

Wells (1959) encontrou uma relação entre o número de microrganismos na carcaça e o tempo de redução de um meio adicionado de resazurina. A resposta, em frango estragado, se apresentou em cerca de 2 horas.

Uma controvérsia básica existe no teste da resazurina, já que estes dois últimos autores consideram como ponto final da redução deste composto a formação de uma cor vermelha, enquanto que Straka and Stokes (1957) acham que o ponto final deve ser a descoloração completa da suspensão microbiana.

Ziegler et al (1954) descrevem um método qualitativo rápido para determinar a contaminação microbiológica de carcaças. A técnica consiste na observação microscópica de esfregaços, preparados da pele das carcaças. O resultado é considerado negativo (frango aceitável) quando relativamente poucos microorganismos são observados e positivo (frango estragado) quando se apresenta uma alta população microbiana, não tendo portanto pontos intermediários.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Material

- Carcaças de frango evisceradas
- Incubador de temperatura gradiente da Scientific Industries Inc.
- Espectrofotômetro Baush & Lomb, Spectronic 20
- Agitador de frascos New Brunswick
- Geladeira com controlador de temperatura Fanem
- Estufas de incubação Fanem
- Autoclave Luferco, modelo 39.208
- Microscópios Zeiss e Nikon
- Balança analítica Mettler P1200N
- Contador de calorías Erma da Optical Works Ltd.
- Potenciômetro Corning Digital 110
- Placa metálica com furo elíptico de 8,24 cm<sup>2</sup>
- Faca de cozinha
- Pinças
- Meio para contagem total (PCA)
- Meio de infusão de miolo e coração (BHI)



## 5.2. Métodos

### 5.2.1. Amostragem de frango

As carcaças evisceradas foram coletadas num abatedouro das vizinhanças de Campinas que abate cerca de 5.000 aves/hora.

A amostragem consistiu em tomar oito carcaças consecutivamente, após resfriamento e embalagem, colocá-las em caixas de Isopor, envolvendo-as com gelo moído e transportá-las imediatamente ao laboratório para as correspondentes análises.

### 5.2.2. Contagens microbiológicas

Duas carcaças eram separadas para análises microbiológicas logo ao chegarem no laboratório e as outras seis eram estocadas a 4 - 5 °C para contagens microbianas após 48, 96 e 144 horas. Usando a técnica de Yokoya and Zulzke (1975) corta-ram-se cinco pedaços de pele de cada carcaça (área total de 82,4 cm<sup>2</sup>), colocaram-se num frasco Erlenmeyer contendo 100 ml de solução tampão pH 7,2 (Standard Methods for the Examination of Dairy products, 1972) adicionada de 1 ml de Tween 80 e 2 g de areia grossa estéril. Em seguida o material foi agitado durante 15 minutos a 300 rpm no agitador de frascos. Posteriormente prepararam-se diluições decimais, inocularam-se placas Petri com 1 ml de cada diluição e cobriram-se com o meio para contagem total (PCA). Duas placas de cada diluição foram incubadas a 30 °C durante 48 horas e mais duas a 7 °C durante 10 dias para as con-

tagens total e de psicrotróficos, respectivamente.

5.2.3. Parâmetros de crescimento da flora contaminante do frango refrigerado

Tanto nas carcaças analisadas imediatamente após o processamento como nas estocadas a 4 - 5 °C durante 48, 96 e 144 horas, fizeram-se estudos de cinética de crescimento a partir da mesma suspensão microbiana usada para contagens microbiológicas.

Tubos em L pertencentes ao incubador de temperatura gradiente, contendo 9 ml de infusão de miolo e coração (BHI), foram inoculados com 1 ml da suspensão microbiana obtida da maneira mencionada no item 5.2.2., incubados na faixa de 26 a 45 °C em intervalos de 1 a 2 °C e agitação de 70 ciclos/minuto. Leituras de absorvância foram feitas em cada tubo a intervalos de 1/2 a 1 hora até se atingir crescimento estacionário ou leituras suficientes para se calcular os parâmetros de crescimento. Com os logaritmos das absorvâncias e seus tempos correspondentes em cada temperatura de incubação foram construídos gráficos de crescimento microbiano. Da reta média traçada, calculou-se a velocidade de crescimento (k) e da interceptação da reta com o eixo do logaritmo da absorvância foi calculado o valor R, usando a fórmula

$$R = \ln \frac{A_p}{A_o}$$

5.2.4. Determinação do porcentual de psicrotróficos em uma única temperatura

Foram preparadas suspensões microbianas das carcaças, segundo a técnica descrita no Ítem 5.2.2.. As amostras foram colhidas de frango recém processado e também após 144 horas de estocagem a 4 - 5 °C. As suspensões microbianas assim obtidas foram incubadas em BHI às temperaturas de 28 °C e 36 °C até atingir-se a fase estacionária, ocasião em que, colheu-se uma aliquota e fez-se plaqueamento para determinação das contagens microbianas total e de psicrotróficos.

Nas carcaças amostradas imediatamente após o processamento, os resultados destes ensaios mostraram que a 28 °C, a proporção de psicrotróficos em relação à contagem total, foi ligeiramente inferior.

A 36 °C, contudo, a proporção de psicrotróficos na contagem total foi muito menor, razão pela qual manteve-se a temperatura de 28 °C para os ensaios posteriores.

Nas carcaças amostradas após 144 horas de estocagem a 4 - 5 °C, a proporção de psicrotróficos foi maior que a contagem total quando a temperatura de incubação era 28 °C, porém, a 36 °C essa proporção de psicrotróficos continuou sendo menor.

de incubação.

#### 5.2.5. Padrão de absorvância x número de microrganismos

Visando-se a construir uma curva padrão foi preparada uma suspensão microbiana (item 5.2.2.) a partir de frango coletado imediatamente após processado. Inoculou-se um tubo em L contendo 9 ml de BHI com 1 ml da suspensão microbiana, incubou-se à temperatura de trabalho selecionada e agitação de 70 ciclos por minuto no incubador de temperatura gradiente até se atingir uma absorvância de 0,6 unidades. A partir deste parâmetro, prepararam-se suspensões microbianas com 0,5; 0,4 e 0,3 unidades de absorvância pela adição de BHI, prepararam-se diluições para cada absorvância, inoculou-se 1 ml de cada diluição em placa de Petri e cubriram-se com PCA fundido e resfriado a  $\pm 45^{\circ}\text{C}$ . Duplicatas foram incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas e  $7^{\circ}\text{C}$  durante 10 dias para contagem total e de psicrotróficos respectivamente. Com os números de microrganismos achados para cada absorvância, construiu-se uma curva padrão de absorvância x número de microrganismos.

#### 5.2.6. Isolamento e caracterização dos psicrotróficos contaminantes da Carcaça

Pela técnica mostrada no item 5.2.2. foram preparadas separadamente, suspensões microbianas das carcaças estudadas imediatamente após o processamento, e daquelas estocadas a  $4 - 5^{\circ}\text{C}$  durante 7 dias (tempo suficiente para ocorrer a decompo

posição). Prepararam-se, em seguida, diluições decimais, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição em placas com PCA solidificado, fêz-se espalhamento com alça de Drigawski e incubaram-se as placas em duplicata a 7°C durante 10 dias.

Com as mesmas suspensões microbianas inocularam-se tubos em L contendo 9 ml de BHI, colocaram-se a 28 °C no incubador de temperatura gradiente e quando a absorbância atingiu 0,7 a 1,0 unidade foi pipetado 1 ml de suspensão, prepararam-se diluições decimais, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição sobre placas com PCA solidificado. Fêz-se espalhamento com alça de Drigawski e incubou-se em duplicada a 7 °C durante 10 dias.

Das placas com um máximo de 30 colônias, seja das isoladas da pele de frango, seja do incubador, foram tiradas algumas ao acaso e purificadas por esgotamentos sucessivos em placas com PCA solidificado. Após esse procedimento, cada cultura foi repicada em tubos com PCA inclinado, numeradas progressivamente e estocadas a 5 - 7 °C. Repicagens foram feitas cada 15-20 dias para se conservar as culturas.

A identificação foi feita com base na classificação bacteriológica do Begey's Manual (Buchanan et al, 1974) e complementado com o sistema de classificação específica para *Pseudomonas-Achromobacter* de Thornley (1960).

Os testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos aplicados foram os seguintes:

- Forma e coloração Gram

Seguindo a técnica do Manual of Microbiological - Methods (1957) foram preparados esfregaços de cada cultura para se aplicar neles os reagentes para coloração de Gram com posterior observação ao microscópio sob a objetiva de imersão. Forma e disposição das células foram registradas em cada cultura assim - como o tipo de resposta à coloração.

- Motilidade

Culturas com 24 - 48 horas de incubação em BHI foram colocadas com alça numa lâmina limpa e cobertas depois com lamínula. Observou-se no microscópio de contraste de fases para verificar a presença de motilidade.

- Redução de nitrato

O caldo de nitrato foi preparado segundo a fórmula publicada no Manual of Microbiological Methods (1957). Foram inoculados 5 ml de meio com as culturas sob estudo e incubadas a 30 °C durante 5 dias. Testou-se diariamente a presença de nitrito pela adição de 1 ml de ácido sulfanílico (0,8 g ácido sulfanílico em 100 ml ácido acético 5 N) seguido de 1 ml de alfa-naftilamina (0,5 g alfa-naftilamina em 100 ml ácido acético 5 N). O aparecimento de uma cor rosa, vermelha ou marrom indicou produção de nitrito. Quando não houve a produção dessas cores, o nitrato não foi reduzido ou tanto o nitrato como o nitrito foram reduzidos. Para demonstrar qual dos dois eventos aconteceu adicionou-se alguns miligramas de zinco em po à cultura já testada

com os reagentes acima. A formação de cor vermelha indicou a redução de nitrato pelo zinco, portanto a cultura não reduz nitratos. Nenhuma mudança de cor indicou a redução de nitratos e de nitritos.

- Teste de fermentação - oxidação

Tubos contendo o meio base de Hugh and Leifson (1953) adicionado de 1% de glicose, esterilizada em filtro millipore, foram inoculados em duplicata com as culturas em estudo. Um dos tubos foi fechado com uma camada de VASPAR (Vaselina-Para fina 50/50 %) e outro com tampão de algodão. Foram a seguir, incubados a 30 °C durante 15 dias sendo observados diariamente.

Microrganismos fermentadores da glicose produziram reação ácida (alterando o meio de verde para amarelo) nos dois tubos. Organismos oxidadores produziram reação ácida somente no tubo aberto.

- Reação da oxidase

Pedaços de papel filtro Whatman nº1, de aproxima-damente 6 cm<sup>2</sup>, foram colocados numa placa Petri, transferindo-se para cada papel uma alçada de cada cultura previamente incubada durante 24 - 48 horas em PCA a 30 °C. Foram adicionadas uma a duas gotas de solução aquosa de dicloridrato de tetrametil para fenilendiamina 1% (Kovac's, 1956). Tendo a cultura se tornado azul-púrpura em 5 - 10 segundos a reação foi considerada positiva.

- Teste da arginina dihidrolase

Tubos contendo 3 ml do meio 2A de Thornley (1960)

foram inoculados por picada com cada cultura e fechados com VASPAR. A presença da enzima arginina dihidrolase foi conferida com meios sem arginina e inoculado com o mesmo microrganismo. O aparecimento de cor púrpura no tubo com arginina e a ausência dessa cor no tubo desprovido do aminoácido testado indicaram a presença de dihidrolase no microrganismo.

- Coloração de flagelos

O método de Rhodes (1958) foi usado nas culturas que apresentaram motilidade positiva. Lâminas novas foram mergulhadas em solução sulfocrômica durante 2 - 3 dias. Depois lavadas com água destilada, álcool etílico 95% e secadas em estufa a 55 °C. Antes do teste, foram colocadas numa placa quente durante cerca de uma hora e, já frias, guardadas em frascos fechados. Culturas com 24 - 48 horas de incubação em tubos com PCA inclinados foram adicionadas de 2 - 3 ml de água estéril para preparar uma suspensão microbiana da qual transferiu-se uma ou duas gotas para um extremo da lâmina. Esta inclinou-se suavemente para a gota escorregar até o outro extremo e deixou-se secar à temperatura ambiente. Pingou-se 1 ml de mordente de tanato férrico sobre a lâmina e deixou-se atuar durante 3 - 5 minutos, lavou-se com água destilada e pingou-se mais 1 ml da solução fixadora de nitrato de prata amoniacal, atuando durante 3 - 5 minutos. Lavou-se e secou-se em estufa a 55 °C. A presença, número e disposição de flagelos foi conferida no microscópio, usando-se objeti



va de imersão.

- Resistência a antibióticos

Discos de papel impregnados com antibiótico (Multidisk Oxoid) foram usados para testar resistência microbiana a penicilina, tetraciclina, cloramfenicol, ampicilina, oxaciclina e cefaloridina.

Placas de Petri com PCA solidificado foram inoculadas com 0,1 ml de cada suspensão microbiana preparada com cada cultura previamente inoculada em BHI e incubada a 30 °C durante 24 horas. Fêz-se o espalhamento com alça de Drigawski e colocou-se um multidisco com os antibióticos incubando a 30 °C durante 24 - 48 horas. A resistência ao antibiótico foi considerada positiva quando o crescimento microbiano se apresentou em volta do disco e negativa quando apareceu uma circunferência clara ao redor do disco.

- Teste de fluorescência

Para se determinar a produção de fluorescências nas culturas isoladas, foi usado meio B de King et al (1954). Foram inoculadas as culturas sobre o meio solidificado e incubadas a 30 °C durante 24 - 48 horas. A produção de fluorescência foi determinada por exposição das placas à luz ultravioleta.

5.2.7. Avaliação da população microbiana de carcaças de frango pelo método proposto

As populações total e de psicrotróficos nas carca

ças após 0, 48, 96 e 144 horas de estocagem, foram avaliadas usando a metodologia descrita a seguir:

- A partir dos resultados das contagens total e de psicrotróficos obtidas no laboratório calcularam-se as absorvâncias correspondentes (Aop) com base nos gráficos padrões inseridos no capítulo seguinte.

- Com as absorvâncias calculadas e com aquelas obtidas através do prolongamento da tangente da curva de crescimento até tempo zero (Ap), à temperatura de 28 °C, foram calculados os valores R<sub>1</sub> segundo a fórmula  $R_1 = \ln \frac{A_p}{A_{op}}$ . Com os resultados obtidos nos diversos experimentos calculou-se o valor médio de R<sub>1</sub>.

- Com os valores das velocidades de crescimento a 28 °C, obtidos dos gráficos de logaritmo de absorvância x tempo de incubação, calculou-se o valor médio de k.

- Com as equações de crescimento microbiano e do fator R, foi desenvolvida uma relação matemática para se avaliar a contaminação microbiológica inicial das carcaças, valendo-se dos valores médios de k e R<sub>1</sub> assim como de dados do crescimento da flora microbiana do frango incubada a 28 °C.

Equação A (Crescimento microbiano):

$$\ln \frac{A_1^*}{A_p} = kt$$

(\*) A<sub>1</sub> é a absorvância num tempo t qualquer, porém dentro da fase exponencial de crescimento.

Equação B (Fator R):

$$R_1 = \ln \frac{A_p}{A_{op}}$$

Substituindo-se  $\ln A_p$  de B por  $\ln A_p$  de A tem-se:

$$\ln A_1 - \ln A_p = kt$$

$$\ln A_1 - R_1 - \ln A_{op} = kt$$

$\ln A_{op} = \ln A_1 - R_1 - kt$ , que chamaremos de equação C.

- Com o valor de  $A_{op}$ , calculado usando a equação C, pode-se então avaliar a contaminação microbiológica da carcaça com base nos gráficos padrões.

#### 5.2.8. Energia de ativação de culturas puras de psicrotróficos

Culturas puras isoladas segundo o método descrito no item 5.2.2. foram transferidas para meio BHI e incubadas a 12 °C por 10 horas. A partir da suspensão microbiana de cada cultura, inocularam-se tubos em L contendo meio BHI e incubaram-se a diversas temperaturas na faixa de 10,5 ° a 34 °C. As leituras de absorvância foram registradas de 30 em 30 minutos em cada temperatura de incubação e com os dados obtidos construíram-se gráficos de logarítmo absorvância x tempo. Das curvas traçadas cal

cularam-se as velocidades de crescimento em cada temperatura de incubação estudada.

Os gráficos de Arrhenius (logarítmo  $k \times 1/$  temperatura absoluta) foram construídos para cada cultura e da curva traçada calculou-se a energia de ativação através da equação (Farrell and Rose, 1965):

$$E = kR$$

onde:

E = Energia de ativação em kcal/mol

k = Declive da curva no gráfico de Arrhenius ( $^{\circ}\text{K}$ )

R = Constante Universal dos Gases (1,98 kcal/mol  $^{\circ}\text{K}$ )

## 6. RESULTADOS

Neste capítulo apresentam-se os resultados dos diferentes experimentos que foram realizados no laboratório valendo-se dos materiais e métodos expostos no capítulo anterior e dos cálculos matemáticos realizados a partir dos mesmos experimentos.

### 6.1. Contagens microbianas

No Quadro 2 apresentam-se as contagens total e de psicrotróficos obtidas em carcaças de frango analisadas após 0, 48, 96 e 144 horas de estocagem a 4 - 5 °C. Mostra-se também a proporção de psicrotróficos na população microbiana total em cada caso.

### 6.2. Parâmetros de crescimento microbiano

A Figura 3 mostra um gráfico de cinética de crescimento da flora mista de frango incubada a temperatura constante, como um exemplo dos construídos para cada temperatura de incubação de cada amostra de frango tirada após 0, 48, 96 e 144 horas de estocagem frigorificada.

Os Quadros 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mostram os valores obtidos graficamente para os parâmetros  $k$  ( $hr^{-1}$ ) e  $R$  em cada tempe

ratura de incubação a que foi submetida a flora microbiana da a mostra retirada do frango após 0, 48, 96 e 144 horas de estocagem a 4 - 5 °C.

O Quadro 9 mostra os tempos de duplicação, em ho ras, da flora microbiana do frango frigorificado.

### 6.3. Porcentagem de psicrotróficos na flora microbiana do frango

O Quadro 10 apresenta as contagens total e de psi crotróficos, obtidas durante a fase exponencial de crescimento , a 28 e 36 °C, da flora microbiana das carcaças, no início e fi nal da estocagem frigorificada.

O Quadro 11 apresenta os resultados das contagens de microrganismos total e de psicrotróficos em carcaças imediata mente após o processamento. Mostra, também, estas contagens quando a suspensão microbiana das carcaças no início da estoca - gem, foi incubada a 28 °C até atingir uma absorbância de 0,6 a 0,9 unidades.

### 6.4. Identificação de psicrotróficos na flora microbiana de fran

go

Os resultados dos testes aplicados nas culturas isoladas das carcaças, no início e final da estocagem frigorifi- cada, estão nos Quadros 12 e 13. Os Quadros 14 e 15 mostram os resultados obtidos através de testes idênticos realizados com culturas isoladas durante a fase exponencial de crescimento a

28 °C, das suspensões microbianas obtidas de carcaças no início e final da estocagem.

#### 6.5. Padrão de absorbância X número de microrganismos

As Figuras 4 e 5 mostram as curvas padrões obtidas através da representação gráfica dos valores de absorbância e das correspondentes contagens de microrganismos total e de psicrótróficos. Essas contagens e suas respectivas Absorbâncias estão no Quadro 16.

#### 6.6. Parâmetros de crescimento de culturas puras

Nas Figuras 6 e 7 mostram-se os valores das velocidades de crescimento e dos fatores R para várias culturas puras de psicrótróficos, calculados a partir das curvas construídas com os dados de absorbância e tempo de incubação a 28 °C.

#### 6.7. Avaliação da contaminação microbiológica das carcaças analisadas

Os Quadros 17, 18, 19 e 20 contêm a comparação dos resultados obtidos na avaliação das contagens totais das carcaças, segundo o método descrito no item 5.2.7., com aqueles encontrados por plaqueamento.

Nos Quadros 21, 22, 23 e 24 são comparadas as contagens de psicrótróficos obtidas em laboratório, com as avalia -

das pelo método proposto.

O Quadro 25 mostra a correlação entre os valores das contagens de microrganismos totais e de psicrotróficos calculados através do método proposto e aqueles obtidos pela contagem padrão em placa.

#### 6.8. Energia de ativação de culturas puras de psicrotróficos

No Quadro 26 mostram-se as velocidades de crescimento obtidas para as quatro culturas estudadas.

A Figura 8 apresenta as curvas obtidas quando se construíram os gráficos de Arrhenius em cada uma das culturas analisadas.



## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Contaminação microbiológica das carcaças

O Diário Oficial do Estado de São Paulo publicado em 21 de Outubro de 1978 (página 4), estabelece como máxima permitível uma contagem microbiana de  $3 \times 10^4$ /g para carne de frango crua. Segundo Mead (1974) 1 g de pele de frango equivale a  $10 \text{ cm}^2$ , portanto o padrão acima ficaria  $3 \times 10^3$  microrganismos /  $\text{cm}^2$ .

As amostras de frango coletadas imediatamente após processadas tiveram contagens totais (Quadros 2 e 11) de  $1,2 \times 10^4$  até  $2,9 \times 10^5$  e, portanto, fora do padrão oficial.

Camargo Neves (1978) obteve contagens totais na faixa de  $3,6 \times 10^3/\text{cm}^2$  até  $2,4 \times 10^4/\text{cm}^2$  num estudo sobre o efeito de alguns parâmetros de resfriamento na qualidade microbiológica de frango processado na região de Campinas.

As contagens totais por nós obtidas não diferem muito daquelas achadas em outros países. Barnes and Impey (1975) registraram contagens de  $9,7 \times 10^3/\text{cm}^2$ , e Mead and Thomas (1973a) contagens totais de  $5,4 \times 10^2/\text{cm}^2$  até  $5,3 \times 10^5/\text{cm}^2$ . Patterson and Gibbs (1975) fazendo análises periódicas em abatedouros da Irlanda do Norte concluíram que contaminações a nível de  $1,6 \times 10^4/\text{cm}^2$  são normalmente encontradas nos frigoríficos. Para eles, contagens acima de  $10^5/\text{cm}^2$  indicam a necessidade de uma pesquisa

nas condições de operação a fim de corrigir possíveis deficiências.

O objetivo básico dos padrões microbiológicos oficiais é proteger o consumidor contra os riscos de doenças que poderá contrair pela ingestão de alimentos contaminados com microrganismos nocivos à saúde. Esses padrões evidenciam quase que exclusivamente a presença de microrganismos patogênicos e de indicadores de condições higiênicas deficientes no processo e/ou no alimento, porém os psicrotróficos deterioradores não patogênicos não se consideram, pelo menos em frango. Não entanto, Ayres (1963) encontrou que até a época em que fez sua revisão bibliográfica não havia um padrão oficial para psicrotróficos em carnes frigorificadas. Como nesses produtos são crescem psicrotróficos nas condições normais de armazenamento\*, ele propôs um limite máximo para estes microrganismos em carnes moídas, variando de  $10^5$ /g para a venda do produto em atacado e  $10^6$ /g no varejo.

Silliker (1963) opinou na mesma época que, a contagem total microbiana proporciona uma informação útil sobre a qualidade microbiológica de alimentos perecíveis, deteriorados por microrganismos não patogênicos na maioria dos casos, mas como se sabe esta técnica não permite concluir sobre a possibilidade do alimento ser nocivo à saúde.

Os autores já mencionados, Patterson and Gibbs (1975), proporcionam limites microbiológicos para frango eviscerado frigorificado, porém só consideram contagem total, alguns

(\*). O termo armazenamento usa-se no sentido de estocagem de produtos

microrganismos patogênicos e indicadores de condições sanitárias.

Ayres et al (1950) observaram que a magnitude da contagem total de microrganismos na carcaça influencia a sua vida de prateleira. Carcaças com contagens por volta de  $10^4/\text{cm}^2$ , tiveram vidas de prateleira de 3 e 5 dias quando estocadas às temperaturas de 10 e  $4,4^\circ\text{C}$  respectivamente. Enquanto que contagens iniciais por volta de  $5,0 \times 10^6/\text{cm}^2$  mostraram vidas de prateleira menores do que 2 dias quando estocadas nas mesmas temperaturas.

Barnes (1976) menciona que entre os fatores que influenciam a vida de prateleira das carcaças estão o número e tipos de microrganismos psicrotróficos presentes imediatamente após o processamento.

Barnes and Impey (1968) inocularam carne moída do peito e coxa de frango com microrganismos psicrotróficos (40% *Pseudomonas* + 60% *Acinetobacter*) até se obter uma contaminação de  $10^5/\text{g}$ . As amostras foram armazenadas a  $1^\circ\text{C}$  e apresentaram odores desagradáveis após aproximadamente 6 dias para a carne da coxa e 8 dias para a carne do peito.

Clark (1968) inoculou pele retirada de frango, lavada com detergente e enxaguada com água estéril, com microrganismos psicrotróficos (*Pseudomonas-Achromobacter*) em proporções iguais, até atingir uma contagem de  $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ . As amostras de pele foram armazenadas a  $1^\circ\text{C}$  e a deterioração ocorreu em aproximadamente 8 dias.

Esses trabalhos destacam que a presença de psicotróficos nas carcaças imediatamente após o processamento influencia a vida de prateleira.

Entretanto, não se detectou nas pesquisas relacionadas neste trabalho, relação contrastante entre vida de prateleira e concentração de psicotróficos, talvez porque não se obteve casos com contagens iniciais de psicotróficos suficientemente elevadas para se observar tais diferenças; já que as contagens obtidas foram de  $2,7 \times 10^3/\text{cm}^2$  até  $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$  e o aparecimento de odores desagradáveis ocorreu após 7 dias.

## 7.2. Parâmetros de crescimento da flora microbiana do frango armazenado sob refrigeração

Os valores das velocidades de crescimento obtidos para a flora microbiana de frango incubada às diversas temperaturas estudadas, foram em geral, mais altos quanto maior a temperatura de incubação sendo que a velocidade máxima foi a correspondente às temperaturas de 39,5 °C ou 41,5 °C. Isto se deve aos microrganismos mesófilos sobreviventes nas baixas temperaturas de estocagem das carcaças ou aos poucos psicrotróficos que podem crescer nestas temperaturas.

Ingraham (1958) relata velocidades de crescimento da ordem de 1,50 hr<sup>-1</sup> para *Pseudomonas Aeruginosa* e de 1,90 hr<sup>-1</sup> para *E. coli* quando incubados a 42 °C. Isto apoia a constatação da presença maciça de psicrotróficos após 144 horas de estocagem frigorificada, quando as velocidades de crescimento atingiram valores máximos por volta de 1,5 hr<sup>-1</sup> a 41,5 °C (Quadros 5, 6 e 9).

Os tempos de duplicação da flora psicrotrófica do frango estocado a 4 - 5 °C (Quadro 9) oscilaram desde 11,7 horas até 14,3 horas. Ingraham (1958) achou tempos de geração de 7 a 10 horas para culturas puras de psicrotróficos incubadas a 4 °C. Wells (1961) determinou tempos de geração de 7,6 horas até 24,4 horas, com uma média de 14,7 horas, em culturas puras de psicrotróficos de frango incubadas a 4 °C. Elliott and Michener (1965) informaram tempos de geração da ordem de 12 horas em culturas de *Pseudomonas* e *Achromobacter* incubadas a 4 °C, os quais são apro-

ximadamente iguais aos constatados por Dawson et al (1963) em bactérias psicotróficas de frango.

Todos estes dados conferem com aqueles achados no presente trabalho para a flora mista de frango armazenado a 4 - 5 °C (Quadro 9).

Com respeito aos valores R, calculados a partir das Absorbâncias  $A_0$ , lidas no espectrofotômetro, e  $A_p$ , calculada através do prolongamento da tangente da curva de crescimento exponencial até tempo zero; observa-se que esses valores aumentam com o incremento da temperatura de incubação para um mesmo tempo de estocagem das carcaças e diminuem com o tempo de estocagem para uma mesma temperatura de incubação (Quadros 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

O parâmetro R, quando calculado para uma temperatura de incubação de 28 °C, proporciona uma idéia do tempo de estocagem do produto e da proporção de psicotróficos, visto que o seu valor nunca foi menor que |7,0| no início da estocagem, diminuindo gradativamente com o tempo da armazenagem e o aumento de psicotróficos, até valores por volta de |3,0 a 5,0| após 96 horas de estocagem e valores de aproximadamente |2,0| às 144 horas.

Por outro lado, em 4 culturas de psicotróficos isoladas de frango deteriorado, os valores R determinados a 28 °C tiveram valores de |0,4 a 1,28| sendo que 3 delas mostraram valores por volta de |1,20| (Figura 6 e 7).

### 7.3. Porcentagens de psicrotróficos na flora microbiana de frango incubada a diversas temperaturas

A proporção de psicrotróficos na contagem total microbiana das carcaças imediatamente após processadas, teve valores de 6% até 63% com uma média de 25,3% (Quadros 2 e 11).

Durante o armazenamento refrigerado das carcaças, observou-se que os psicrotróficos aumentavam gradativamente até se tornarem predominantes. Como pode-se observar no Quadro 2, após 48 horas de armazenamento, a proporção de psicrotróficos teve um valor médio de 78,2% e predominaram totalmente após 96 horas e 144 horas.

Quando amostras da flora microbiana do frango coletado imediatamente após o processamento foram incubadas a 28°C, a porcentagem de psicrotróficos encontrada durante a fase exponencial de crescimento, determinada para uma Absorbância de aproximadamente 0,7, teve valores de 24% até 88% com uma média de 57% (Quadro 11) e esta proporção atingiu um valor de 94% quando os valores da absorbância foram por volta de 1,2 (Quadro 10). A proporção de psicrotróficos foi praticamente igual à contagem total quando a flora microbiana incubada a 28 °C até crescimento exponencial, foi tirada de carcaças com 144 horas de armazenamento (Quadro 10).

Por outro lado, incubando-se a 36 °C a flora microbiana do frango imediatamente após processado, a proporção de psicrotróficos atingiu um valor de somente 31% dando porém valo

res de absorvância de 1,2 e, com amostras de frango após 144 ho-  
ras de estocagem, os psicrotróficos não predominaram no final da  
fase exponencial de crescimento, tal como pode ser observado no  
Quadro 10.

A decisão de se usar 28 °C como temperatura de in-  
cubação para cálculo dos parâmetros k e R a fim de se obter a es-  
timativa da população microbiana inicial através do método pro-  
posto (Item 5.2.7.), fundamentou-se no fato da proporção de psi-  
crotróficos ser quase igual à contagem total quando a suspensão-  
microbiana retirada das carcaças cresceu até o final da fase ex-  
ponencial.



#### 7.4. Gêneros microbianos contaminantes no frango refrigerado

Os psicotróficos isolados das carcaças no início da estocagem refrigerada foram todos bastonetes ou cocobacilos Gram-negativo. A identificação das culturas através dos resultados dos testes mostra que só uma das 15 pertence ao gênero *Pseudomonas* visto que apresentou fluorescência, foi arginina dehidrolase positiva, oxidase positiva e motilidade (cultura 10 do Quadro 12).

Pertencentes ao gênero *Moraxella* são as culturas 1, 2, 7, 8 e 15 (Quadro 12) já que não apresentam motilidade, são oxidase positiva e sensíveis a penicilina.

Como *Acinetobacter* classificam-se as culturas 3, 4, 6, 9, 11, 12 e 14 (Quadro 12) devido a que não possuem motilidade, são arginina negativa, oxidase negativa e resistentes a penicilina.

A cultura 5 pertence ao gênero *Flavobacterium* visto a produção de pigmento amarelo principalmente. A cultura 13 foi classificada como gênero semelhante a *Moraxella* porque segundo o Bergey's Manual são microrganismos que compartilham caracteres comuns a *Moraxella* (oxidase positiva) e *Acinetobacter* (resistentes a penicilina) e são principalmente encontrados em carnes de aves e peixes refrigerados.

No final da estocagem refrigerada, a totalidade das culturas isoladas pertencem ao gênero *Pseudomonas* (Quadro 13). As culturas 5, 12, 13 e 14 apresentam fluorescência e as

demais são *Pseudomonas* não fluorescentes.

Das 16 culturas isoladas durante a fase exponencial de crescimento, no incubador a 28 °C, da suspensão de microrganismos no início da armazenagem do frango, 15 pertencem ao gênero *Acinetobacter* e a cultura 16 do Quadro 14 apresentou todas as características de *Acinetobacter* exceto a resistência a penicilina.

Da suspensão microbiana amostrada das carcaças no final da estocagem e incubada a 28 °C, foram isoladas 15 culturas na fase exponencial de crescimento desta suspensão. As denominadas com os números 1, 4, 5, 8, 12 e 13 (Quadro 15) pertencem ao gênero *Acinetobacter*, as culturas 2, 6, 7 e 10 do mesmo Quadro 15 são *Pseudomonas* fluorescentes, as 11 e 14 são *Pseudomonas* não fluorescentes. As culturas 3 e 9 (Quadro 15) são do gênero *Aeromonas* visto que as suas características principais são a fermentação de glicose, arginina dehidrolase negativa e oxidação negativa. A cultura 15 apresentou todas as características de *Acinetobacter* exceto a resistência a penicilina.

De acordo com a literatura, da flora psicrotrófica presente no início da estocagem frigorificada de frango, acima de 50% são *Acinetobacter* e *Moraxella*, 10 a 28% *Pseudomonas* e as demais são *Flavobacterium*, fungos, leveduras e outros (Barnes, 1976; Barnes and Impey, 1968; Clark and Lentz, 1969).

No final da estocagem frigorificada do frango, os psicrotróficos predominantes são *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (Ay

res et al, 1950; Nagel et al, 1960; Barnes and Impey, 1968). As porcentagens de *Pseudomonas* na flora psicrotrófica do frango deteriorado vão desde 70% (Barnes, 1976), 89% (Nagel et al, 1960 ) até 90% (Barnes and Thomley, 1966).

O fato de no presente trabalho ter-se isolado somente *Pseudomonas* no final da estocagem frigorificada do frango (Quadro 13), não significa a ausência de *Acinetobacter* ou outros gêneros, já que da suspensão microbiana amostrada das carcaças deterioradas e incubadas a 28 °C, foram isoladas culturas de *Acinetobacter* e *Aeromonas*.

### 7.5. Avaliação das populações microbianas total e de psicrotrófi- cos pelo método proposto

As contagens microbianas totais determinadas por plaqueamento das amostras de frango no tempo zero da estocagem, tiveram valores ( $\log N^{\circ}$  de microrganismos/cm<sup>2</sup>) de 4,079 até 5,477. Para essas mesmas amostras as contagens totais avaliadas pelo método descrito no presente trabalho, tiveram valores de 4,230 até 5,041 (Quadros 17 e 25). O coeficiente de correlação calculado pelo método dos quadrados mínimos (Hewlett-Packard Co, 1975) para comparar os resultados avaliados pelo método proposto com aqueles obtidos no laboratório, teve um valor de 0,95.

Quando se aplicou o método proposto na avaliação das contagens de microrganismos totais em carcaças com 48 horas de estocagem, os valores obtidos ( $\log N^{\circ}$ /cm<sup>2</sup>) foram de 4,959 até 5,886 contra 4,792 e 5,799 do método de contagem padrão (Quadros 8 e 25). O coeficiente de correlação neste caso foi de 0,91.

Para frango com 96 horas de estocagem, os valores da contagem de microrganismos totais obtidos no plaqueamento ( $\log N^{\circ}$ /cm<sup>2</sup>) foram de 5,708 até 6,699 enquanto que os obtidos pelo método descrito no item 5.2.7. foram de 5,716 até 6,763 (Quadros 19 e 25). O coeficiente de correlação entre os valores obtidos pelos dois métodos foi de 0,87.

Já para os valores obtidos por ambos métodos, nas contagens de microrganismos totais em carcaças com 144 horas de estocagem, o coeficiente de correlação foi 0,64 (Quadro 25). Es

sa baixa correlação se deve, possivelmente, à presença de proporção elevada de psicotróficos na amostra que interfere na curva de crescimento a 28 °C.

Quando se compararam as contagens de microrganismos psicotróficos nas carcaças ao início da estocagem, observou-se que os valores obtidos ( $\log N_9/\text{cm}^2$ ) pelo plaqueamento foram de 3,431 até 4,398 enquanto que os calculados usando o método proposto, foram de 3,716 até 4,518 (Quadros 21 e 25). A comparação dos valores obtidos entre os dois métodos, mostrou um coeficiente de correlação de 0,94.

No frango com 48 horas de estocagem, as contagens de microrganismos psicotróficos ( $\log N_9/\text{cm}^2$ ) obtidas no laboratório, oscilaram de 4,716 até 5,431 e as avaliadas pelo método proposto foram de 4,813 até 5,690 (Quadros 22 e 25). O coeficiente de correlação neste caso teve um valor de 0,83.

Quando as contagens de microrganismos psicotróficos foram feitas por contagem padrão em agar nas carcaças amostradas após 96 horas de estocagem, os valores obtidos ( $\log N_9/\text{cm}^2$ ) foram de 5,792 até 6,785 e as calculadas segundo o método proposto oscilaram de 5,745 até 6,886 (Quadros 23 e 25). A correlação entre os valores calculados e os obtidos no plaqueamento, mostrou um coeficiente de 0,82.

Já para os valores obtidos por ambos métodos, nas contagens de microrganismos psicotróficos em carcaças com 144 horas de estocagem, o coeficiente de correlação foi 0,86 (Quadro 25).

Pode-se concluir pelos coeficientes de correlação calculados, que o método proposto para avaliar contagens de microorganismos totais e de psicrotróficos mostra valores mais correlacionados com aqueles obtidos pelos métodos de plaqueamento quando o frango tem até 48 horas de estocagem.

### 7.6. Energias de ativação de culturas de psicrotróficos

As energias de ativação obtidas nas diversas culturas de psicrotróficos mostraram valores de 6.000 kcal/mol para *Flavobacterium* (cultura 5, Quadro 12), 12.200 e 13.400 kcal/mol, para *Acinetobacter* (culturas 15 e 11, Quadro 14) e 13.600 kcal/mol para *Pseudomonas* (cultura 10, Quadro 12).

Ingraham (1958) encontrou valores de 8.700, 9.000 para os declives (coeficientes de temperatura) das curvas no gráfico de Arrhenius para três psicrotróficos estudados.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram valores de coeficientes de temperatura de 3030, 6060, 6760 e 6860 respectivamente às culturas acima citadas.

Apesar da cultura de *Flavobacterium* apresentar a menor das energias de ativação dos microrganismos estudados, não é detectada em frango deteriorado, talvez por apresentar períodos lag maiores que os de *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. No presente trabalho observou-se que estes últimos microrganismos apresentaram períodos lag por volta de 5 horas à temperatura de incubação de 13,5 °C, enquanto que *Flavobacterium* necessitou um período de 11 horas à mesma temperatura.

## 8. CONCLUSÕES

- As contagens microbianas totais obtidas nas diversas amostras de frango coletadas imediatamente após o processamento, conferem com aquelas da literatura consultada.

- A proporção de psicrotróficos na população microbiana total nas carcaças coletadas logo após o processamento, teve um valor mínimo de 6% e um máximo de 63%, com a maioria dos valores por volta de 25,0% a 30,0%.

- O número de microrganismos psicrotróficos aumentou com a estocagem frigorificada das carcaças até se tornarem predominantes após 96 ou 144 horas de estocagem.

- Os microrganismos psicrotróficos predominantes nas carcaças ao início da estocagem pertenciam aos gêneros *Acinetobacter* e *Moraxella* com muito pouco de *Pseudomonas*. Estes últimos predominaram no final da estocagem.

- O método proposto para avaliar as contagens total e de psicrotróficos em frango frigorificado, apresentou maior exatidão quando aplicado em carcaças de zero até 48 horas de estocagem a 4 - 5 °C. Em todos os casos o coeficiente de correlação foi superior a 0,8, exceto para carcaças armazenadas a 144 hs e comparadas com contagem total.



EXEMPLO DE CÁLCULO

Mostra-se a seguir a metodologia de cálculo da contagem total microbiana em frango coletado imediatamente após o processamento, utilizando para tal fim os valores médios de  $k$  e  $R_1$ , previamente calculados a partir dos resultados dos diversos experimentos realizados, assim como dados de absorvância e tempo para o caso particular que vai-se resolver.

Dados:

$$k = 0,95 \text{ h}^{-1}$$

$$R_1 = - 1,09978$$

Do gráfico na Figura 3 tira-se o valor de  $\ln A_1$  para um tempo de 10 horas ( $\ln A_1 = - 1,21$ ).

Utilizando a equação  $\ln A_{op} = \ln A_1 - R_1 - Kt$  calcula-se a absorvância inicial teórica correspondente à contagem total inicial na carcaça.

$$\ln A_{op} = - 1,21 + 1,09978 - 9,5$$

$$A_{op} = 0,00006704$$

A partir da curva padrão de mesófilos (Figura 4) calcula-se a concentração microbiana correspondente a Aop e que representa a contagem total, usando a seguinte regra de três:

$$\begin{array}{rcl} 13,3 \times 10^7 \text{ Nq/ml} & \frac{\quad}{\quad} & 0,4 \\ x & \frac{\quad}{\quad} & 0,00006704 \end{array}$$

$$x = 2,2 \times 10^4 / \text{ml}$$

$$x = 2,7 \times 10^4 / \text{cm}^2$$

$$x = \text{contagem total} / \text{cm}^2$$

QUADRO 2 - Contagens microbianas em frango, expressas como número/cm<sup>2</sup>, após 0, 48, 96 e 144 horas de armazenamento a 4 - 5 °C das carcaças.

		Tempo de Armazenamento (horas)													
		0				48				96				144	
Repetição	C	P	P/C	C	P	P/C	C	P	P/C	C	P	P/C	C	P	P/C
1	2,4x10 <sup>4</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	0,16	1,0x10 <sup>5</sup>	5,2x10 <sup>4</sup>	0,52	5,2x10 <sup>5</sup>	6,8x10 <sup>5</sup>	1,31	-	-	-	-	-	-
2	1,8x10 <sup>4</sup>	2,7x10 <sup>3</sup>	0,15	4,4x10 <sup>4</sup>	6,2x10 <sup>4</sup>	1,41	5,1x10 <sup>5</sup>	6,2x10 <sup>5</sup>	1,22	-	-	-	-	-	-
3	2,2x10 <sup>4</sup>	3,9x10 <sup>3</sup>	0,18	1,4x10 <sup>5</sup>	8,9x10 <sup>4</sup>	0,64	4,7x10 <sup>6</sup>	4,2x10 <sup>6</sup>	0,89	1,9x10 <sup>7</sup>	3,1x10 <sup>7</sup>	1,63	1,6x10 <sup>7</sup>	1,23	1,05
4	2,9x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	0,06	6,3x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>5</sup>	0,35	1,1x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	1,00	1,3x10 <sup>7</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>	1,23	9,6x10 <sup>7</sup>	1,05	1,44
5	9,1x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	0,27	3,5x10 <sup>5</sup>	2,7x10 <sup>5</sup>	0,77	5,0x10 <sup>6</sup>	6,1x10 <sup>6</sup>	1,22	9,1x10 <sup>7</sup>	9,6x10 <sup>7</sup>	1,05	2,3x10 <sup>7</sup>	1,44	-
6	1,2x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>3</sup>	0,35	1,8x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>5</sup>	1,00	3,8x10 <sup>6</sup>	2,9x10 <sup>6</sup>	0,76	1,6x10 <sup>7</sup>	2,3x10 <sup>7</sup>	1,44	-	-	-

C - Contagem de microorganismos totais em placa de método padrão agar incubando a 30 °C por 48 horas

P - Contagem de microorganismos psicrotróficos em placa de método padrão agar incubando a 7 °C por 10 dias

P/C - Relação entre as contagens de microorganismos psicrotróficos e microorganismos totais

QUADRO 3 - Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4 - 5 °C, incubada a diversas temperaturas em infusões de miolo e coração (BHI) la. repetição.

Temperatura de incubação em BHI (°C)	Tempo de armazenamento (horas)					
	0	48	96	- R*	K (hr <sup>-1</sup> )	- R
26,5	-	0,84	0,84	7,25	0,84	4,58
28,0	0,96	0,89	0,94	6,78	0,94	5,20
30,5	1,31	1,01	1,09	6,40	1,09	5,45
32,0	1,19	1,34	1,48	8,88	1,48	7,32
34,0	1,60	1,37	1,67	6,98	1,67	7,58
36,0	1,69	1,65	1,86	8,72	1,86	8,21
38,0	1,72	1,97	1,80	9,77	1,80	7,47
39,5	1,77	1,89	1,92	9,65	1,92	8,56
41,5	1,95	2,03	1,98	10,19	1,98	9,75
43,0	1,47	1,96	1,58	10,36	1,58	8,93

(\*) K e R definidos conforme capítulo 5

QUADRO 4 - Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4 - 5 °C, incubada a diversas temperaturas em infusões de miolo e coração (BHI) 2a. repetição.

Temperatura de incubação em BHI (°C)	Tempo de armazenamento (horas)					
	0	48	96	0	48	96
	K (hr <sup>-1</sup> )*	- R*	K (hr <sup>-1</sup> )	- R	K (hr <sup>-1</sup> )	- R
26,5	0,82	9,67	0,85	8,11	0,85	4,53
28,0	0,95	9,92	0,95	6,95	0,94	5,25
30,5	1,25	10,43	1,19	7,11	1,06	5,49
32,0	1,00	7,00	1,31	8,22	1,23	5,96
34,0	1,51	10,47	1,24	6,21	1,36	6,18
36,0	1,59	10,65	1,54	7,25	1,47	6,54
38,0	1,71	10,52	2,14	11,64	1,55	7,11
39,5	1,81	10,91	1,85	9,22	1,58	7,63
41,5	1,95	12,00	1,76	9,22	1,63	8,38
43,0	1,55	10,32	1,61	10,23	1,44	8,83

(\*) K e R definidos conforme capítulo 5

QUADRO 5 - Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4-5 °C, incubada a diversas temperaturas em infusão de miolo e coração (BHI) 3a. re<sub>p</sub>etição.

Temperatura de incubação em BHI (°C)	Tempo de armazenamento (horas)														
	0	48	96	144	0	48	96	144	0	48	96	144			
K (hr <sup>-1</sup> )*	- R*	μ (hr <sup>-1</sup> )	- R	k (hr <sup>-1</sup> )	- R	k (hr <sup>-1</sup> )	- R	K (hr <sup>-1</sup> )	- R	K (hr <sup>-1</sup> )	- R	- R			
26,5	0,73	6,87	0,83	6,95	0,82	3,09	0,83	2,12	0,81	7,35	0,93	7,01	3,18	0,84	2,12
28,0	0,81	7,35	0,93	7,01	0,82	3,18	0,84	2,12	0,99	7,61	0,98	6,21	3,32	0,92	2,22
30,5	0,99	7,61	0,98	6,21	0,92	3,32	0,92	2,22	0,98	6,99	1,13	7,01	3,29	0,96	2,41
32,0	0,98	6,99	1,13	7,01	0,99	3,29	0,96	2,41	1,24	6,75	1,21	7,03	3,59	1,17	3,31
34,0	1,24	6,75	1,21	7,03	1,07	3,59	1,17	3,31	1,71	8,60	1,37	8,08	3,76	-	-
36,0	1,71	8,60	1,37	8,08	1,11	3,76	-	-	1,60	9,26	2,06	8,84	5,78	1,34	4,58
38,0	1,60	9,26	2,06	8,84	1,44	5,78	1,34	4,58	1,75	9,82	1,74	9,90	7,03	1,46	5,86
39,5	1,75	9,82	1,74	9,90	1,65	7,03	1,46	5,86	1,68	9,45	1,50	8,79	7,08	1,53	6,33
41,5	1,68	9,45	1,50	8,79	1,55	7,08	1,53	6,33	1,48	9,06	1,40	9,59	8,15	1,44	7,53
43,0	1,48	9,06	1,40	9,59	1,42	8,15	1,44	7,53							

(\*) K e R definidos conforme capítulo 5.

QUADRO 6 - Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4 - 5 °C, incubada a diversas temperaturas em infu são de miolo e coração (BHI) 4a. repetição.

Temperatura de incubação em BHI (°C)	Tempo de armazenamento (horas)					
	0	48	96	0	48	96
	K (hr <sup>-1</sup> )*	- R*	K (hr <sup>-1</sup> )	- R	K (hr <sup>-1</sup> )	- R
26,5	-	-	-	-	0,82	3,95
28,0	0,98	7,34	0,96	5,42	0,93	4,23
30,5	1,15	7,12	1,11	5,77	1,04	4,45
32,0	1,25	7,39	1,18	5,51	1,17	4,50
34,0	1,42	7,52	1,43	5,88	1,31	4,74
36,0	-	-	1,64	6,41	1,49	5,37
38,0	1,63	7,52	1,68	6,61	1,61	5,52
39,5	1,62	7,95	1,74	6,93	1,65	5,92
41,5	1,69	8,41	1,64	7,08	1,59	6,19
43,0	1,49	9,00	1,39	7,06	1,36	6,84

(\*) K e R definidos conforme capítulo 5

Quadro 7 - Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4-5 °C, incubada a diversas temperaturas em infusão de miolo e coração (BHI) 5a. repetição.

Temperatura de incubação em BHI (°C)	Tempo de armazenamento (horas)												
	0	48	96	144	- R	K (hr <sup>-1</sup> )	- R	K (hr <sup>-1</sup> )	- R				
26,5	-	-	0,76	3,94	0,61	1,76	0,99	7,08	6,74	0,70	3,30	0,78	2,19
28,0	0,99	7,08	6,74	0,70	3,30	0,78	2,19	1,16	6,60	0,87	4,16	0,84	2,37
30,5	1,16	6,79	6,60	0,87	4,16	0,84	2,37	1,28	7,32	0,94	4,39	0,81	2,16
32,0	1,28	7,32	6,25	0,94	4,39	0,81	2,16	1,40	7,38	1,23	5,72	0,99	2,85
34,0	1,40	7,38	6,79	1,23	5,72	0,99	2,85	1,57	6,87	1,38	5,87	1,03	2,73
36,0	1,57	6,87	7,50	1,38	5,87	1,03	2,73	1,76	7,62	1,45	6,00	1,00	2,74
38,0	1,76	7,62	7,41	1,45	6,00	1,00	2,74	1,71	7,70	1,54	6,59	0,83	2,35
39,5	1,71	7,70	7,44	1,54	6,59	0,83	2,35	2,00	9,28	1,57	7,67	1,14	4,22
41,5	2,00	9,28	8,12	1,57	7,67	1,14	4,22	1,50	7,32	1,37	7,45	1,52	7,56
43,0	1,50	7,32	8,08	1,37	7,45	1,52	7,56						

(\*) K e R definidos conforme capítulo 5



QUADRO 8 - Parâmetros da curva de crescimento da flora microbiana do frango armazenado a 4 - 5 °C, incubada a diversas temperaturas em infusão de miolo e coração (BHI) 6a. re petição.

Temperatura de incubação em BHI (°C)	Tempo de armazenamento (horas)										
	0	48	96	144	- R*	K (hr <sup>-1</sup> )	- R	K (hr <sup>-1</sup> )	- R	K (hr <sup>-1</sup> )	
26,5	0,85	0,80	0,71	0,65	9,13	6,57	3,18	0,65	3,18	0,65	2,09
28,0	1,02	0,83	0,78	0,67	10,08	6,03	3,26	0,67	3,26	0,67	2,13
30,5	1,07	0,95	0,88	0,73	9,61	6,57	3,84	0,73	3,84	0,73	2,31
32,0	1,26	1,21	1,00	0,81	10,63	6,60	4,47	0,81	4,47	0,81	2,81
34,0	1,41	1,32	1,21	0,90	10,23	8,03	5,05	0,90	5,05	0,90	3,23
36,0	1,51	1,58	1,28	1,09	10,49	8,81	5,47	1,09	5,47	1,09	4,13
38,0	1,51	1,56	1,45	1,30	9,92	8,37	6,20	1,30	6,20	1,30	5,52
39,5	1,52	1,63	1,75	1,40	11,42	9,16	8,48	1,40	8,48	1,40	6,83
41,5	1,67	1,76	1,49	1,43	10,33	9,81	6,25	1,43	6,25	1,43	6,42
43,0	1,65	1,64	1,41	1,47	11,54	11,43	7,41	1,47	7,41	1,47	8,15

(\*) K e R definidos conforme capítulo 5.

QUADRO 9 - Tempos de duplicação (hr) da flora microbiana de frango durante o armazenamento a 4 - 5 °C

Repetição	Intervalo considerado (hr)					
	0 - 48		48 - 96		96 - 144	
	tc	tp	tc	tp	tc	tp
1	36,30	12,72	20,18	12,94	-	-
2	37,22	10,62	13,58	14,45	-	-
3	17,96	10,63	9,47	8,63	23,81	16,64
4	42,90	13,30	59,69	20,67	13,47	12,43
5	24,68	13,98	12,51	10,67	11,47	12,07
6	12,29	8,85	10,91	11,97	23,14	16,07
Média	28,56	11,68	21,06	13,22	17,97	14,30

tc = tempo de duplicação para a contagem padrão a 30 °C

tp = tempo de duplicação para a contagem de psicotróficos

QUADRO 10 - Proporção de psicrotrofos na flora microbiana de frango no início e após 144 horas de armazenamento a 4 - 5 °C; determinado pela incubação em BHI a 28 e 36 °C até final da fase exponencial de crescimento

		Início de armazenamento		Após 144 hr de armazenamento		
Temperatura de incubação (°C)	Contagem total (N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )	Psicrotrofos (N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )	P/C	Contagem total (N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )	Psicrotrofos (N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )	P/C
28	3,4 x 10 <sup>8</sup>	3,2 x 10 <sup>8</sup>	0,94	2,3 x 10 <sup>8</sup>	2,7 x 10 <sup>8</sup>	1,17
36	1,4 x 10 <sup>9</sup>	4,4 x 10 <sup>8</sup>	0,31	9,6 x 10 <sup>8</sup>	7,2 x 10 <sup>8</sup>	0,75

P/C = Relação entre contagem de psicrotrofos e contagem total

QUADRO 11 - Porcentual de psicotróficos na flora microbiana de frango imediatamente após o processamento, obtido através das contagens de microrganismos totais e psicotróficos pelo método padrão na suspensão da carcaça e nesta suspensão incubada em BHI a 28 °C até Absorbância de 0,6 a 0,9.

Repetição	Na carcaça		Na suspensão incubada a 28 °C		%P
	Contagem Total (Nº/cm <sup>2</sup> )	Psicotróficos (Nº/cm <sup>2</sup> )	Contagem Total (Nº/cm <sup>2</sup> )	Psicotróficos (Nº/cm <sup>2</sup> )	
1	1,4 x 10 <sup>4</sup>	4,2 x 10 <sup>3</sup>	2,5 x 10 <sup>8</sup>	2,2 x 10 <sup>8</sup>	88
2	3,5 x 10 <sup>4</sup>	8,8 x 10 <sup>3</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	1,5 x 10 <sup>8</sup>	54
3	7,4 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>4</sup>	4,2 x 10 <sup>8</sup>	2,1 x 10 <sup>8</sup>	50
4	2,5 x 10 <sup>4</sup>	6,9 x 10 <sup>3</sup>	4,6 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	61
5	2,8 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	6,2 x 10 <sup>8</sup>	3,8 x 10 <sup>8</sup>	61
6	5,2 x 10 <sup>4</sup>	2,2 x 10 <sup>4</sup>	4,6 x 10 <sup>8</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	39
7	7,6 x 10 <sup>4</sup>	9,3 x 10 <sup>3</sup>	5,0 x 10 <sup>8</sup>	2,7 x 10 <sup>8</sup>	54
8	4,2 x 10 <sup>4</sup>	3,3 x 10 <sup>3</sup>	3,1 x 10 <sup>8</sup>	7,5 x 10 <sup>7</sup>	24
9	1,4 x 10 <sup>5</sup>	8,9 x 10 <sup>4</sup>	6,2 x 10 <sup>8</sup>	5,1 x 10 <sup>8</sup>	82

%P = Porcentagem de psicotróficos

QUADRO 12 - Resultados dos testes aplicados em culturas puras de psicrotróficos de frango isoladas no início da armazenagem frigorificada a 4 - 5 °C

CULTURA

Teste	1	2	3	4	5****6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Forma (*)	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Flagelos (**)	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-
Redução NO3	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Oxid-Ferm- (***)	I	I	O	I	O	I	I	I	O	I	I	I	I	I
Oxidase	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Fluorescência	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Arginina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Res. antibióticos (****)														
Penicilina	-	-	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	-
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloramfenicol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	-	-	R	R	R	R	-	-	R	-	-	-	-	-
Cloxacilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefaloridina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

(\*) Forma: (\*\*) Flagelos: (\*\*\*) Oxidação/Fermentação: (\*\*\*\*) Resistência à antibióticos:  
 B = Bastonete O = Oxida glicose R = Resistente  
 CB = Cocobacilo F = Fermenta glicose - = Sensível  
 (\*\*\*) Oxidação/Fermentação: (\*\*\*\*\*) Cultura com pigmentação amarela  
 I = Inerte à glicose

QUADRO 13 - Resultados dos testes aplicados em culturas puras de psicrotróficos de frango no final da estocagem frigorificada.

CULTURA

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Forma (*)	B	B	B	CB	B	B	B	B	B	B	CB	CB	B	CB	B
Motilidade	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Flagelos (**)	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	-
Redução NO3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxid-Ferm (***)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescência	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Res. antibióticos (****)															
Penicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloromfenicol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cloxacilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefaloridina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

(\*) Forma: (\*\*\*) Oxidação/Fermentação: (\*\*\*\*) Resistência a antibióticos:

B = Bastonete O = Oxida glicose R = Resistente

CB = Coccobacilo F = Fermenta glicose - = Sensível

I = Inerte à glicose

(\*\*) Flagelos:

P = Polares

QUADRO 14 - Resultados dos testes aplicados em culturas puras de psicotróficos de frango recém processado, isolados da suspensão microbiana incubada em BHI a 28 °C.

Teste	CULTURA															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Forma	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flagelos (**)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Redução NO3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxid-Ferm (***)	I	I	O	I	O	I	I	I	I	I	O	I	I	I	I	I
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluorescência	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Res. antibióticos (****)																
Penicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloromfenicol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-
Cloxacilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefaloridina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

(\*) Forma: (\*\*\*) Oxidação/Fermentação: (\*\*\*\*) Resistência a antibióticos:

B = Bastonete O = Oxida glicose R = Resistente

CB = Coccobacilo F = Fermenta glicose - = Sensível

I = Inerte à glicose

(\*\*) Flagelos:

P = Polares

QUADRO 15 - Resultados dos testes aplicados em culturas puras de psicotróficos de frango no final da estocagem, isoladas da suspensão microbiana incubada em BHI a 28 °C.

CULTURA

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Forma (*)	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB
Motilidade	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Flagelos (**)	-	P	P	-	-	P	P	-	P	P	P	-	-	-	-
Redução NO3	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Oxid-Ferm (***)	I	O	F	I	I	O	O	I	F	O	O	I	I	O	I
Oxidase	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
Fluorescência	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Arginina	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
Res. Antibióticos (****)															
Penicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloramfenicol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	-	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-
Cloxacilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefaloridina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

(\*) Forma: (\*\*\*) Oxidação/Fermentação: (\*\*\*\*) Resistência a antibióticos:

B = Bastonete O = Oxida glicose R = Resistente

CB = Cocobacilo F = Fermenta glicose - = Sensível

I = Inerte à glicose

(\*\*) Flagelos:

P = Polares

- = Ausência



QUADRO 16 - Contagens de microrganismos totais e de psicrotrófi-  
cos na microflora da carcaça de frango recém proces-  
sada, obtidas após incubação em BHI a 28 °C e amo-  
stras a diferentes Absorbâncias da fase de cresci-  
mento.

Absorbância	Contagem Total (Nº/ml)	Contagem Psicrotrófi- cos (Nº/ml)
0,072	$4,8 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$
0,300	$6,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
0,400	$9,6 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$
0,500	$12,3 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$
0,600	$16,0 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$

QUADRO 17 - Comparação das contagens microbianas totais avaliadas pelo método proposto com aquelas obtidas por plaqueamento dos microrganismos das carcaças no início do armazenamento a 4 - 5 °C.

Repetição	Contagem Total		Absorbância lida	Absorbância corrigida	Contagem Total calculada (log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )
	em laboratório (log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )				
1	4,380211	0,100	5,9 x 10 <sup>-5</sup>	4,431364	
2	4,255272	0,088	4,4 x 10 <sup>-5</sup>	4,230449	
3	4,342423	0,118	5,4 x 10 <sup>-5</sup>	4,505150	
4	5,477121	0,090	7,4 x 10 <sup>-4</sup>	5,041393	
5	4,959041	0,108	2,2 x 10 <sup>-4</sup>	4,845098	
6	4,079181	0,092	2,9 x 10 <sup>-5</sup>	4,414973	

QUADRO 18 - Comparação das contagens microbianas totais avaliadas pelo método proposto com aquelas obtidas por plaqueamento dos microrganismos das carcaças armazenadas por 48 horas a 4 - 5 °C.

Repetição	Contagem Total		Absorbância corrigida	Contagem Total	
	em laboratório (log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )	Absorbância lida		calculada (log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )	
1	5,000000	0,102	2,5 x 10 <sup>-4</sup>	5,079181	
2	4,792392	0,052	1,5 x 10 <sup>-4</sup>	4,959041	
3	5,146128	0,132	3,5 x 10 <sup>-4</sup>	5,230449	
4	5,799340	0,090	1,6 x 10 <sup>-3</sup>	5,886491	
5	5,544068	0,108	8,7 x 10 <sup>-4</sup>	5,477121	
6	5,255272	0,075	4,5 x 10 <sup>-4</sup>	5,000000	

QUADRO 19 - Comparação das contagens microbianas totais avaliadas pelo método proposto com aquelas obtidas por plaqueamento dos microorganismos das carcaças armazenadas por 96 horas a 4 - 5 °C.

Repetição	Contagem Total		Absorbância lida	Absorbância corrigida	Contagem Total calculada (log N <sub>9</sub> /cm <sup>2</sup> )
	em laboratório (log N <sub>9</sub> /cm <sup>2</sup> )	Absorbância			
1	5,716003	0,038	1,3 x 10 <sup>-3</sup>	5,716003	
2	5,707570	0,085	1,3 x 10 <sup>-3</sup>	6,041393	
3	6,672098	0,105	1,2 x 10 <sup>-2</sup>	6,763428	
4	6,041393	0,070	2,7 x 10 <sup>-3</sup>	6,301030	
5	6,698970	0,142	1,2 x 10 <sup>-2</sup>	6,397940	
6	6,579783	0,104	9,4 x 10 <sup>-3</sup>	6,462398	

QUADRO 20 - Comparação das contagens microbianas totais avaliadas pelo método proposto com aquelas obtidas por plaqueamento dos microrganismos das carcaças armazenadas por 144 horas a 4 - 5 °C.

Repetição	Contagem Total		Absorbância lida	Absorbância corrigida	Contagem Total calculada (log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )
	em laboratório (log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )				
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	7,278754	0,118	4,7 x 10 <sup>-2</sup>	7,322219	
4	7,113943	-	-	-	
5	7,959041	0,180	2,2 x 10 <sup>-1</sup>	7,342423	
6	7,204119	0,154	3,9 x 10 <sup>-2</sup>	7,113943	

QUADRO 21 - Comparação das contagens de psicrotróficos avaliadas pelo método proposto com aquelas obtidas por plaqueamento dos microrganismos das carcaças no início do armazenamento a 4 - 5 °C.

Repetição	Contagem de Psicrotróficos		Absorbância lida	Absorbância corrigida	Contagem de Psicrotróficos calculada (log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )
	(log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )				
1	3,579783	0,100	2,1 x 10 <sup>-5</sup>	3,913814	
2	3,431364	0,088	1,5 x 10 <sup>-5</sup>	3,716003	
3	3,591065	0,118	2,1 x 10 <sup>-5</sup>	3,986772	
4	4,255272	0,090	9,8 x 10 <sup>-5</sup>	4,518514	
5	4,397940	0,108	1,4 x 10 <sup>-4</sup>	4,342423	
6	3,623249	0,092	2,3 x 10 <sup>-5</sup>	3,903090	

QUADRO 22 - Comparação das contagens de psicrotróficos avaliadas pelo método proposto com aquelas obtidas por plaqueamento dos microrganismos das carcaças armazenadas por 48 horas a 4 - 5 °C.

Repetição	Contagem de Psicrotróficos		Absorbância corrigida	Contagem de Psicrotróficos	
	(log N <sub>9</sub> /cm <sup>2</sup> )	Absorbância lida		calculada <sup>2</sup>	(log N <sub>9</sub> /cm <sup>2</sup> )
1	4,716003	0,102	2,8 x 10 <sup>-4</sup>	4,903090	
2	4,792392	0,052	3,4 x 10 <sup>-4</sup>	4,763428	
3	4,949390	0,132	4,8 x 10 <sup>-4</sup>	5,041393	
4	5,342423	0,090	1,2 x 10 <sup>-3</sup>	5,690196	
5	5,431364	0,108	1,5 x 10 <sup>-3</sup>	5,278754	
6	5,255272	0,075	7,9 x 10 <sup>-4</sup>	5,213048	

QUADRO 23 - Comparação das contagens de psicrotróficos avaliadas pelo método proposto com aquelas obtidas por plaqueamento dos microrganismos das carcaças armazenadas por 96 horas a 4 - 5 °C.

Repetição.	Contagem de Psicrotróficos		Absorbância corrigida	Contagem de Psicrotróficos calculada <sub>2</sub> (log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )
	(log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )	lida		
1	5,832509	0,038	3,7 x 10 <sup>-3</sup>	5,740363
2	5,792392	0,085	3,4 x 10 <sup>-3</sup>	6,000000
3	6,623249	0,105	2,3 x 10 <sup>-2</sup>	6,886491
4	6,041393	0,070	6,0 x 10 <sup>-3</sup>	6,301030
5	6,785330	0,142	3,3 x 10 <sup>-2</sup>	6,414973
6	6,462398	0,104	1,6 x 10 <sup>-2</sup>	6,491362



QUADRO 24 - Comparação das contagens de psicrotróficos avaliadas pelo método proposto com aquelas obtidas por plaqueamento dos microrganismos das carcaças armazzenadas por 144 horas a 4 - 5 °C.

Repetição	Contagem de Psicrotróficos (log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )	Absorbância lida	Absorbância corrigida	Contagem de Psicrotróficos calculada <sub>2</sub> (log N <sub>0</sub> /cm <sup>2</sup> )
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	7,491362	0,118	1,7 x 10 <sup>-1</sup>	7,505150
4	7,204120	-	-	-
5	7,982271	0,180	5,2 x 10 <sup>-1</sup>	7,531479
6	7,361728	0,154	1,2 x 10 <sup>-1</sup>	7,447158

QUADRO 25 - Correlação entre os valores das contagens de microrganismos totais e de psicrotróficos obtidos pelo método proposto com aqueles obtidos pelo método padrão.

Tempo de Armazenagem (hr)	Coeficiente de Correlação	
	Contagem Total	Contagem de Psicrotróficos
0	0,95	0,94
48	0,91	0,83
96	0,87	0,82
144	0,64	0,86

QUADRO 26 - Velocidades de crescimento ( $\text{hr}^{-1}$ ) de microrganismos psicrotróficos isolados do frango e incubados em BHI

Cultura	Temperatura de incubação ( $^{\circ}\text{C}$ )															
	34,0	32,0	30,0	27,5	25,5	23,5	21,5	19,0	17,5	16,5	15,5	13,5	12,5	11,5		
11, Quadro 14	0,76	0,86	1,09	0,95	0,83	0,75	0,65	0,53	0,50	0,42	0,22	0,20	(*)	(*)		
15, Quadro 14	-	0,13	0,70	0,72	0,71	0,57	0,52	0,43	0,34	0,28	0,24	0,20	0,17	0,14		
10, Quadro 12	-	0,81	0,93	0,86	0,74	0,57	0,54	0,47	0,41	0,32	0,28	0,22	0,18	0,16		
5, Quadro 12	0,23	0,36	0,40	0,39	0,38	0,34	0,32	-	-	-	0,25	0,23	(*)	(*)		

(\*) Não houve crescimento após 19 horas de incubação.

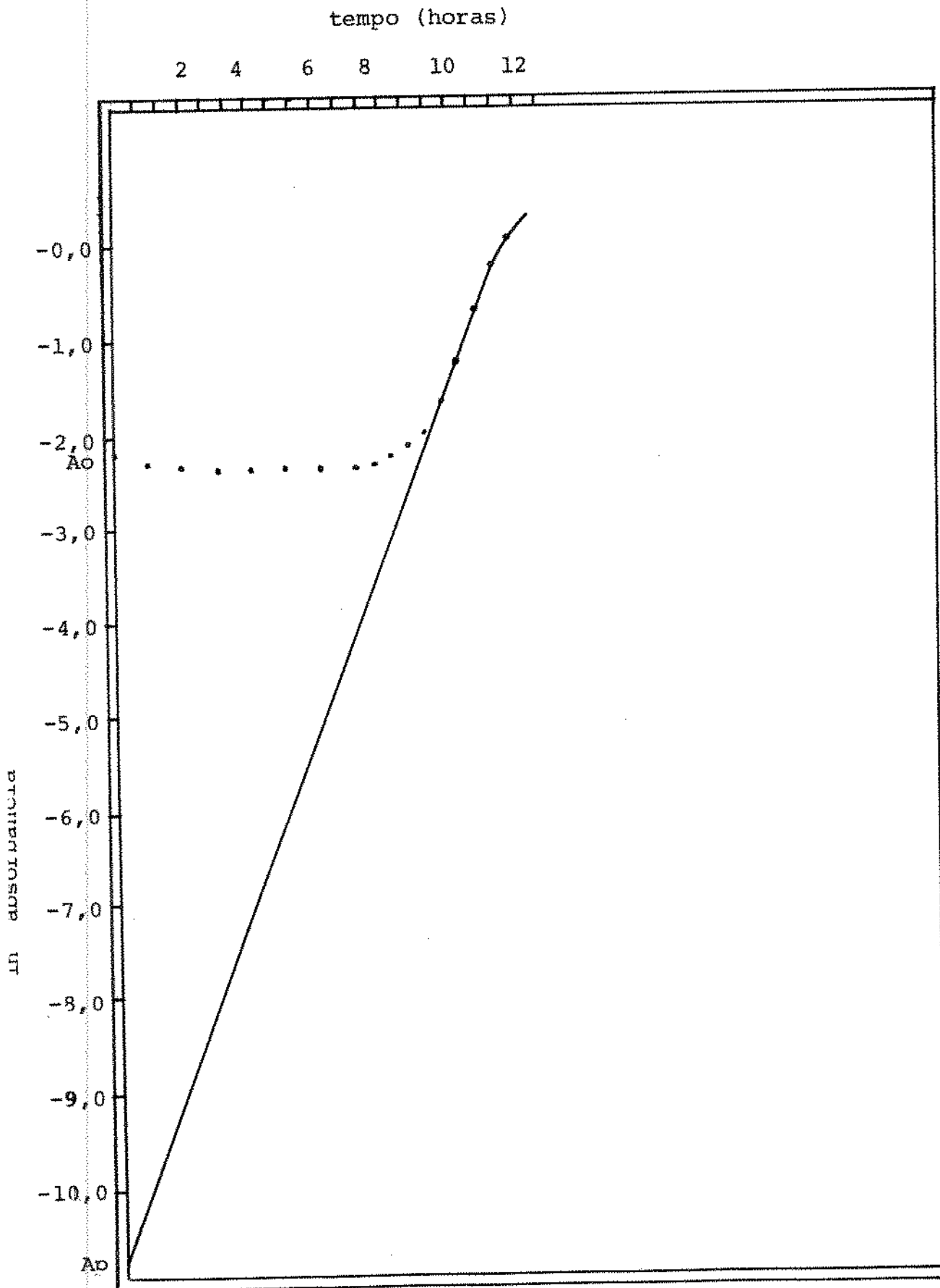


FIGURA 3 - Crescimento em BHI a 29 °C, da flora microbiana de frango imediatamente após o processamento

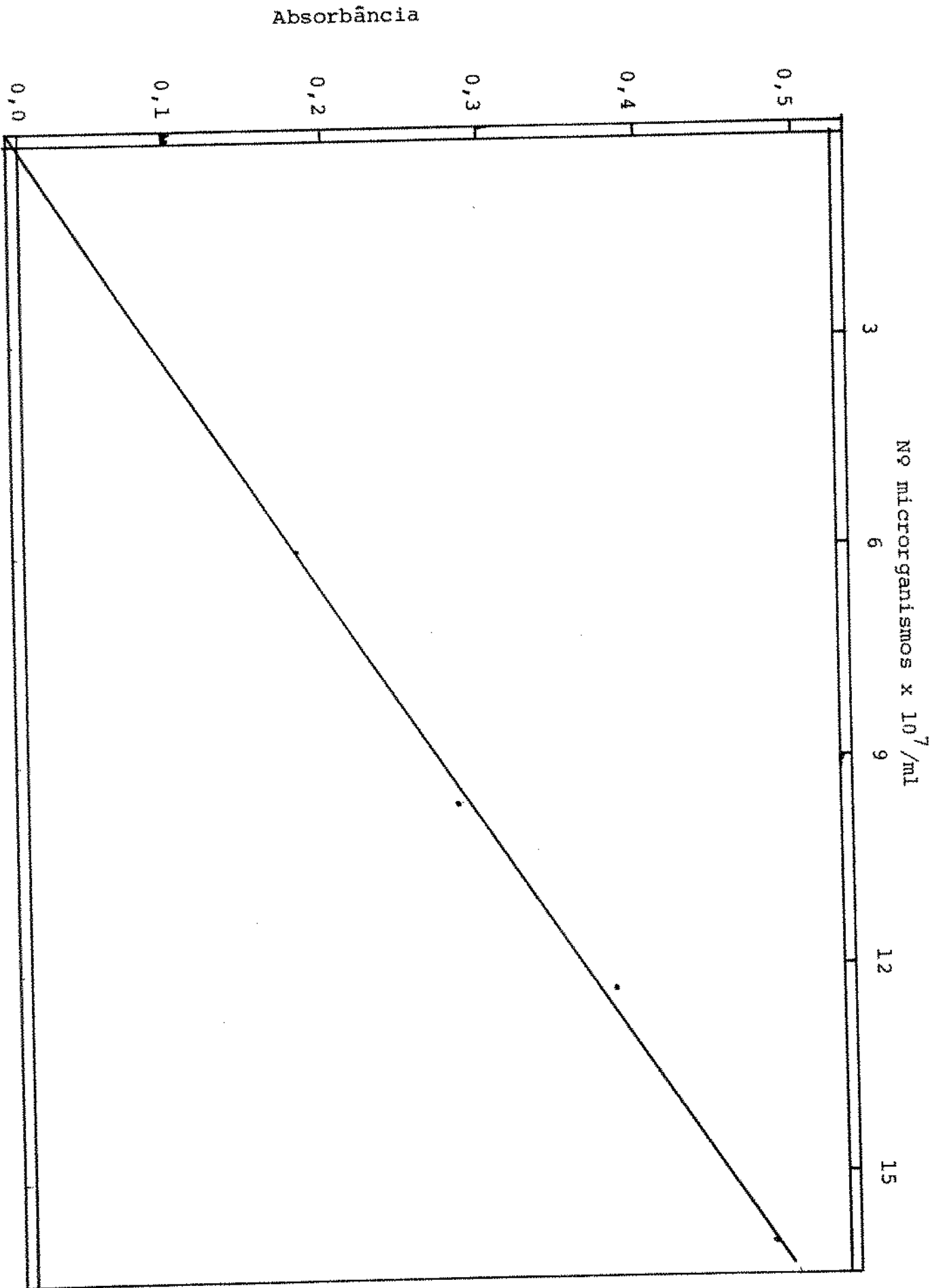


FIGURA 4 - Relação entre a contagem total e a Absorbância dos microrganismos do frango recém-processado, cultivados em BHI a 29 °C

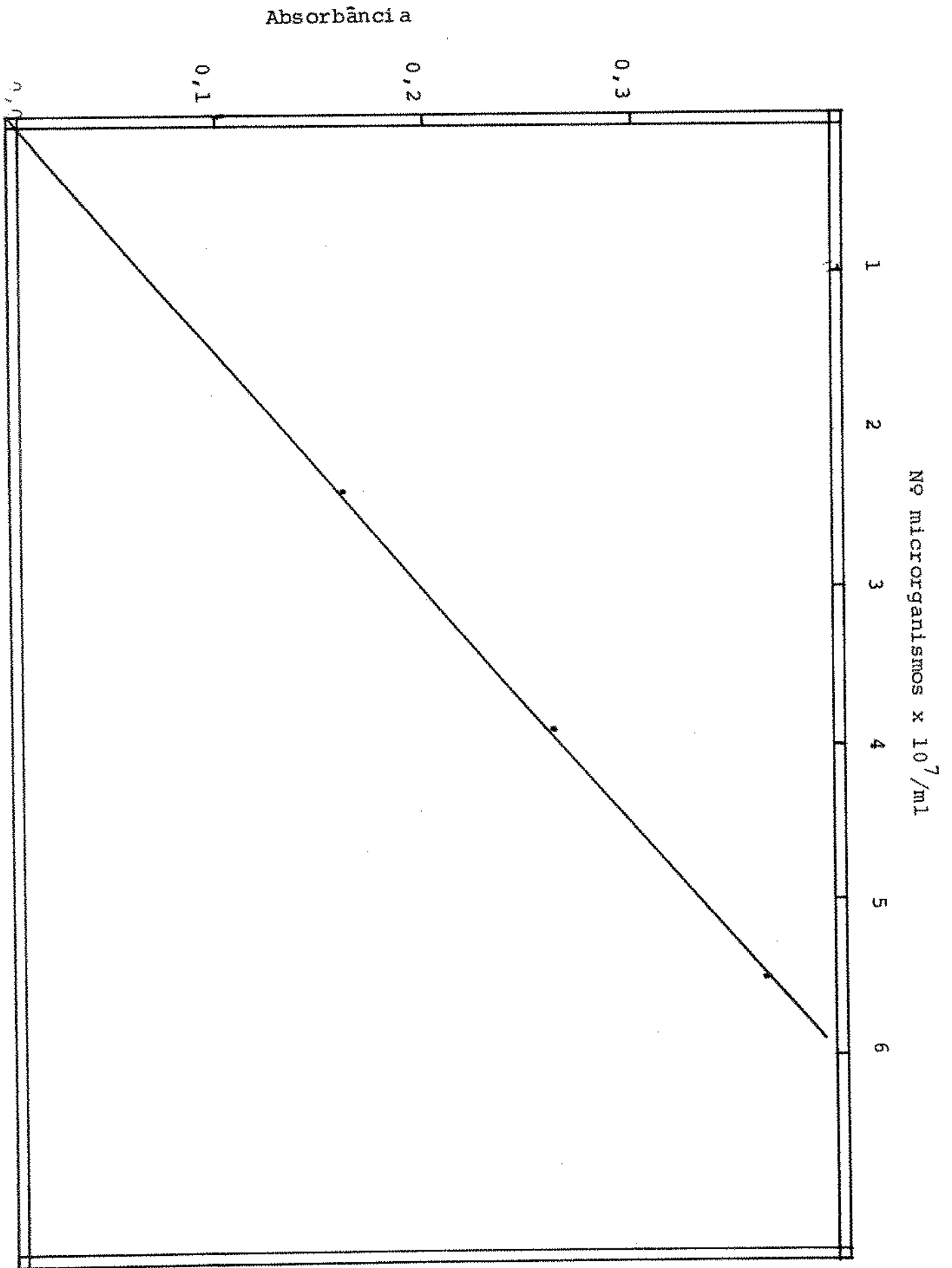


FIGURA 5 - Relação entre a contagem de psicrotróficos e a absorvância dos microrganismos do frango recém-processado, cultivados em BHI a 28 °C

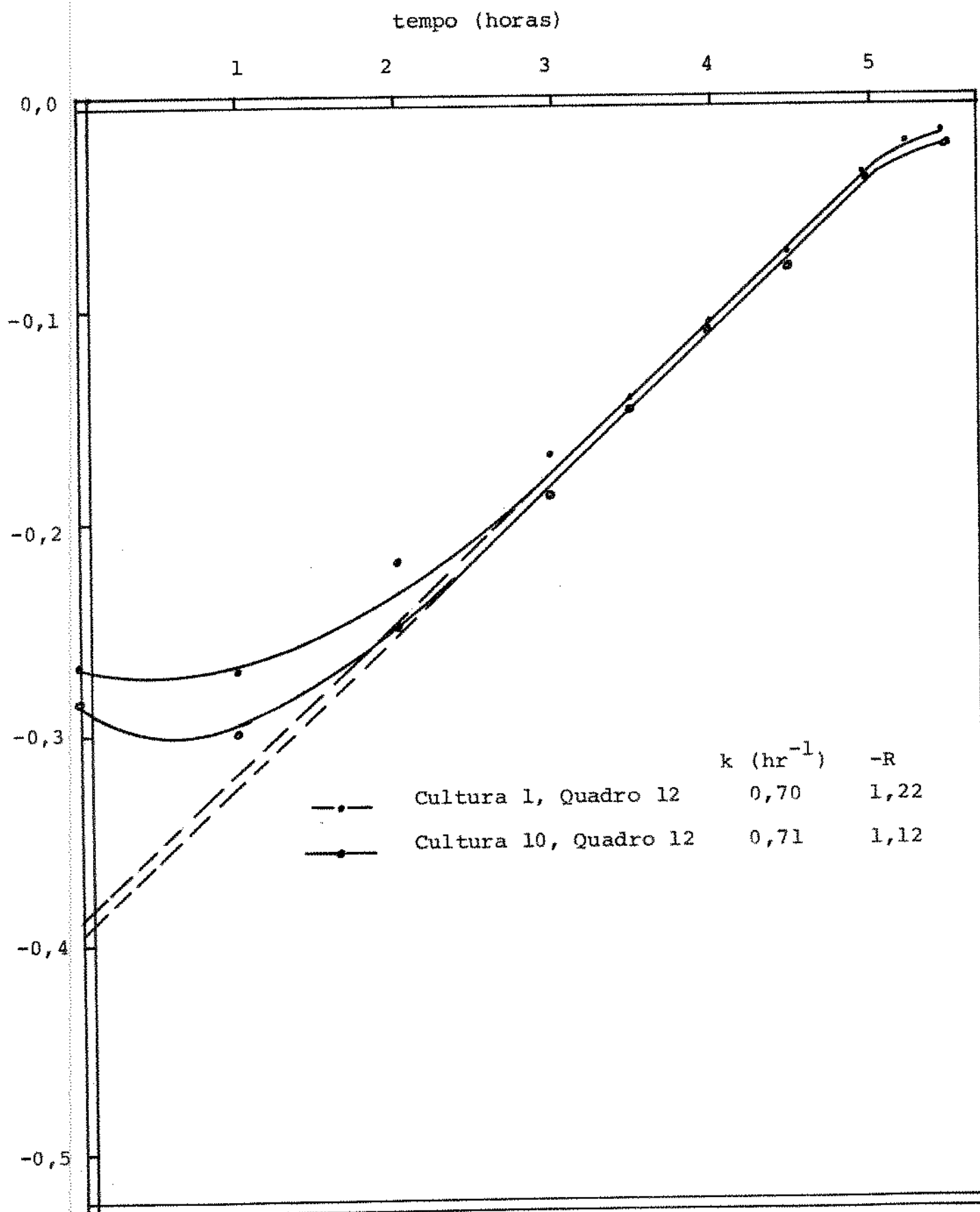


FIGURA 6 - Crescimento em BHI a 28 °C, de culturas puras de psicotróficos isoladas de frango com 7 dias de es tocagem a 4 - 5 °C

tempo (horas)

1 2 3 4 5

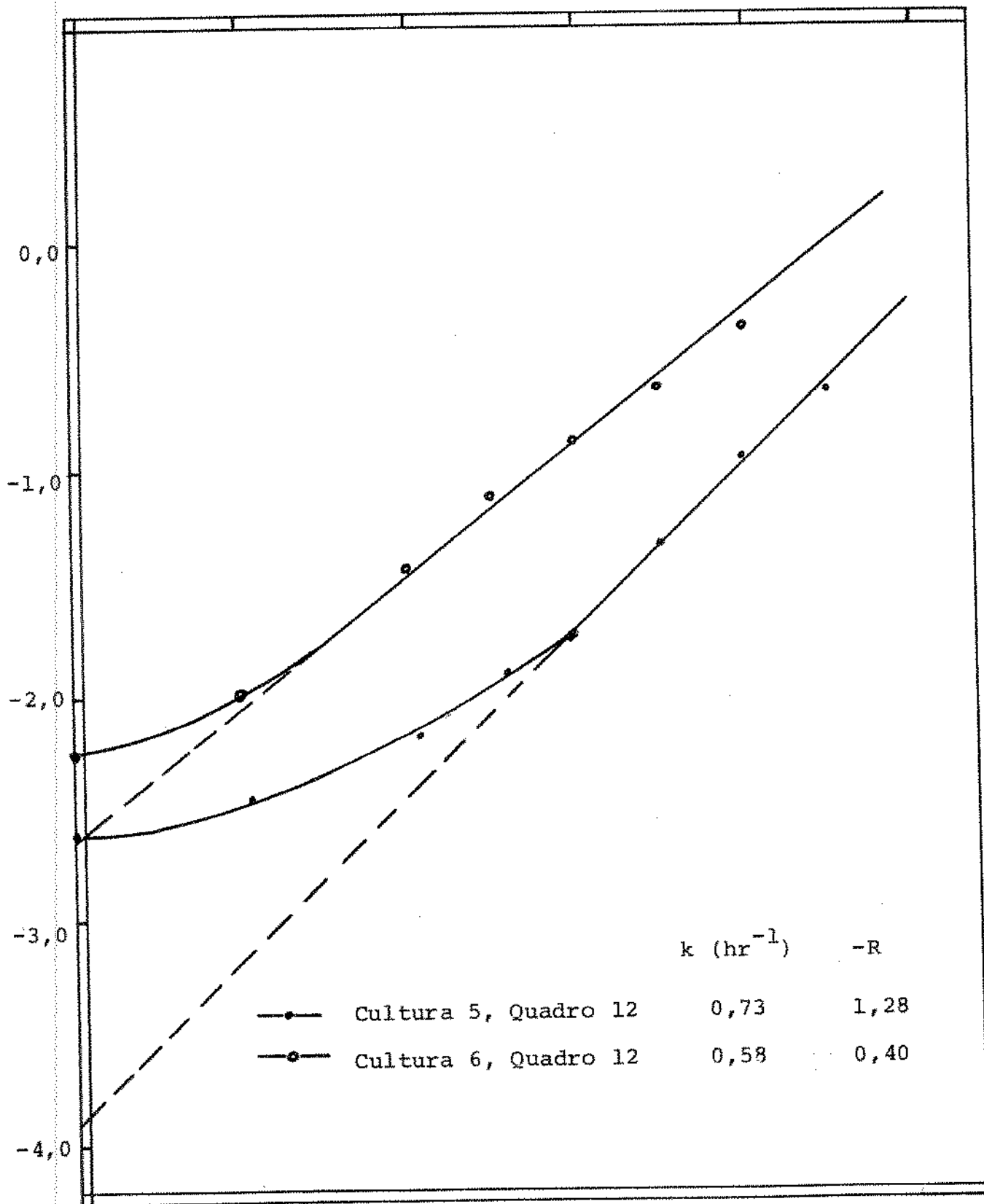


FIGURA 7 - Crescimento em BHI a 28 °C, de culturas puras de psicrotróficos isoladas de frango com 7 dias de es tocagem a 4 - 5 °C



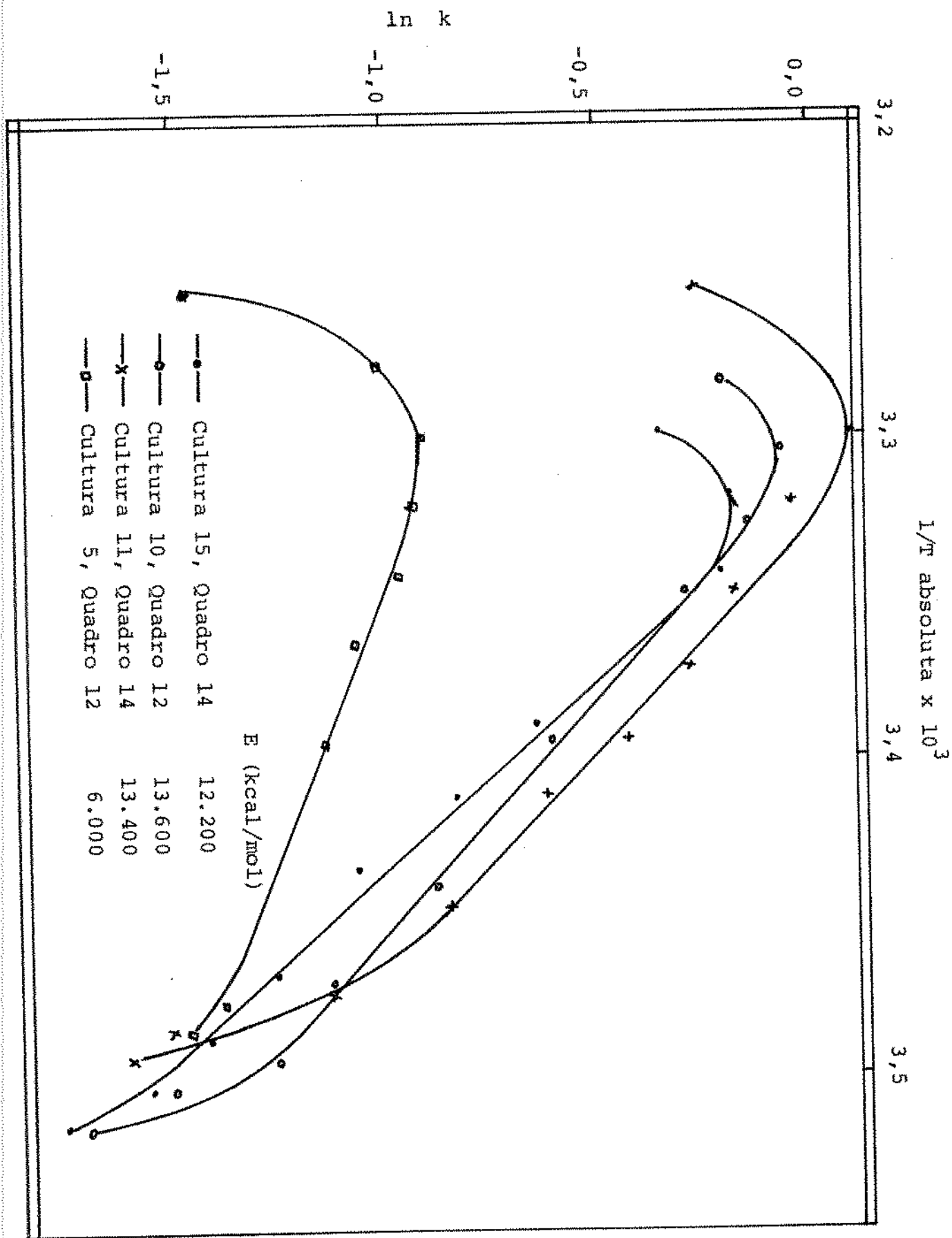


FIGURA 8 - Gráfico de Arrhenius para culturas puras de psicrotróficos isoladas de frango com 7 dias de estocagem a 4 - 5 °C e incubadas em BHI

9. BIBLIOGRAFIA

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1972. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. William J. Hausler Jr. Editor. Washington, D.C.
- AYRES, J.C.; Ogilvy, W.S. and Stewart, G.F. 1950. Post Mortem Changes in Stored Meats. I. Microorganisms Associated With Development of Slime on Eviscerated Cut-up Poultry. Food Tech. 4: 199-205.
- AYRES, J.C.; Walker, H.W.; Fanelli, M.J.; King, A.W. and Thomas, F. 1956. Use of Antibiotics in Prolonging Storage Life of Dressed Chicken. Food Tech. 10: 563-568.
- AYRES, J.C. 1963. Low Temperature Organisms as Indexes of Quality of Fresh Meats. In Microbiological Quality of Foods. Academic Press. New York.
- BARNES, E.M. and Thornley, M.J. 1966. The Spoilage Flora of Eviscerated Chickens Stored at Different Temperatures. J. Food Tech. 1: 113-119.
- BARNES, E.M. and Impey, C.S. 1968. Psychrophilic Spoilage Bacteria of Poultry. J. Appl. Bacteriol. 31: 97-107.
- BARNES, E.M. and Impey, C.S. 1975.

- BARNES, E.M. and Impey, C.S. 1975. The Shelf Life of Universe rated Chicken Carcasses Stored at 10 °C and 4 °C. Br. Poul. Sci. 16: 319-326.
- BARNES, E.M. 1976. Microbiological Problems of Poultry at Refrigerator Temperatures. A Review. J. Sci. Food Agric. 27: 777-782.
- BRANT, A.W. 1975. Selective media for Psychrotrophic Spoilage Bacteria of Fresh Poultry. 2nd European Symposium on Poultry Meat. Oosterbeek, The Netherlands.
- CASALE, J.O.; May, K.N. and Powers, J.J. 1965. Effects of Three Chilling Methods on Bacteriological, Organoleptic, and Physical Properties of Broiler Chickens. Food Tech. 19: 859-861.
- CLARK, D.S. 1968. Growth of Psychrotolerant *Pseudomonas* and *Achromobacter* on Chicken Skin. Poul. Sci. 47: 1575-1578.
- CLARK, D.S. and Lentz, C.P. 1969. Microbiological Studies in Poultry Processing Plants in Canada. Can. Inst. Food Technol. J. 2: 33-36.
- COWAN, S.T.; Holt, J.G.; Liston, J.; Murray, R.G.E.; Niven, C.F.; Ravin, A.W. and Stanier, R.Y. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.

HEWLETT-PACKARD Co. 1975. Applications Programs. Chapter 6.  
USA.

HUGH, R. and Leifson, E. 1953. The taxonomic Significance of  
Fermentative Versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by  
Various Gram-Negative Bacteria. J. Bacteriol. 66: 24-26.

INGRAHAM, J.L. 1958. Growth of Psychrophilic Bacteria. J.  
Bacteriol. 76: 75-80.

KING, E.O.; Ward, M.K. and Raney, D.E. 1954. Two Simple Media  
for the Demonstration of Pyocyanin and Fluorescin. J. Lab.  
Clin. Med. 44: 301-307.

KOHLER, A.R.; Miller, W.H. and Brogquist, H.P. 1955. Aureomycin,  
Chlortetracycline and the Control of Poultry Spoilage. Food  
Tech. 9: 151-154.

KOVACS, N. 1956. Identification of *Pseudomonas Pyocyanea* by  
the Oxidase Reaction. Nature 178:703.

MALLMANN, W.L.; Dawson, L.E.; Sultzer, B.M. and Wright, H.S.  
1958. Studies on Microbiological Methods for Predicting  
Shelf Life of Dressed Poultry. Food Tech. 12: 122-126.

Mc VICKER, R.J.; Dawson, L.E.; Mallmann, W.L.; Walters, S. and  
Jones, E. 1958. Effect of Certain Bacterial Inhibitors on  
Shelf-Life of Fresh Fryers. Food Tech. 12: 147-149.

MEAD, G.C. 1975. Hygiene Aspects of the Chilling Process. 2nd  
European Symposium on Poultry Meat. Oosterbeek, The Netherlands.

- MEAD, G.C. and Thomas, N.L. 1973a. The Bacteriological Condition of Eviscerated Chickens Processed Under Controlled Conditions in a Spin-Chilling System and Sampled by Two Different Methods. *Br. Poult. Sci.* 14: 413-419.
- MEAD, G.C. and Thomas, N.L. 1973b. Factors Affecting the Use of Chlorine in the Spin-Chilling of Eviscerated Poultry. *Br. Poult. Sci.* 14: 99-117.
- NAGEL, C.W.; Simpson, K.L.; Ng, H.; Vaughn, R.H. and Stewart, G.F. 1960. Microorganisms Associated with Spoilage of Refrigerated Poultry. *Food Tech.* 14: 21-23.
- NEVES de Camargo Filho, L. 1978. Estudo de Algumas Variáveis no Resfriamento Contínuo por Imersão de Frango. Tese de Mestrado. FEAA. Campinas.
- PATTERSON, J.T. 1972. Microbiological Sampling of Poultry Carcasses. *J. Appl. Bacteriol.* 35: 569-575.
- PATTERSON, J.T. and Gibbs, P.A. 1975. Bacteriological Standards for Poultry Products. 2nd European Symposium on Poultry Meat. Oosterbeek, The Netherlands.
- RHODES, M.E. 1958. The Cytology of *Pseudomonas* spp. as Revealed by a Silver-Plating Staining Method. *J. Gen. Microbiol.* 18: 639-648.
- SANDERS, D.H. and Blacksher, C.D. 1971. Effect of Chlorination in the Final Washer on Bacterial Counts of Broiler Chicken Carcasses. *Poult. Sci.* 50: 215-219.

- SHEWAN, J.M. and Hodgkiss, W. 1954. A Method for the Rapid Differentiation of Certain Non-Pathogenic, Asporogenous Bacilli. *Nature* 173:208.
- SILLIKER, J.H. 1958. Simultaneous Determination of Total Count and Fluorescent *Pseudomonas* in Fresh Meat and Poultry. *Food Tech.* 12: 255-257.
- SILLIKER, J.H. 1963. Total Counts as Indexes of Food Quality. In *Microbiological Quality of Foods*. Academic Press. New York.
- SIMONSEN, B. 1975. Microbiological Aspects of Poultry Meat Quality. 2nd European Symposium on Poultry Meat. Oosterbeek, The Netherlands.
- SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. 1975. *Manual of Microbiological Methods*. McGraw-Hill. New York.
- STRAKA, R.P. and Stokes, J.L. 1957. A Rapid Method for the Estimation of the Bacterial Content of Pre-Cooked Frozen Foods. *Food Tech.* 22: 412-419.
- STUMBO, C.R. 1973. *Thermobacteriology in Food Processing*. Academic Press. New York.
- THOMSON, J.E.; Whitehead, W.K. and Mercuri, A.J. 1974. Chilling Poultry Meat. A Literature Review. *Poult. Sci.* 53: 1268-1281.

- THORNLEY, M.J. 1960. The Differentiation of *Pseudomonas* From Other Gram-Negative Bacteria on the Basis of Arginine Metabolism. J. Appl. Bacteriol. 23: 37-52.
- VAUGHN, R.H.; Nagel, C.W.; Sawyer, F.M. and Stewart, G.F. 1957. Antibiotics in Poultry Meat Preservation: A Comparison of the Tetracyclines. Food Tech. 11: 426-429.
- WALKER, H.W. and Ayres, J.C. 1958. Antibiotic Residuals and Microbial Resistance in Poultry Treated with Tetracyclines. Food Res. 23: 525-531.
- WALKER, H.W.; Coffin, W.J. and Ayres, J.C. 1959. A Resazurin Reduction Test for the Determination of Microbiological Quality of Processed Poultry. Food Tech. 13: 578-580.
- WELLS, F.E. 1959. Resazurin Reduction Tests for Shelf-Life Estimations of Poultry Meats. Food Tech. 13: 584-586.
- WELLS, F.E. 1961. Parameters of the Spoilage of Poultry Meats by Psychrophiles. Ph.D. Thesis. Purdue University.
- WELLS, F.E.; Fry, J.L.; Marion W.W. and Stadelman, W.J. 1957. Relative Efficacy of Three Tetracyclines with Poultry Meat. Food Tech. 11: 656-658.
- YOKOYA, F. and Peres-Canhos, V. 1975. Use of Growth Curve Parameters for Estimation of Microbial Population in Foods. Inter. Conf. on Mechanized Microb. Ottawa, Canada.

- YOKOYA, F. and Zulzke, L. 1975. Method for Sampling Meat Surfaces. Appl. Microbiol. 29: 551-552.
- ZIEGLER, F.; Spencer, J.W. and Stadelman, W.J. 1954. A Rapid Method for Determining Spoilage in Fresh Poultry Meat. Poult. Sci. 33: 1253-1255.
- ZIEGLER, F. and Stadelman, W.J. 1955a. The Effect of Different Scald Water Temperatures on the Shelf-Life of Fresh Non-Frozen Fryers. Poult. Sci. 34: 237-238.
- ZIEGLER, F. and Stadelman, W.J. 1955b. Increasing Shelf-Life of Fresh Chicken Meat by Using Chlorination. Poult. Sic. 34: 1389-1391.