

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Airton Pinheiro Romeu

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA MICROFLORA
DE BACTÉRIAS DETERIORADORAS DOS
PRODUTOS DE ORIGEM MARINHA

Airton Pinheiro Romeu
Farmacêutico Químico

Orientador:

Dr. Fumio Yokoya

Professor de Microbiologia
de Alimentos da Faculdade
de Tecnologia de Alimentos
da UNICAMP

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universi
dade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciên
cia de Alimentos.

-1974-

UNICAMP
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS

87

A minha esposa e filho

Júcia Maria e Marco Antonio

ÍNDICE

páginas

RESUMO

SUMMARY

I.	INTRODUÇÃO.....	1
II.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
	A. Microflora Natural do Pescado.....	3
	B. Deterioração do Pescado Durante o Armazenamento.....	4
	C. Métodos Microbiológicos no Exame de Pescado.....	7
III.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
	A. Amostras.....	11
	B. Determinação de Microrganismos na Superfície das Amostras.....	11
	C. Determinação de Microrganismos no Total da Amostra.....	12
	D. Constatação de Microrganismos com Atividade Proteolítica e Lipolítica.....	12
	E. Características Morfológicas e Fisiológicas de Culturas Isoladas.....	13
IV.	RESULTADOS.....	15
	A. Características Morfológicas e Fisiológicas das Bactérias Isoladas.....	15
V.	DISCUSSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
	APÊNDICE.....	54
	AGRADECIMENTOS.....	60

RESUMO

Foram comparadas as técnicas de contagem da microflora total de mesófilas (30°C por 48 horas), psicrófilas (20°C por 48 horas) e psicrotróficas (7°C por 10 dias) da superfície e no total de sardinha (Sardinella aurita) e de camarão sete barbas (Xiphopenaeus kroyeri). As avaliações do grau de contaminação bacteriana das amostras conduzidas às três temperaturas de incubação mostraram contagens próximas, variando ligeiramente com a amostra de pescado e a temperatura de incubação das placas semeadas. Pela análise das 607 culturas isoladas, constatou-se a predominância de bactérias em bastonetes Gram negativos, possivelmente Pseudomonas, Achromobacter e Flavobacterium, nas amostras de sardinha nas três temperaturas de incubação, e nas amostras de camarão houve predominância de bactérias em cocos Gram negativos nas temperaturas de incubação de 30°C e 20°C e de bastonetes Gram negativos a 7°C. Constatou-se, também, que 55,8% das cepas isoladas apresentavam propriedades lipolítica e/ou proteolítica. Observou-se que somente 29,3% de microrganismos isolados a 30°C (contagem de mesófilos) possuíam atividades proteolítica e/ou lipolítica a 7°C. Dentre os microrganismos isolados a 20°C (contagem de psicrófilos), 39,4% apresentaram essas propriedades a 7°C e daqueles isolados a 7°C (contagem de psicrotróficos), 49%. Isso vem mostrar que o método para a contagem de psicrotróficos é cerca de duas vezes mais preciso para enumeração das bactérias de importância à deterioração de pescados refrigerados, do que o método de contagem de mesófilos. A diferença de precisão entre os métodos para contagens de psicrófilos e de psicrotróficos é de cerca de 20% em favor do último.

SUMMARY

The techniques for the determination of mesophilic (48 hours at 30°C) psychrophilic (48 hours at 20°C) and psychrotrophic (10 days at 7°C) counts on the surface and in the total were compared with the samples of sardine (Sardinella aurita) and shrimp (Litopenaeus setiferus). The results obtained with those three different incubation temperatures showed equivalent counts varying slightly among the samples and with the incubation temperatures of plates. The morphological and physiological characteristics were studied on 607 strains isolated from these samples. The predominance of Gram negative bacilli, possibly Pseudomonas, Achromobacter and Flavobacterium, occurred in the sardine samples at all three temperatures of incubation. In the shrimp samples there was a predominance of Gram negative cocci among the colony formed at the incubation temperatures of 30°C and 20°C, and of Gram negative bacilli among those formed at 7°C. Also, 55.8% of the strains were proteolytic and/or lipolytic types. It was found that only 29.3% of the microbes isolated at 30°C (mesophilic count) showed proteolytic and/or lipolytic properties at 7°C. Amongst those isolated at 20°C (psychrophilic count), 39.4% showed these properties at 7°C and those isolated at 7°C (psychrotrophic count) 49% of positive strains. These results show that the method for psychrotrophic count is nearly twice as accurate as the method for mesophilic count for the detection and enumeration of the bacteria implicated in spoilage of fish and marine products stored under refrigeration. The difference in accuracy between the method of psychrophilic count and psychrotrophic count was about 20% in favor of the last technique.

I. INTRODUÇÃO

Os peixes, moluscos e crustáceos vivem em meio ambiente que apresenta temperatura entre 15º a 20ºC e a microflora natural destes animais é capaz de se desenvolver nesta faixa de temperatura. Assim na caracterização do comportamento destes microrganismos em relação a temperatura ótima de crescimento é empregada a incubação a temperatura nessa faixa embora a maioria das espécies estudadas revele frequentes crescimentos abaixo de 15ºC e acima de 20ºC. Estes são conhecidos com o nome de psicrófilos.

Vários foram os autores que conduziram seus experimentos na análise da incidência de bactérias psicrófilas e o significado do seu número na conservação de produtos marinhos (15, 45, 59). Em todos esses trabalhos, a incubação foi feita a 20ºC por cerca de 2 - 3 dias para a sua contagem. A maioria das bactérias deste grupo pertence aos gêneros Pseudomonas e Achromobacter. Entretanto, verificou-se que a população de bactérias psicrófilas determinada pelo método acima não representava a contagem de bactérias, que são realmente responsáveis pela deterioração dos produtos marinhos conservados a 1 - 2ºC. As contagens de Pseudomonas putrefaciens e de Pseudomonas fluorescens aumentam mais rápida e proporcionalmente ao total das bactérias psicrófilas. Essas espécies são as responsáveis pela deterioração dos produtos conservados no gelo.

Por outro lado, verificou-se que a contagem de bactérias psicrotróficas no leite feita incubando-se a 7ºC por 10 dias (método padrão para psicrotróficos no leite) era adequada para detectar e enumerar as bactérias responsáveis pela sua deterioração na geladeira (3).

Embora o termo psicrotrófico e a sua definição, bem como o seu uso sejam bastante difundidos em laticínios, na conservação de produtos marinhos são praticamente ignorados. Daí, um dos objetivos deste

trabalho foi verificar se esse método é adequado para contagem de bactérias responsáveis pela deterioração do peixe e camarão, quando conservados no gelo.

Sabe-se, também, que no filé de peixe deteriorado após armazenamento a 29C por 10 dias, os microrganismos Pseudomonas putrefaciens e Pseudomonas fluorescens representam cerca de 40% da população presente (15). Entretanto, pouco se sabe a respeito das outras espécies de bactérias que representam o restante dos 60%. Por essa razão, achou-se oportuno verificar o comportamento das espécies que estão envolvidas no processo de deterioração, dentre aquelas que constituem a flora microbiana do pescado no nosso meio.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A. Microflora Natural do Pescado

A microflora do pescado varia em função do grau de contaminação das águas que constituem seu "habitat". Exceto nas regiões costeiras, que podem apresentar, por vêzes, uma contaminação fecal acentuada, a água do mar apresenta-se normalmente livre de bactérias patogênicas ao homem, particularmente aquelas de origem intestinal. Nestas condições, exceto pela presença eventual de Clostridium botulinum e de Vibrio parahaemolyticus, a microflora natural do pescado não contém bactérias de importância a saúde pública (48).

A temperatura da água tem grande influência na microflora natural do pescado. Assim, em regiões tropicais, em que a temperatura da água frequentemente ultrapassa 20°C, há a predominância das mesófilas, ao passo que, em regiões de clima temperado ou frio, onde a temperatura da água raramente excede a 15°C, há uma grande predominância de bactérias psicrófilas ou psicrotróficas (26, 46).

Nos peixes, os microrganismos estão em abundância no muco superficial, nas guelras e no trato intestinal (40). Peixes vivos e sadios, apresentam-se normalmente livres de microrganismos nos tecidos musculares internos. No muco superficial, as bactérias mais frequentes são as dos gêneros Pseudomonas, Achromobacter, Micrococcus, Flavobacterium, Corynebacterium, Sarcina, Serratia, Vibrio e Bacillus (26). Liston (47), estudando a microflora bacteriana de peixes no Pacífico Norte, constatou a predominância de Pseudomonas e Vibrio (66,3%), além de Achromobacter (6,5%), Flavobacterium (10,9%), Cytophaga (2,2%) e Corynebacterium (5,4%).

Colwell e Liston (19) isolaram 220 culturas a partir de invertebrados marinhos, observando a predominância de bactérias em bastonetes

Gram negativos dos gêneros Pseudomonas, Achromobacter e Flavobacterium. Newman e colab. (54) isolaram 433 culturas do trato intestinal de 33 amostras de peixe azul (Pomatomus saltatrix) no litoral de Long Island, EUA. Observaram a predominância de Vibrio, Pseudomonas, enterobactérias e Achromobacter, seguido, em menor proporção, de leveduras, Flavobacterium, Micrococcus e Bacillus.

No trato intestinal de peixes, a microflora não apresentou grandes variações, exceto pela presença de Clostridium, Escherichia e outras Enterobacteriaceae (28). Fato importante foi observado por Garcia e Zaleski (27) que, a partir do décimo dia de armazenamento a 1 - 29C, as bactérias intestinais Gram negativas em bacalhau apresentaram uma tendência para uma flora monogênica de Vibrio ou Achromobacter.

A microflora natural de crustáceos (camarão, lagosta, etc.) é semelhante à dos peixes, com predominância de bactérias em bastonetes Gram negativas dos gêneros Achromobacter, Pseudomonas, Flavobacterium e Alcaligenes (26). Vanderzant e colab. (72) estudaram a microflora do camarão (Penaeus azteus) observando a predominância de bactérias corineformes e Vibrio.

B. Deterioração do Pescado durante o Armazenamento

O teor proteico em peixes e moluscos varia de 3 a 18%, sendo a miosina, actina e albumina as principais proteínas presentes. As duas primeiras se combinam originando a actomiosina nos músculos (10).

Segundo Betty e Gibbons (6), as transformações observadas no pescado são devidas à degradação autolítica, metabolismo dos microrganismos presentes ou a ação simultânea desses dois agentes. Em consequência, ocorre a hidrólise de proteínas, resultando em substâncias de baixo peso molecular, como aminas, mercaptanas, indol, ácidos voláteis, nitrogênio etc. Reay e Shewan (57), Hess (34) e Tarr (66) demonstraram que a deterioração no peixe é causada por processos complexos de

autólise, oxidação e atividade bacteriana, que se desencadeiam a partir da captura, morte e posterior armazenamento a baixa temperatura. De acordo com Watanabe (69), as transformações dão origem a odores desagradáveis, flacidez e coloração alterada da carne, aparecimento de um muco com viscosidade elevada. Tais transformações variam em função da espécie do peixe, microflora própria ou contaminante, tempo e temperatura de armazenamento, uso e tipo de preservativo no pescado em estado fresco.

Adams e colab. (1), estudando a microflora de peixes deteriorados, constataram a predominância de Pseudomonas e Achromobacter, seguida de Aeromonas, Aerobacter, Vibrio e Acinetobacter como Gram negativas, ao lado de Micrococcus e Bacillus como Gram positivas, formando o grupo de psicrófilas ou propriamente psicrotróficas. Shewan e colab. (61) observaram a presença de uma microflora semelhante em peixes deteriorados, constatando um aumento progressivo da microflora acompanhando o processo de deterioração.

Segundo Burgos e Cutting (10), os peixes frescos apresentam teor de trimetilamina (TMA) normalmente baixo, aumentando progressivamente durante a deterioração, devido à redução do óxido de trimetilamina (OTMA) presente. Betty e Gibbons (6) detectaram a trimetilamina em músculo de bacalhau armazenado às temperaturas de 25º, 10º e 0,5º C, durante o período que vai do "pre-rigor" ao aparecimento dos primeiros odores estranhos. Os autores constataram que, por ocasião do aparecimento de alterações no aroma, o teor de TMA atingia 6mg por 100g de amostra. Labrie e colab. (41), estudando o efeito de NaCl em extrato de músculo de bacalhau, armazenado em temperaturas decrescentes de 21º a 10º C, observaram que, quando a população bacteriana alcançava 10 a 20 milhões de microrganismos por mililitro de extrato (10% de NaCl) originava-se a redução do OTMA a TMA.

Dyer e colab. (22) estudaram os mecanismos de difusão das células bacterianas em bacalhau armazenado em gelo triturado. Observaram que

no início do processo de deterioração, a microflora ficava restrita ao trato intestinal. Em fases mais adiantadas os contaminantes atingiam os músculos havendo um conseqüente aumento no teor de TMA, proveniente da redução do OTMA, seguido de difusão através da parede intestinal.

Laycock e Regier (42) trabalhando com filês de bacalhau armazenados a 39C, efetuaram isolamento de psicrófilos, correlacionando com a produção de TMA à presença de Pseudomonas putrefaciens e de bactérias corineformes. Em extrato de bacalhau, usando tampões de pH 3,4 a 6,0, Collins e colab. (17) verificaram que na deterioração da amostra ocorreram duas mudanças resultantes da ação bacteriana: a primeira, redução do OTMA a TMA acompanhada do decréscimo da capacidade do tampão e, a segunda, um aumento desta mesma capacidade devido a hidrólise de proteínas.

Durante o processo de deterioração inúmeras alterações são observadas nas características sensoriais do pescado, principalmente aroma. Castell e Greenough (13) trabalhando com filê de bacalhau congelado, observaram que, devido à ação de Pseudomonas fragi sobre proteínas parcialmente hidrolizadas, resultavam produtos como aminoácidos, H₂S etc. que produziam odores de vegetais fermentados (alho, cebola, etc). Castell e Greenough (14), trabalhando com bacalhau, verificaram que muitos dos odores característicos de deterioração do pescado podiam ser reproduzidos pela inoculação, em filês estéreis, de culturas puras de Pseudomonas e Achromobacter.

Segundo Liston (46), a deterioração de produtos marinhos é principalmente causada pelos psicrotróficos Pseudomonas e possivelmente Achromobacter. As Pseudomonas participam na desaminação oxidativa de aminoácidos e redução do OTMA.

Em peixes frescos, esses microrganismos têm grande influência na ativação e produção de enzimas, principalmente das proteases e lipases.

resultando num aumento em bases voláteis e ácidos graxos. Quando a deterioração apresenta-se em elevado grau no pescado, a microflora natural é acrescida de outras bactérias, normalmente por contaminação, que, além de utilizarem as proteínas parcial ou totalmente hidrolizadas, utilizam, também, componentes nitrogenados não proteicos (NPN), dando origem a compostos com aromas de enxofre e de vegetais fermentados.

C. Métodos Microbiológicos no Exame de Pescado

As características da microflora natural do pescado e as condições de armazenamento em baixas temperaturas, empregadas após a captura, limitam a microflora bacteriana capaz de causar a deterioração. Os estudos conduzidos por vários autores têm demonstrado que particularmente bactérias das famílias Pseudomonadaceae e Achromobacteriaceae, além de outros grupos (Acinetobacter e coliformes) estão envolvidas no processo. Por isso, no exame microbiológico do pescado, métodos adequados devem ser desenvolvidos, visando caracterizar a presença das bactérias desses gêneros, considerando-se principalmente as características de temperaturas e pH máximas, mínimas e ótimas de crescimento e exigências nutricionais.

A maioria dos livros de microbiologia sugere 30°C como temperatura máxima de crescimento para psicrofílas, porém os trabalhos de Ingraham (39) e Seleen e Stark (58) mostraram crescimento desse grupo de bactérias nas temperaturas de 40° e 42°C. Já Bedford (7), estudando bactérias psicrofílas isoladas de produtos marinhos, observou crescimento até 45°C.

A temperatura mínima de crescimento de psicrofílas caracteriza a mínima para crescimento de bactérias. As muitas citações e análises em peixes mostram essa temperatura mínima variando de -10° a 5°C. Hess (36) estudando Pseudomonas fluorescens, Flavobacterium deceduosum e Bacillus vulgatus observou crescimento na faixa de -10° a -6,5°C.

Castell e colab. (12) constataram crescimento de Pseudomonas perolens à temperatura de 0°C, isoladas de filés de camarão. A temperatura de 5°C foi usada por Lerke e colab. (44) nas análises de extrato de filés de peixe Paraphrys vetullus, observando bom crescimento de Flavobacterium, Pseudomonas e Achromobacter, comprovando também que os dois primeiros gêneros foram responsáveis por 29% da deterioração dos filés. Colwell e Liston (18) confirmaram crescimento a 0°C, com predominância de Pseudomonas, Víbric, Achromobacter e Flavobacterium nas seguintes espécies de peixes Acanturus tríostegus, Caranx ferdau, Epinephalus merri, Siganus rostrat e Sphaena belleri.

A temperatura ótima de crescimento pode ser determinada em relação a velocidade de multiplicação atingida por uma população bacteriana ou a condição que se obtém o número máximo de células de uma determinada cultura. A temperatura ótima para produzir populações máximas são usualmente baixas, em comparação com as usadas para a velocidade ótima de multiplicação bacteriana (25, 29, 36) e em muitas bactérias essas temperaturas eram abaixo de 20°C. O tempo necessário para uma cultura atingir uma população máxima a baixa temperatura é longo e pequena é a variação de populações máximas obtidas a várias temperaturas. Green e Jazeski (29) observaram, em três culturas de psicrófilas um mínimo de 1.347 horas para verificar o aparecimento de colônias a 5°C e a população máxima atingida nesta temperatura não ultrapassou o quíntuplo da população observada a 20°C. Hess (36), estudando Pseudomonas fluorescens isoladas de filés de bacalhau, demonstrou que essas bactérias necessitavam de 29 dias para produzir a população máxima a 5°C, a qual atingiu o dobro da população máxima produzida a 20°C. O uso de ambos os critérios de temperatura ótima no estudo de psicrófilas, torna-se impraticável na rotina e enumeração dessas bactérias.

A maioria dos autores usaram 20°C, como temperatura ótima de crescimento nas suas análises em pescado. Dentre eles destacam-se: Gibbons (28), Shaw e Shewan (59), Debevere e Voetts (20), Herbert e Haight

(32), Hoff e colab. (37), Dyar e colab. (22), Hess (35) e Newman e colab. (54). A temperatura de 25°C foi usada por Castell (11), Debevere e Voetts (20), Liuzzo e colab. (49) e 28°C por Vanderzant e colab. (72).

Na padronização do método para determinação de psicrófilas, os microbiólogos do leite foram os que mais contribuíram. Alford (2) mostrou que a maioria dos bacteriólogos do leite usaram, por muito tempo como método padrão, a incubação a 5°C por 7 dias, tendo o "Count agar medium" como "standard". Observou, também, que 28 investigadores de outros produtos alimentícios usaram 11 diferentes meios de cultura e 10 diferentes períodos de incubação. O "Standard Method for the Examination of Dairy Products" (3) indica o período de incubação a 7°C + 1 por 10 dias, para psicrotróficas. Os métodos, em síntese, podem ser divididos em dois tipos quanto a períodos de incubação: os restritos, propostos para baixas temperaturas e tempos curtos de incubação e os pouco seletivos, para altas temperaturas por longos tempos.

Outros métodos para determinação de bactérias psicrotróficas e psicrófilas baseiaram-se nos meios de culturas seletivos, por acharem que a determinação do número de bactérias psicrotróficas pelo método padrão não ser adequado para análise rotineira, devido ao período de incubação por 10 dias ser excessivamente longo (3). Levando-se em consideração, que a maioria dos microrganismos componentes da flora psicrófila ou psicrotrófica é predominantemente Gram negativa, aventaram a possibilidade do uso de meios de cultura inibidores de bactérias Gram positivas, possibilitando o crescimento mais rápido das Gram negativas a temperaturas mais elevadas (30°C a 20°C por 2 a 3 dias). Elliker (24) sugeriu o agar "Violet-red bile" (VRB) com período de incubação a 30°C por 48 horas. Druce e colab. (21) mostraram que as colônias de Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium e Achromobacter eram usualmente brancas e cresciam bem a 30°C por 20 a 24 horas de incubação. Collins (16) demonstrou, com sucesso, o uso

desse meio de cultura a 25°C por 48 horas na enumeração de Pseudomonas e algumas espécies de Bacillus. Cyllenberg e colab. (30) adicionaram cristal violeta a agar-lactato de amônio, aumentando a seletividade para Pseudomonas, Achromobacter e bactérias coli-aerógenas com períodos de incubação a 30°C por 5 dias e 25°C por 3 dias. O número de colônias formado neste último período de incubação foi bem menor que no método padrão para psicrotróficas no leite cru ou pasteurizado, sendo verificado o crescimento de algumas bactérias Gram positivas e inibição de algumas Gram negativas.

Nos psicrófilos estão incluídos o grupo de microrganismos que produzem reação alcalina em "Litmus milk" e apresentam, na sua maioria, atividades proteolíticas, provocando um aumento de alcalinidade. São sensíveis a pH ácido (70). Segundo Bonner e Harman (8) a velocidade de crescimento de todos os psicrófilos isolados de queijos foi reduzida, quando submetidos a pH 5,4. Long e Hammer (50) observaram que Pseudomonas putrefaciens não crescia a pH 5,3 ou mais ácido. Os estudos efetuados por Parker e colab. (55, 56) sobre Pseudomonas fragi, Alcaligenes metalcaligenes e Pseudomonas viscosa mostraram que a pH 5,0 houve uma efetiva inibição nas duas primeiras espécies e a última desenvolveu vagarosamente a pH 4,1. Desta maneira o crescimento de psicrófilas é progressivamente retardado na faixa de pH de 4,5 a 5,4. Nas análises do pescado a maioria dos microbiólogos tem usado uma faixa de pH que varia de 6,8 a 7,3 como ótima para crescimento de psicrófilos ou psicrotróficos (28, 37, 45, 59).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

A. Amostras

Foram examinadas 15 amostras de sardinha (Sardinella aurita) e 4 de camarão sete barbas (Xiphopenaeus kroyeri). A coleta dessas amostras foi efetuada nos carros transportadores, vindas diretamente de Santos, S.P., e antes do descarregamento em frigorífico na cidade de Campinas, S.P. As amostras foram colocadas em sacos plásticos (polietileno), medindo 25cm x 15cm e acondicionadas numa caixa de "Isopor", contendo gelo moído, transportando-se imediatamente para o laboratório. O espaço de tempo decorrido entre a coleta de amostra e a sementeira em placas nunca ultrapassou o limite de 12 horas.

B. Determinação de Microrganismos na Superfície das Amostras

1. As amostras intactas (sardinha e camarão) foram colocadas em jarros com tampa rosqueável, previamente esterilizados (121°C por 30 minutos) e tarados. A seguir, adicionou-se caldo nutriente com NaCl 0,5% (45) de forma a obter-se diluições iniciais de 1:5 ou 1:10 (P/V). As amostras assim preparadas, foram submetidas à agitação (1 - 2 minutos) de forma a deslocar os microrganismos da superfície. As diluições posteriores foram efetuadas com o material da fase líquida do frasco.

A partir de diferentes diluições, foram retirados 0,6 ml e sementeiras nas superfícies de placas contendo Agar Marinho solidificado (0,1 ml por placa). A dispersão do inóculo sobre a superfície do meio de cultura foi feita com o auxílio de um espalhador de Drigalski. As placas foram incubadas a 7°C por 10 dias, e 20°C e 30°C por 48 horas. Para cada temperatura de incubação foram utilizadas sementeiras em duplicata. As contagens foram efetuadas utilizando-se um contador de colônias New Brunswick, modelo C 100.

C. Determinação de Microorganismos no Total da Amostra

A contagem de microorganismos no total de amostras foi efetuada a partir dos frascos contendo amostras para contagem superficial (45). As amostras foram submetidas a uma desintegração em liquidificador (Walta) durante 1 - 2 minutos e em seguida, mantidas em repouso por 5 - 10 minutos para a sedimentação das partículas maiores. O líquido sobrenadante foi utilizado no preparo das diluições posteriores. As contagens foram efetuadas em Agar Marinho nas temperaturas de 7º, 20º e 30ºC de forma idêntica à empregada nas amostras da superfície.

D. Constatação de Microorganismos com Atividades Proteolítica e Lipolítica.

A avaliação do comportamento das bactérias com relação às atividades proteolíticas e lipolíticas foi feita utilizando-se a técnica da réplica de Lederberg e Lederberg (43). As matrizes foram selecionadas dentre as placas de diferentes diluições e incubadas nas temperaturas de 7º, 20º e 30ºC. Para isso foram escolhidas as placas com número de colônias nunca superior a 15. Para cada temperatura de incubação foi selecionada uma placa de amostra de superfície e uma no total que satisfizessem as exigências acima.

A transferência pela técnica de réplica foi feita, utilizando-se cilindros de madeira (10 cm de diâmetro x 10 cm de altura) recobertos por pedaços de veludo esterilizados (25 cm x 25 cm) fixos por meio de fios elásticos. De cada placa matriz de Agar Marinho, foram feitas transferências para 9 outras placas, visando as seguintes observações:

1. Atividade proteolítica nas temperaturas de 7º, 20º e 30ºC, utilizando-se placas contendo uma camada inferior de leite desnatado solidificado e outra superior de Agar Marinho (64).

2. Atividade lipolítica nas mesmas temperaturas, usando-se meio "Tween Agar" segundo Sierra (63).
3. Transferência final para novas placas de Agar Marinho, visando assegurar a eficiência do processo de réplica.

A avaliação da maior ou menor atividade de microrganismos foi efetuada medindo-se o diâmetro do halo (em mm) de atividade proteolítica (halo transparente no meio opaco, devido a hidrólise da caseína) ou atividade lipolítica (halo opaco no meio claro, devido a formação de sais de cálcio a partir dos ácidos graxos livres). As atividades foram assim consideradas:

- (-) = reação negativa
- (+) = halo de 1 a 5 mm
- (++) = halo de 6 a 10 mm
- (+++)= halo maior que 10 mm

E. Características Morfológicas e Fisiológicas de Culturas Isoladas

A partir das placas matrizes nas diferentes temperaturas de incubação, foram isoladas um total de 607 cepas, que, após prévia observação das atividades proteolítica e lipolítica pela técnica de réplica, foram incubadas em tubos de Agar Nutriente com 0,5% NaCl e mantidas a 79C para caracterização.

Morfologia - O exame foi feito pelo preparo de lâminas com coloração de Gram (3), a partir de culturas mantidas em Agar Nutriente com 0,5 % NaCl e incubadas à 309C por 24 horas.

Pigmentos solúveis - Observados pelo crescimento nos meios de King A e B (23) seguido do exame da cultura no meio King B sob luz ultra violeta (Ultra Violet Products Inc., USA) para detectar a presença de pigmentos fluorescentes.

Motilidade - Foi observada pela picagem de culturas em tubos (16mm x 150mm) contendo Agar Marinho semisólido (0,3% agar), seguido de incubação a 30°C durante 24 - 48 horas. As culturas imóveis apresentaram crescimento restrito à região da picagem, ao passo que as móveis se difundiam pelo meio.

Oxidase - O teste foi conduzido fazendo-se um esfregaço da cultura em papel de filtro impregnado com solução de dihidroclorato tetrametil-p-fenilendiamina (Kovacs, 1956), observando-se a reação durante 15 segundos. Culturas oxidase positivas, tornam-se violeta escura, ao passo que as negativas não se alteram.

IV. RESULTADOS

Nas tabelas seguintes, (tabela de I a XVI) apresentam-se os resultados obtidos nos estudos realizados com 15 amostras de sardinha (Sardinella aurita) e 4 de camarão sete barbas (Xiphopenaeus kroyeri). Estão apresentadas as comparações entre os métodos de contagens comumente usados na pesquisa de bactérias psicrófilas (20°C por 48 horas) e mesófilas (30°C por 48 horas) com o método padrão de análise para psicrotróficas no leite (7°C por 10 dias), com relação a contagens totais, morfologia desses grupos de bactérias da superfície e no total das amostras.

As contagens de bactérias por grama do produto determinadas por incubação às temperaturas de 30°C, 20°C e 7°C estão apresentadas na tabela I. A maior média ($1,0 \times 10^7$) e a amostra de maior número de bactérias ($1,5 \times 10^8$) da superfície das amostras de sardinha foram obtidas com incubação à 20°C. Já, em camarão, a maior média ($6,0 \times 10^6$) verificou-se a 7°C e a amostra de maior número de bactérias ($7,8 \times 10^6$) foi a 20°C. No total das amostras de sardinha, a maior média ($3,0 \times 10^7$) e a amostra de maior número de bactérias ($3,9 \times 10^8$) foram obtidas a 20°C e nas de camarão, a 7°C, sendo os valores respectivos de $1,1 \times 10^7$ e $2,5 \times 10^7$.

A. Características Morfológicas e Fisiológicas das Bactérias Isoladas

O número total de bactérias isoladas foi de 607, distribuído em 131, 103 e 95 culturas da superfície para 79, 109 e 90 no total das amostras de sardinha e camarão, respectivamente nas temperaturas de incubação de 30°C, 20°C e 7°C (tabelas II a IV). As bactérias isoladas da superfície de amostras (sardinha e camarão) às temperaturas de incubação de 30°C, 20°C e 7°C apresentaram, respectivamente, 58,8; 45,6 e 81% de bactérias em bastonetes. No total das amostras essas

porcentagens foram 53,1; 55,1 e 61,1%. O restante era em cocos.

As bactérias em bastonetes e Gram negativos foram encontradas em maior porcentagem (44,3; 36,9 e 78,9% e 39,2; 51,4 e 58,9%, respectivamente, às amostras da superfície e no total incubadas às temperaturas de 30°C, 20°C e 7°C) e os bastonetes Gram positivos em menor porcentagem (14,5; 8,7 e 2,1% e 13,9; 3,7 e 2,2% na mesma ordem anterior). Dentre as 179, 173 e 142 cepas isoladas das amostras de sardinha, respectivamente às temperaturas de 30°C, 20°C e 7°C, os valores em porcentagens 45,3% (81 cepas); 48,5% (84 cepas) e 70,4% (104 cepas) foram de bactérias em bastonetes Gram negativos para 12,8% (23 cepas); 20,2% (35 cepas) e 15,5% (22 cepas) de cocos Gram negativos. Já, em camarão, das 31, 39 e 43 cepas isoladas na mesma ordem de temperaturas citada acima, estes valores foram de 25,8% (8 cepas); 25,6% (10 cepas) e 55,8% (24 cepas) de bactérias em bastonetes Gram negativos, para 67,7% (21 cepas); 71,7% (28 cepas) e 44,1% (19 cepas) de bactérias em cocos Gram negativos.

Na incubação a 30°C, a proporção de bactérias em bastonetes Gram positivos para aquelas em bastonetes Gram negativos foi superior a 1:3 (na superfície e no total). Já, com a incubação a 20°C essa proporção decresceu a 1:4 nas amostras da superfície e de 1:13 no total. Na incubação a 7°C, apenas duas colônias eram de bactérias em bastonetes Gram positivos, comparadas com 75 e 53 de bactérias em bastonetes Gram negativos, respectivamente, às amostras da superfície e no total.

A presença de colônias de bactérias em cocos Gram positivos, também, decresceu com o decréscimo da temperatura de incubação. Enquanto que, a temperatura de incubação de 30°C, cerca de 22% das colônias eram de bactérias em cocos Gram positivos, a 20°C esse valor era de 20% e a 7°C, de apenas 7,4 e 5,5%, respectivamente, às amostras da superfície e no total.

Com relação as bactérias em cocos Gram negativos, a variação da porcentagem foi irregular com respeito a temperatura de incubação. Nas amostras da superfície, sua porcentagem foi de 18,3; 34,0 e 11,6% respectivamente as temperaturas de 30°C, 20°C e 7°C. Nas amostras no total, essas porcentagens foram 25,3; 25,7 e 33,3% na mesma ordem de temperatura de incubação.

As tabelas de V a XIII mostram os resultados dos testes de atividades lipolítica e proteolítica das bactérias isoladas a 30°C, 20°C e 7°C. Das 210 cepas de bactérias isoladas a 30°C, 36 apresentaram apenas atividade proteolítica, 23 apenas atividade lipolítica e 67 as atividades lipolítica e proteolítica. Dessas 67 cepas com ambas as atividades, 53 eram bactérias em bastonetes Gram negativos (79%) e do restante 10 cepas eram em bastonetes Gram positivos e 4 em cocos Gram positivos. Nenhuma das bactérias em cocos Gram negativos apresentou atividade proteolítica (tabela II). Cerca de 40% das cepas (84 cepas) não apresentaram nenhuma das atividades acima.

Na maioria das cepas, a atividade proteolítica era intensa a 30°C e moderada a 20°C. Somente as bactérias em bastonetes Gram negativos e uma em Gram positivo apresentaram atividade proteolítica a 7°C (tabela V). Fato semelhante ocorreu também com as cepas possuidoras de atividade lipolítica. Neste caso todas e somente as bactérias em bastonetes Gram negativos apresentaram atividades lipolíticas a 7°C (tabela VI).

Das cepas com atividades proteolítica e lipolítica, essas atividades foram intensas apenas à temperatura de 30°C e fracas a 20°C na maioria dos casos, em se tratando de bactérias em cocos ou bastonetes Gram positivos. Algumas cepas em bastonetes Gram positivos não cresceram a 7°C. As bactérias em cocos Gram positivas, embora tenham formado colônias, não apresentaram nem atividade proteolítica e nem lipolítica. Por outro lado, a maioria das cepas em bastonetes Gram negativos apresentou atividades lipolítica e proteolítica nas três

temperaturas de incubação, com ligeira tendência de ter maior atividade lipolítica a baixas temperaturas e maior atividade proteolítica a altas temperaturas (tabela VII).

Das 212 cepas de bactérias isoladas a 20°C, 23 apresentaram apenas a atividade proteolítica, 25 apenas a atividade lipolítica e 72 as atividades lipolítica e proteolítica. Cerca de 49% (104 cepas) não apresentaram nem a atividade proteolítica e nem a atividade lipolítica (tabela III). Exceto as bactérias em bastonetes Gram negativos e 3 das 11 cepas de bactérias em cocos Gram positivos que apresentaram igual atividade nas três temperaturas, a atividade proteolítica foi, em geral, intensa a 30°C, moderada a 20°C e nula a 7°C (tabela VIII). A atividade lipolítica foi, no geral, mais intensa a baixas temperaturas entre as bactérias em cocos e bastonetes Gram negativos e o inverso nos cocos e bastonetes Gram positivos (tabela IX). Das 72 cepas com atividades proteolítica e lipolítica apenas 2 eram em cocos Gram positivos e uma em bastonete Gram positivo. Como no caso das bactérias isoladas a 30°C, as bactérias Gram positivas apresentaram as atividades apenas às temperaturas de 30°C e 20°C. As bactérias em bastonetes Gram negativos apresentaram atividades proteolítica e lipolítica mais intensas a 7°C do que a 20°C ou 30°C (tabela X).

Dentre as 185 cepas isoladas a 7°C, 14 apresentaram apenas a atividade de proteolítica, 18 lipolítica e 65 as atividades proteolítica e lipolítica. Cerca de 43% (88 cepas) não apresentaram nenhuma dessas atividades (tabela IV). As bactérias em bastonetes (G^+ ou G^-) possuidoras de atividade proteolítica, apresentaram a mesma intensidade em quaisquer das temperaturas testadas (30°C, 20°C e 7°C). As bactérias em cocos Gram positivos apresentaram atividades mais intensas a altas temperaturas (tabela XI). No geral, as bactérias com atividade lipolítica apresentaram maior intensidade quando incubadas a baixas temperaturas (tabela XII). O mesmo ocorreu com as bactérias possuidoras de atividades proteolítica e lipolítica (tabela XIII).

As tabelas de XIV a XVI mostram os resultados dos estudos sobre motilidade e produção de pigmento, oxidase e fluorescência das cepas isoladas às temperaturas de 30°C, 20°C e 7°C. Tanto as bactérias em bastonetes Gram positivos como as Gram negativos apresentaram a motilidade na sua maioria. Das bactérias isoladas a 30°C, somente 4 cepas das 30 em bastonetes Gram positivos apresentaram pigmentos. Entre as bactérias em cocos Gram positivos, 17 cepas das 47 examinadas apresentaram pigmentações (tabela XIV). Das bactérias em bastonetes Gram positivos ou cocos (G^+ ou G^-) isoladas a 20°C ou a 7°C não foram observadas cepas com pigmentação, exceto uma cepa de bactéria em cocos isolada a 20°C (tabelas XV e XVI). Dentro as bactérias em bastonetes Gram negativos, cerca de 67% das cepas isoladas a 30°C, 65% daquelas isoladas a 20°C e 51% das isoladas a 7°C apresentaram pigmentações.

Reação de oxidase positiva foi observada em 40% das cepas de bactérias em bastonetes Gram positivos e na maioria dos bastonetes e cocos Gram negativos. Nenhuma bactéria em cocos Gram positivos apresentou oxidase. A fluorescência foi observada em apenas 12 cepas de bactérias em bastonetes Gram negativos entre as 311 examinadas. Não foi observada a fluorescência em nenhuma outra classe morfológica de bactérias.

TABELA I - Variações das contagens em número de bactérias por grama em 19 amostras : 15 sardinhas (Sardinella aurita) e 4 camarões sete barbas (Xiphopenaeus kroyeri) em 3 temperaturas de incubação.

Amostras	Temperaturas de incubação								
	7°C			20°C			30°C		
	mínima	máxima	média	mínima	máxima	média	mínima	máxima	média
Sardinha (superfície)	$3,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^8$	$8,8 \times 10^6$	$3,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$3,5 \times 10^4$	$5,1 \times 10^7$	$5,3 \times 10^6$
Sardinha (no total)	$5,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$	$8,0 \times 10^4$	$3,9 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$
Camarão (superfície)	$2,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$
Camarão (no total)	$4,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$4,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$8,3 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$6,7 \times 10^6$

TABELA II - Características das bactérias de sardinha e camarão, determinadas pela incubação de 30°C por 48 horas.

Morfologia	Gram	*	Nº de colônias examinadas	%	+P+L		+P-L		+L-P		-L-P	
					Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Bastonetes	G ⁺	S	19	14,5	6	4,6	5	3,8	1	0,8	7	5,3
	G ⁺	T	11	13,9	4	5,0	1	1,3	1	1,3	5	6,3
Bastonetes	G ⁻	S	58	44,3	38	29,0	5	3,8	3	2,3	12	9,2
	G ⁻	T	31	39,2	15	19,0	8	10,1	3	3,8	5	6,3
Cocos	G ⁺	S	30	22,9	4	3,0	9	6,9	2	1,6	15	11,4
	G ⁺	T	17	21,5	-	-	8	10,1	2	2,5	7	8,9
Cocos	G ⁻	S	24	18,3	-	-	-	-	5	3,8	19	14,5
	G ⁻	T	20	25,3	-	-	-	-	6	7,6	14	17,7
TOTAIS		S	131		48	36,6	19	14,5	11	8,4	53	40,4
		T	79		19	24,0	17	21,5	12	15,2	51	39,2

- NOTAS (*) (S) Bactérias da superfície da amostra
 (T) Bactérias no total da amostra
 (N) Número de colônias
 (+P+L) Bactérias com atividades proteolíticas e lipolíticas
 (+P-L) Bactérias proteolíticas sem atividades lipolíticas
 (+L-P) Bactérias lipolíticas sem atividades proteolíticas
 (-L-P) Bactérias sem atividades lipolíticas e proteolíticas

TABELA III - Características das bactérias de sardinha e camarão, de terminadas pela incubação de 20°C por 48 horas.

Morfologia	Gram	*	Nº de colônias examinadas	%	+P+L		+P-L		+L-P		-L-P	
					Nº	%	N	%	N	%	N	%
Bastonetes	G ⁺	S	9	8,7	1	1,0	4	3,9	-	-	4	3,9
	G ⁺	T	4	3,7	-	-	-	-	4	3,7	-	-
Bastonetes	G ⁻	S	38	36,9	23	22,3	5	4,8	-	-	10	9,7
	G ⁻	T	56	51,4	34	31,2	2	1,8	4	3,7	16	14,7
Cocos	G ⁺	S	21	20,4	-	-	1	1,0	1	1,0	19	18,4
	G ⁺	T	21	19,3	2	2,0	11	10,1	-	-	8	7,3
Cocos	G ⁻	S	35	34,0	-	-	-	-	11	10,7	24	23,3
	G ⁻	T	28	25,7	-	-	-	-	5	4,6	23	21,1
Totais		S	103		24	23,3	10	9,7	12	11,6	57	55,3
		T	109		36	33,3	13	11,9	13	11,9	47	43,1

- NOTAS (*)
- (S) Bactérias da superfície da amostra
 - (T) Bactérias no total da amostra
 - (N) Número de colônias
 - (+P+L) Bactérias com atividades proteolíticas e lipolíticas
 - (+P-L) Bactérias proteolíticas sem atividades lipolíticas
 - (+L-P) Bactérias lipolíticas sem atividades proteolíticas
 - (-L-P) Bactérias sem atividades lipolíticas e proteolíticas

TABELA IV - Características das bactérias de sardinha e camarão, determinadas pela incubação de 7°C por 10 dias.

Morfologia	Gram	*	Nº de colônias examinadas	+P+L		+P-L		+L-P		-L-P		
				N	%	N	%	N	%	N	%	
Bastonetes	G ⁺	S	2	2,1	-	-	1	1,0	-	-	1	1,0
	G ⁺	T	2	2,2	1	1,1	-	-	-	-	1	1,1
Bastonetes	G ⁻	S	75	78,9	40	42,1	5	5,3	4	4,2	26	27,4
	G ⁻	T	53	58,9	24	26,7	5	5,5	2	2,2	22	24,4
Cocos	G ⁺	S	7	7,4	-	-	1	1,0	-	-	6	6,3
	G ⁺	T	5	5,5	-	-	2	2,2	-	-	3	3,3
Cocos	G ⁻	S	11	11,6	-	-	-	-	3	3,1	8	8,4
	G ⁻	T	30	33,3	-	-	-	-	9	10,0	21	23,3
Totais		S	95		40	42,1	7	7,4	7	7,4	41	43,1
		T	90		25	27,8	7	7,8	11	12,2	47	52,2

Notas: (*) (S) Bactérias da superfície da amostra
 (T) Bactérias no total da amostra
 (N) Número de colônias
 (+P+L) Bactérias com atividades proteolíticas e lipolíticas
 (+P-L) Bactérias proteolíticas sem atividades lipolíticas
 (+L-P) Bactérias lipolíticas sem atividades proteolíticas
 (-L-P) Bactérias sem atividades lipolíticas e proteolíticas

TABELA V - Variação da atividade proteolítica das bactérias isoladas a 30°C a diferentes temperaturas, determinada pelo diâmetro do halo formado em torno das colônias.

	Temperaturas de incubação		
	30°C	20°C	7°C
1. Bactérias da superfície da amostra			
a) Bastonetes Gram positivos (5 cepas)	+++	+	-
	+++	+++	-
	+++	+++	-
	+++	+	-
	+	+	+
b) Bastonetes Gram negativos (5 cepas)	++	++	++
	++	++	+
	+	+	++
	+	+	++
	+	+	++
c) Cocos Gram positivos (9 cepas)	+++	++	-
	+++	++	-
	+++	++	-
	+++	++	-
	+++	++	-
	+++	+	-
	+++	+	-
	++	+	-
	++	+	-
2. Bactérias no total da amostra			
a) Bastonetes Gram positivos (1 cepa)	+++	++	-
b) Bastonetes Gram negativos (8 cepas)	+++	+++	-
	+++	++	-
	++	-	-
	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+
	+	+	-
c) Cocos Gram positivos (8 cepas)	+++	++	-
	+++	++	-
	+++	+	-
	+++	+	-
	+++	-	-
	+++	-	-
	++	-	-
	+	+	-

Notas: (-) Reação negativa
 (+) Dimensão do halo 1 a 5mm
 (++) Dimensão do halo de 6 a 10mm
 (+++) Dimensão do halo maior que 10mm

TABELA VI - Variação da atividade lipolítica das bactérias isoladas a 30°C a diferentes temperaturas, determinada pelo diâmetro do halo formado em torno das colônias.

	Temperaturas de incubação		
	30°C	20°C	7°C
1. Bactérias da superfície da amostra			
a) Bastonetes Gram positivos (1 cepa)	+	-	-
b) Bastonetes Gram negativos (3 cepas)	++	+++	+++
	++	+++	+++
	+	++	+++
c) Cocos Gram positivos (2 cepas)	++	++	-
	++	-	-
d) Cocos Gram negativos (5 cepas)	++	+	-
	++	+	-
	+	+	-
	+	+	-
	+	-	-
2. Bactérias no total da amostra			
a) Bastonetes Gram positivos (1 cepa)	++	++	-
b) Bastonetes Gram negativos (3 cepas)	++	++	+++
	+	++	+++
	+	+	++
c) Cocos Gram positivos (2 cepas)	++	-	-
	+	-	-
d) Cocos Gram negativos (6 cepas)	++	++	-
	++	+	-
	+	+	-
	+	-	-
	+	-	-

NOTAS: (-) Reação negativa
 (+) Dimensão do halo de 1 a 5mm
 (++) Dimensão do halo de 6 a 10mm
 (+++) Dimensão do halo maior que 10mm

TABELA VII - continuação

	Atividade proteolítica			Atividade lipolítica		
	Temperaturas de incubação			Temperaturas de incubação		
	30°C	20°C	7°C	30°C	20°C	7°C
c) Cocos Gram positivos (4 cepas)	+++	++	-	+	-	-
	+++	+	-	+	-	-
	++	+	-	+	+	-
	+	-	-	+	+	-
2. Bactérias no total da amostra						
a) Bastonetes Gram positivos (4 cepas)	+++	+	-	++	-	SC
	+++	+	-	++	-	SC
	+++	+	-	++	-	SC
	+++	+	-	++	-	-
b) Bastonetes Gram negativos (15 cepas)	+++	++	+++	++	++	++
	+++	++	+++	++	++	++
	+++	++	-	+	-	-
	++	++	+++	+	++	+++
	++	++	+	+	++	+++
	++	++	++	++	++	+++
	++	+	++	+	-	++
	++	++	+++	++	+	-
	++	++	++	++	++	+
	++	++	++	+	++	++
	+	+++	-	+	++	+++
	+	+++	-	+	++	+++
	+	++	++	+	++	+++
	+	+	++	+	++	+++
	+	+	++	+	+++	+++

NOTAS: (SC) Sem crescimento
 (-) Reação negativa
 (+) Dimensão do halo de 1 a 5mm
 (++) Dimensão do halo de 6 a 10mm
 (+++) Dimensão do halo maior que 10mm

TABELA VIII - Variação da atividade proteolítica das bactérias isoladas a 20°C a diferentes temperaturas, determinada pelo diâmetro do halo formado em torno das colônias.

	Temperaturas de incubação		
	30°C	20°C	7°C
1. Bactérias da superfície da amostra			
a) Bastonetes Gram positivos (4 cepas)	+++	++	++
	+++	++	-
	+++	++	-
	+++	+	-
b) Bastonetes Gram negativos (5 cepas)	++	++	+++
	++	++	++
	++	+	+++
	-	+	+
	+	++	+++
c) Cocos Gram positivos (1 cepa)	+	+	-
2. Bactérias no total da amostra			
b) Bastonetes Gram negativos (2 cepas)	++	++	++
	-	+	-
c) Cocos Gram positivos (11 cepas)	+++	++	+++
	+++	+++	-
	+++	+++	-
	+++	+	-
	+++	+	-
	++	++	-
	++	+	-
	+	+	+
	+	+	+
	+	+	-
	+	+	-

NOTAS: (-) Reação negativa
 (+) Dimensão do halo de 1 a 5mm
 (++) Dimensão do halo de 6 a 10mm
 (+++) Dimensão do halo maior que 10mm

TABELA IX - Variação da atividade lipolítica das bactérias isoladas a 20°C a diferentes temperaturas, determinada pelo diâmetro do halo formado em torno das colônias.

	Temperaturas de incubação		
	30°C	20°C	7°C
1. Bactérias da superfície da amostra			
c) Cocos Gram positivos (1 cepa)	+	+	-
d) Cocos Gram negativos (11 cepas)	++	++	+++
	++	++	++
	+	++	++
	+	++	++
	+	+	+++
	+	+	++
	+	+	++
	-	+	++
	-	+	++
	-	+	+
	-	+	+++
2. Bactérias no total da amostra			
a) Bastonetes Gram positivos (4 cepas)	++	+	-
	++	+	-
	++	+	-
	++	+	-
b) Bastonetes Gram negativos (4 cepas)	+++	++	+++
	++	+	+
	+	+	+
	+	+	+
d) Cocos Gram negativos (5 cepas)	SC	+++	+++
	++	++	+++
	+	++	++
	-	+	+
	-	+	+

NOTAS: (SC) Sem crescimento
 (-) Reação negativa
 (+) Dimensão do halo de 1 a 5mm
 (++) Dimensão do halo de 6 a 10mm
 (+++) Dimensão do halo maior que 10mm

TABELA X - Variação das atividades proteolíticas e lipolíticas das bactérias isoladas a 20°C a diferentes temperaturas, determinadas pelo diâmetro do halo formado em torno das colônias.

	Atividade proteolítica			Atividade lipolítica		
	Temperaturas de incubação			Temperaturas de incubação		
	30°C	20°C	7°C	30°C	20°C	7°C
1. Bactérias da superfície da amostra						
a) Bastonetes Gram positivos (1 cepa)	+	+	-	+	+	-
b) Bastonetes Gram negativos (23 cepas)	+++	+++	+++	++	++	++
	++	++	+++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++
	++	++	++	-	+	++
	++	++	++	++	++	+
	++	++	+++	+	+++	+++
	++	++	+++	-	+	++
	++	++	+++	-	+	++
	++	++	+++	+	++	+++
	+	++	+++	++	+	++
	+	++	+++	++	++	+++
	+	+	++	SC	++	+++
	+	+	++	SC	++	+++
	++	+	++	++	+	++
	++	+	++	+	++	++
	+	+	++	-	+	++
	+	++	++	+	+	-
	+	+	++	-	+	-
	+	+	++	+	+	-
	+	+	+	+	+	-
	-	+	++	-	+	+
	-	+	-	-	++	++
2. Bactérias no total da amostra						
b) Bastonetes Gram negativos (34 cepas)	+++	+++	+++	++	+++	+++
	+++	++	+++	++	++	+++
	+++	++	+++	+	++	++
	++	++	+++	+++	+++	+++
	++	++	+++	++	++	+++
	++	++	+++	++	++	+++
	++	++	+++	++	++	+++
	++	++	+++	++	++	+++
	++	++	+++	-	++	+++
	++	++	+++	-	++	+++
	++	++	+++	-	++	+++
	++	++	+++	++	+++	+++
	++	++	+++	++	+++	+++
	++	++	+++	+	+	+++
	++	++	+++	+	+	+++
	++	++	+++	-	+	++

continua.....

TABELA X - continuação

	Atividade proteolítica			Atividade lipolítica		
	Temperaturas de incubação			Temperaturas de incubação		
	30°C	20°C	7°C	30°C	20°C	7°C
	++	++	+++	++	++	++
	++	++	+++	++	+++	+++
	++	++	+++	++	++	++
	++	++	+++	+	++	++
	++	+	+++	-	+	++
	++	++	+++	+	+	-
	++	++	++	++	++	++
	+	++	+++	++	+++	+++
	+	+	++	++	+++	+++
	+	+	++	++	+++	+++
	+	++	+++	-	++	+++
	+	+	+	++	++	+++
	+	++	+++	+	+	+
	+	++	++	+	+	++
	+	+	++	++	++	++
	+	+	++	++	++	++
	+	+	++	++	++	++
	+	++	++	++	++	++
	+	+	+	++	++	+
	-	+	-	+	++	++
c) Cocos Gram positivos (2 cepas)	++	+	-	+	+	-
	++	+	-	++	+	+

NOTAS: (SC) Sem crescimento
 (-) Reação negativa
 (+) Dimensão do halo de 1 a 5 mm
 (++) Dimensão do halo de 6 a 10mm
 (+++) Dimensão do halo maior que 10mm

TABELA XI - Variação da atividade proteolítica das bactérias isoladas a 79C a diferentes temperaturas, determinada pelo diâmetro do halo formado em torno das colônias.

	Temperaturas de incubação		
	309C	209C	79C
1. Bactéria da superfície da amostra			
a) Bastonetes Gram positivos (1 cepa)	+	+	++
b) Bastonetes Gram negativos (5 cepas)	++	++	++
	++	++	++
	+	++	++
	+	+	++
	+	+	+
c) Cocos Gram positivos (1 cepa)	++	+	+
2. Bactérias no total da amostra			
b) Bastonetes Gram negativos (5 cepas)	++	+	+++
	++	+	++
	++	+	+
	+	+	++
	+	+	+
c) Cocos Gram positivos (2 cepas)	+++	+++	+
	+	+	+

NOTAS: (-) = Reação negativa
 (+) = Dimensão do halo de 1 a 5mm
 (++) = Dimensão do halo de 6 a 10mm
 (+++) = Dimensão do halo maior que 10mm

TABELA XII - Variação da atividade lipolítica das bactérias isoladas a 79C a diferentes temperaturas, determinada pelo diâmetro do halo formado em torno das colônias.

	Atividade Lipolítica		
	Temperaturas 309C	de 209C	incubação 79C
1. Bactérias da superfície da amostra			
b) Bastonetes Gram negativos (4 cepas)	+++	++	+++
	+++	++	+++
	++	++	+++
	-	-	+
d) Cocos Gram negativos (3 cepas)	++	+	++
	-	-	++
	-	+	+
2. Bactérias no total da amostra			
b) Bastonetes Gram negativos (2 cepas)	++	++	+
	+	++	+++
d) Cocos Gram negativos (9 cepas)	+++	+	+
	++	++	++
	++	+	+
	-	++	+++
	-	+	++
	-	+	+
	-	-	+
	SC	+	++
	++	+	+

NOTAS: (SC) = Sem crescimento
 (-) = Reação negativa
 (+) = Dimensão do halo de 1 a 5mm
 (++) = Dimensão do halo de 6 a 10mm
 (+++) = Dimensão do halo maior que 10mm

TABELA XIII - Continuação

	Atividade proteolítica			Atividade lipolítica		
	Temperaturas de incubação			Temperaturas de incubação		
	30°C	20°C	7°C	30°C	20°C	7°C
b) Bastonetes Gram negativos (24 cepas)	+++	++	+++	++	+++	+++
	+++	++	+++	++	+++	+++
	+++	++	+++	++	+++	+++
	+++	+	++	-	++	+++
	+++	++	+++	+	++	++
	++	++	+++	++	++	+++
	++	++	+++	++	++	+++
	++	++	+++	++	++	+++
	++	++	+++	++	++	+++
	++	++	+++	++	+++	+++
	++	+	+++	++	++	+++
	++	+	+++	++	++	+++
	++	+	+++	++	++	++
	++	++	+++	+	+	++
	++	++	+++	+	+	++
	++	++	++	++	++	++
	+	++	+++	++	++	+++
	+	++	+++	+	++	+++
	+	+	++	++	+++	+++
	+	+	++	SC	++	+++
	+	++	+++	++	++	++
	+	+	+	+	+	++
	-	++	+++	-	++	+++

NOTAS: (SC) = Sem crescimento
 (-) = Reação negativa
 (+) = Dimensão do halo de 1 a 5mm
 (++) = Dimensão do halo de 6 a 10mm
 (+++) = Dimensão do halo maior que 10mm

TABELA XIV - Características morfológicas e fisiológicas das bactérias isoladas a partir de placas incubadas a 30°C por 48 horas.

Morfologia	Gram	*	Nº de colônias examinadas	Motilidade		Pigmento solúvel		Oxidase		Fluorescência	
				(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Bastonetes	G ⁺	S	19	18	1	4	15	6	13	--	19
	G ⁺	T	11	5	6	-	11	5	6	--	11
Bastonetes	G ⁻	S	58	58	-	42	16	58	--	3	55
	G ⁻	T	31	28	3	18	13	28	3	2	29
Cocos	G ⁺	S	30	--	--	13	17	--	30	-	30
	G ⁺	T	17	--	--	4	13	--	17	-	17
Cocos	G ⁻	S	24	--	--	-	24	19	5	-	24
	G ⁻	T	20	--	--	-	20	14	6	-	20

Notas (*) (S) Bactérias da superfície da amostra (-) Reação negativa
(T) Bactérias no total da amostra (+) Reação positiva

TABELA XV - Características morfológicas e fisiológicas das bactérias isoladas a partir de placas incubadas à 20°C por 48 horas.

Morfologia	Gram	*	Nº de colônias examinadas	Motilidade		Pigmento solúvel		Oxidase		Fluores cência	
				(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Bastonetes	G ⁺	S	9	5	4	-	9	3	6	-	9
	G ⁺	T	4	3	1	-	4	4	-	-	4
Bastonetes	G ⁻	S	38	36	2	27	11	37	1	1	37
	G ⁻	T	56	56	-	34	22	56	-	4	52
Cocos	G ⁺	S	21	--	--	1	20	--	21	-	21
	G ⁺	T	21	--	--	-	21	-	21	-	21
Cocos	G ⁻	S	35	--	--	-	35	29	6	-	35
	G ⁻	T	28	--	--	-	28	27	1	-	28

Notas: (*) (S) Bactérias da superfície da amostra (-) Reação negativa
(T) Bactérias no total da amostra (+) Reação positiva

TABELA XVI - Características morfológicas e fisiológicas das bactérias isoladas a partir de placas incubadas a 79C por 10 dias.

Morfologia	Gram	*	Nº de colônias examinadas dias	Motilidade		Pigmento solúvel		Oxidase		Fluorescência	
				(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Bastonetes	G ⁺	S	2	-	2	-	2	-	2	-	2
	G ⁺	T	2	1	1	-	2	1	1	-	2
Bastonetes	G ⁻	S	75	70	5	34	41	75	-	1	74
	G ⁻	T	53	50	3	31	22	50	3	1	52
Cocos	G ⁺	S	7	--	--	-	7	-	7	-	7
	G ⁺	T	5	--	--	-	5	-	5	-	5
Cocos	G ⁻	S	11	--	--	-	11	11	-	-	11
	G ⁻	T	30	--	--	-	30	21	9	-	30

Notas: (*) (S) Bactérias da superfície da amostra (-) Reação negativa
(T) Bactérias no total da amostra (+) Reação positiva

V. DISCUSSÃO

A avaliação do grau de contaminação de bactérias da superfície e no total das amostras de sardinha e camarão conduzidas às temperaturas de 30°C, 20°C e 7°C mostraram que os resultados variam com a espécie de pescado e a temperatura de incubação das placas semeadas.

As contagens variaram entre 10^4 a 10^8 /g em sardinha e 10^6 a 10^7 /g em camarão. O número de bactérias viáveis em mesófilas contadas a 30°C foi pouco menor que as psicrófilas e psicrotróficas contadas a 20°C ou 7°C. Esses dados estão de acordo com as conclusões de Castell e colab. (12) que usaram as temperaturas de 2°C por 14 dias, 7°C por 7 dias, 25°C por 3 dias e 37°C por 2 dias para contagem de bactérias em músculos de bacalhau. Observaram que as variações de contagens eram proporcionais e próximas quando incubadas às temperaturas de 7°C, 25°C e 37°C. A contagem feita a 2°C era sempre menor que as obtidas nas três outras temperaturas. E que quando as contagens iniciais alcançaram valores aproximados de 10^6 /g o teor de trimetilamina nas amostras armazenadas a 0°C por 6 dias foi elevado (trimetilamina em torno de 89 mg/100 g da amostra), influenciando assim na qualidade do produto. Observaram, também, que as contagens a 37°C não tinham valores estimativos para as amostras armazenadas a 0°C. No presente trabalho, as contagens de mesófilas um tanto elevadas poderão ser de uma contaminação na superfície das amostras pelo acréscimo de bactérias dos equipamentos de pesca, do barco, do manuseio em condições precárias de higiene ou, também, pela temperatura do mar um tanto elevada, comparada com as do Pacífico Norte (31).

O grau de contaminação microbiana do pescado depende muito da qualidade desse produto com respeito a capacidade de armazenagem. Segundo Jay (40) durante o armazenamento por congelação ocorre o seguinte: 1) a mortalidade inicial acentuada que varia com as espécies microbianas; 2) a proporção de sobreviventes é praticamente dependente da

velocidade de congelação; 3) células viáveis imediatamente após a congelação morrem gradualmente durante o armazenamento; 4) e essa destruição é mais acentuada em temperaturas pouco abaixo de 0°C e normalmente lenta abaixo de -20°C. Os alimentos marinhos congelados com contagens inferiores a 10^5 microrg./ml são aceitos pelas autoridades de saúde pública, contagens de até 10^6 /ml são aceitos em condições de um uso imediato ao congelamento, porém, contagens superiores a 10^6 /ml são rejeitados.

A ocorrência um tanto acentuada de bactérias em cocos Gram negativos possivelmente Moroxella e Acinetobacter, na microflora de superfície e no total das amostras de sardinha e camarão é particularmente interessante ser destacada. Os experimentos de Harrison e Lee (31) com camarão do Pacífico Norte (Pandalus jordani), Shiflett e colab. (62) com crustáceos e Shewan (60) com peixes do mar do Norte confirmam serem essas bactérias de ocorrência muito comum em alimentos de origem marinha. Esses coco-bacilos Gram negativos foram inicialmente classificados como Achromobacter. Shaw e Shewan (59) reclassificaram este grupo como Moroxella. Thornley (67, 68) propôs a designação de Acinetobacter, que foram a seguir complementados pelos trabalhos de Bauman e colab. (4, 5) denominando de Moroxella as espécies citocromo-oxidase positiva e Acinetobacter, a negativa. No presente trabalho, verificou-se uma predominância de Moroxella em relação a Acinetobacter nas três temperaturas de incubação usadas para isolamento de bactérias da superfície e no total das amostras. Além disso, houve uma predominância de bactérias em bastonetes Gram negativos em relação as em cocos Gram negativos nas amostras de sardinha nas três temperaturas de incubação (30°C, 20°C e 7°C) e a 7°C nas amostras de camarão. Nas temperaturas de incubação de 30°C e 20°C, a predominância foi de bactérias em forma de cocos Gram negativos em relação as em bastonetes Gram negativos nas amostras de camarão. Essas observações estão de acordo com os estudos efetuados por Shiflett e colab. (62) que comprovaram a existência de Acinetobacter e Moroxella em crustáceos, enquanto em peixe Pseudomonas e Achromobacter foram mais

frequentes. Em peixes e crustáceos a presença de Achromobacter, Micrococcus e corineformes é comum, e variações na predominância poderão ocorrer em função de fatores como: temperatura ambiente, condições de captura, equipamentos, diferenças nas espécies do pescado etc.

Comumente todas as bactérias com características da família Achromobacteriaceae e pigmentos amarelos são classificadas como Flavobacterium. Porém, Shewan (60), em estudos recentes, comprovou a diversidade no gênero quanto aos valores de G+C (guanina e citosina), mostrando que muitas destas bactérias representam o gênero Cytophaga. Segundo o Manual de Bergey (9) e a classificação de Skerman (65) a diferenciação entre Achromobacter e Alcaligenes é muitas vezes dificultada por deficiência de dados na comprovação de suas características. Dessa forma, a caracterização da microflora psicrotrófica de peixes e alimentos marinhos depende principalmente da metodologia utilizada pelos pesquisadores. Todas as bactérias desses gêneros (Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium e Alcaligenes) estão englobadas no grupo das bactérias em bastonetes Gram negativos. Dos 42%, 44% e 69% que constituem esse grupo nos ensaios conduzidos a 30°C, 20°C e 7°C, respectivamente, esses gêneros devem constituir a sua maioria. Além disso, as coli-aerógenas e outras enterobactérias devem estar incluídas em certa porcentagem, principalmente naquelas isoladas a 30°C. Entretanto, essa porcentagem não deve ser muito elevada uma vez que as proporções das bactérias com as propriedades lipolíticas e proteolíticas foram bastante próximas entre as populações desse grupo de bactérias isoladas a 7°C, 20°C e 30°C. (em porcentual: 50%, 59% e 60%, respectivamente). Além disso, a maior proporção de bactérias em forma de bastonetes produtoras de pigmentos apresentadas às culturas isoladas a 30°C e 20°C em comparação com aquelas isoladas a 7°C (67%, 65% e 51%, respectivamente) vem mostrar que às temperaturas elevadas há maior tendência a isolamento de Pseudomonas mesófilas.

As bactérias em bastonetes Gram positivos e em cocos Gram positivos proteolíticas apresentam proteólise mais intensa na temperatura de

incubação de 30°C do que a 20°C ou 7°C. Esta observação concorda com os resultados de diversos pesquisadores, entre eles Vanderzant (71) e Hurley e colab. (38), os quais comprovaram em suas investigações um aumento da atividade proteolítica de bactérias com aumento da temperatura. Entretanto, as bactérias em bastonetes Gram negativos apresentaram atividades proteolíticas quase iguais ou às vezes mais intensa a 7°C, comparadas com temperaturas mais elevadas.

A detecção de microrganismos proteolíticos em produtos de origem marinha é de real importância nas avaliações do tempo provável de armazenamento e das técnicas de processamento (45). A ocorrência e participação no processo de deterioração destes produtos foram demonstradas em vários trabalhos, dentre eles Liston (46), Shewan (60) e Shaw e Shewan (59), os quais dão grande importância a ocorrência de bactérias em forma de bastonetes Gram negativos, destacando-se as Pseudomonas.

No estudo das bactérias lipolíticas, a atividade lipolítica das bactérias em bastonetes Gram negativos foi mais acentuada na temperatura de 7°C do que a 30°C ou 20°C. Nashif e Nelson (52, 53) usando Pseudomonas fragi em seus estudos demonstraram que a lipase é preferentemente produzida à baixa temperatura e que uma vez produzida tem uma temperatura ótima de atividade de 40°C. Os outros tipos morfológicos apresentaram as atividades lipolíticas iguais ou mais intensas a temperaturas elevadas.

Os cocos Gram negativos possivelmente Moroxella com atividade lipolítica estão relacionados no processo de deterioração do pescado. Em moluscos, Herbert e colab. (33) indicaram este tipo de bactéria, como responsável pela produção de odores estranhos e Shaw e Shewan (59) demonstraram que Moroxella produzia elevação no pH e, também, odores alterados em produtos marinhos. É importante lembrar que os cocos Gram negativos isolados a 7°C ou a 20°C têm propriedades lipolíticas diferentes daqueles isolados a 30°C. Aquelas isoladas a

temperaturas baixas possuem atividade lipolítica mais intensa ou pelo menos igual a temperatura de 7°C comparada com a de 30°C, ao passo que aquelas isoladas a 30°C só possuem atividade lipolítica a temperaturas superiores a 20°C.

Pelos dados da literatura, conclui-se que as bactérias em bastonetes Gram negativos possuidoras de atividades proteolítica, lipolítica e proteolítica e lipolítica são as principais responsáveis pela deterioração do pescado e outros produtos marinhos durante o manuseio e armazenamento em câmaras frigoríficas ou em gelo (0°C a 2°C). Além disso, os cocos Gram negativos com atividade lipolítica desempenham papel de relativa importância na deterioração do pescado. Das 185 cepas isoladas a 7°C cerca de 69% eram de bactérias em bastonetes Gram negativos e 22% de bactérias em cocos Gram negativos. Dentre esses, 54% possuíam atividades proteolítica e/ou lipolítica. Dessa forma, observa-se que 49% das bactérias isoladas a 7°C pertencem ao grupo das bactérias importantes na deterioração de pescado conservado a temperaturas de 0°C a 20°C. Já à temperatura de 20°C, porcentagem de bactérias em bastonetes Gram negativos isoladas foi de 44% e de cocos Gram negativos de 29%. Desses, a proporção de bactérias com atividade proteolítica e/ou lipolítica foi de 54%. Assim, apenas 39,4% das bactérias isoladas a 20°C eram do grupo de importância na deterioração de pescado refrigerado.

Aplicando o mesmo raciocínio observou-se, que dentre as bactérias isoladas a 30°C, 42% foram em bastonetes Gram negativos, 21% em cocos Gram negativos e apresentaram 63% de cepas com atividades proteolítica e/ou lipolítica. Desta forma, mais de 38% das culturas isoladas parecem ser de importância na deterioração de pescados refrigerados. Entretanto, esse valor está super-avaliado porque nem todas as cepas isoladas a 30°C são proteolíticas ou lipolíticas a baixas temperaturas. Assim, das 72 cepas de bactérias em bastonetes Gram negativos com atividades proteolíticas ou lipolíticas, somente 64 mantiveram essas atividades a 7°C.

Das 11 culturas em cocos Gram negativos isoladas a 30°C com atividade lipolítica nenhuma manteve essa atividade a 7°C. Dessa forma à temperatura de 7°C, apenas 48% apresentaram atividades proteolítica e/ou lipolítica (em comparação com 63% a 30°C). Assim, apenas 29,3% das cepas isoladas a 30°C seriam de importância a deterioração do pescado refrigerado.

Finalizando, observa-se que cerca da metade das bactérias enumeradas pelo método padrão para psicrotróficos aplicado a pescado é constituída de bactérias de importância a deterioração do pescado. Essa porcentagem diminui com a elevação de temperatura de incubação, obtendo-se valores inferiores a 1/3 à temperatura de 30°C. O método padrão para psicrotróficos é bastante demorado e trabalhoso não sendo adequado para aplicação de rotina. Talvez o emprego de temperatura ao redor de 20°C para incubação das placas e com uso de agentes inibidores de bactérias Gram positivos venha resolver, em parte, o problema do tempo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, R., Farber, L. e Larke, P. 1964. Bacteriology of spoilage of fish muscle. II. Incidence of spoilers during spoilage. *Appl. Microbiol.* 12: 277-279.
2. Alford, J. A. 1958. Summary of material submitted on questionnaires regarding psychrophiles. Invited paper for round table discussion on psychrophiles. Soc. Am. Bacteriol. Ann. Meeting.
3. American Public Health Association. 1967. "Standard Methods for the Examination of Dairy Products". 12th Ed., New York, EUA.
4. Baumann, P., Doudoroff, M. e Stanier, R.Y. 1968. Study of the Moroxella group. I. Genus Moroxella and the Neisseria catarrhalis group. *J. Bacteriol.* 95: 58-73.
5. Baumann, P., Doudoroff, M. e Stanier, R.Y. 1968. A study of the Moroxella group II. Oxidase negative (genus Acinetobacter). *J. Bacteriol.*, 95: 1520-1541.
6. Beatty, S.A. e Gibbons, N.E. 1937. The measurement of spoilage in fish. *J. Biol. Board Can.*, 3: 77-91.
7. Bedford, R.M. 1933. Marine bacteria of the Northern Pacific Ocean. The temperature range for growth. *Contrib. Can. Biol. Fish.* 7: 431-438.
8. Bonner, M.D. e Harmon, L.G. 1957. Characteristic of organisms contributing to spoilage in cottage cheese. *J. Dairy Sci.* 40: 1599-1611.

9. Breed, R.S., Murray, E.G.D. e Smith, N.R. 1957. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 7th Ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore Md. 21202, EUA.
10. Burgess, G.H.O., Cutting, C.L., Lovern , J.A. e Waterman, J. J. 1967. "Fish Handling & Processing". 354 pp. Chemical Publishing Co., Inc. New York.
11. Castell, C.H. 1946. Effect of trimethylamine oxide on the growth of bacteria. J. Fish. Res. Board Can. 6: 491-497.
12. Castell, C.H., Anderson, G.W. e Pivnick, H. 1948. Relation of bacteria counts to quality of cod fillets. J. Fish. Res. Board Can. 7: 378-388.
13. Castell, C.H. e Greenough, M.F. 1959. The action of Pseudomonas on fish muscle. IV. Relation between substrate composition and the development of odours by Pseudomonas fragi. J. Fish. Res. Board Can. 16: 21-31.
14. Castell, C.H. e Greenough, M. F. 1957. The action of Pseudomonas on fish muscle. I. Organisms responsible for odours produced during incipient spoilage of chilled fish muscle. J. Fish. Res. Board Can. 14: 617-625.
15. Chai, T., Chen, C., Rosen, A. e Levin, R. E. 1968. Detection and incidence of spoilage bacteria on fish. II. Relative incidence of Pseudomonads on haddock fillets. Appl. Microbiol. 16: 1738-1741.
16. Collins, E.B. 1955. Factors involved in the control of gelatinous curd defects of cottage cheese. I. Storage temperature and pH. J. Milk and Food Technol. 18: 169-171.

17. Collins, V.K., Kuchel, C.C. e Beatty, S.A. 1941. Studies of fish spoilage. IX. Changes in buffering capacity of cod muscle press juice. J. Fish. Res. Board Can. 5: 203-210.
18. Colwell, R.R. e Liston, J. 1962. Bacterial flora of seven species of fish collected at rangelap and eniwetok atolls. Pacific Sci. 16: 264-270.
19. Colwell, R.R. e Liston, J. 1962. The natural bacterial flora of certain marine invertebrates. J. Insect Pathol. 4: 23-33.
20. Debevere, J.M. e Voetts, J.P. 1970. Microbiological changes in prepacked cod fillets in relation to oxygen permeability film. J. Appl. Bacteriol. 34: 507-513.
21. Druce, R.G., Bebbington, N.B., Elson, K., Harcombe, J.M. e Thomas, S.B. 1957. The determination of the coli-aerogenes content of milk and dairy equipment by plating on violet red bile agar incubated at 30°C. J. Appl. Bacteriol. 20: 1-10.
22. Dyer, W.J., Dyer, F.E. e Snow, M. 1946. Amines in fish muscle. III. Spoilage of iced eviscerated cod. J. Fish. Res. Board Can. 6: 403-413.
23. Edwards, P.R. e Ewining, W.H. 1962. "Identification of Enterobacteriaceae". 254pp Burgess Publ. Co.
24. Elliker, P.R. 1953. Bacterial defects of cottage Cheese. Proc. State Coll. Washington Inst. Dairying.
25. Foter, M.J. e Rahn, O. 1936. Growth and fermentation of bacteria near their minimum temperature. J. Bacteriol. 32: 485-497.

26. Frazier, W.C. 1958. "Food Microbiology". McGraw-Hill Book Co., Inc. New York.
27. Garcia-Tello, P. e Zaleski, S. 1970. Qualitative and quantitative changes in aerobic. Microflora from intestinal contents of South-Baltic cod during storage. J. Food Sci. 35: 482-485.
28. Gibbons, N.E. 1934. The study of the slime and intestinal flora of some marine fishes. Contrib. Can. Biol. Fish. 8: 275-290.
29. Green, V.W. e Jazeski, J.J. 1954. The influence of temperature on the development of several psychrophilic bacteria dairy origin. Appl. Microbiol. 2: 110-117.
30. Gyllenberg, H., Eklund, E., Antila, M. e Vartiovaara, U. 1960. Contamination and deterioration of market milk. III. A selective plating test for the demonstration of significant numbers of Pseudomonads. Acta. Agr. Scand. 10: 65-73.
31. Harrison, J.M. e Lee, J.S. 1968. Microbiological evolution of Pacific shrimp processing. Appl. Microbiol. 18: 188-192.
32. Herbert, R.A. e Haight, R.D. 1967. Effects of ethylene oxide on the tissue and flora of fresh and freeze dried cod fillets. J. Appl. Bacteriol. 30: 224-229.
33. Herbert, R.A., Handrie, M.S., Gibson, D.M. e Shewan, J.M. 1971. Bacteria active in the spoilage of certain sea foods. J. Appl. Bacteriol. 34: 41-50.
34. Hess, E. 1950. Bacterial fish spoilage and its control. Food Technol. 12: 477-480.
35. Hess, E. 1934. The effects of freezing on marine bacteria. I. Quantitative studies. J. Biol. Board Can. 1: 95-108.

36. Hess, E. 1934. Effects of low temperatures on the growth of marine bacteria. *Contrib. Can. Biol. Fish.* 8: 489-505.
37. Hoff, J.C., Beck, J.W., Eriksen, T.H., Vasconcelos, J.G. e Presnell, M.W. 1967. Time-temperature effects on the bacteriological quality of stored shell-fish. I. Bacteriological changes in live shellfish: Pacific oysters (Crossostrea gigas) Olympia oysters (Ostrea lurida), Native littleneck clams (Venerupis japonica). *J. Food Sci.* 32: 121-124.
38. Hurley, C.W., Gardner, A.F. e Vanderzant, C. 1963. Some characteristics of a proteolytic enzyme system of Pseudomonas fluorescens. *J. Food Sci.* 28: 47-54.
39. Ingram, M. 1951. The effect of cold on microorganisms in relation to food. *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.* 14: 243-252.
40. Jay, J. M. 1970. "Modern Food Microbiology". p. 81-86. Publ. Van Nostrand Reinhold Co., New York N.Y 10001.
41. Labrie, A. e Gibbons, N.E. 1937. Studies on salt fish. II. The effect of salt concentration on preservation. *J. Biol. Board Can.* 3: 439-449.
42. Laycock, R.A. e Regier, L. W. 1971. Trimethylamine-producing bacteria on haddock (Melanogrammus aeglefinus) fillets during refrigerated storage. *J. Fish. Res. Board Can.* 28: 305-309.
43. Lederberg, J. e Lederberg, M. E. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* 63: 399-406.

44. Lerke, P., Adams, R. e Farber, L. 1965. Bacteriology of spoilage of fish muscle. III. Characterization of spoilers. Appl. Microbiol. 13: 625-630.
45. Levin, R.E. 1968. Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish. I. Methodology. Appl. Microbiol. 16: 1734-1737.
46. Liston, J. 1973. Microbial spoilage of fish and seafoods. IV. Conferência Internacional - Impactos Globais da Microbiologia Aplicada. julho 23-28, São Paulo, Brasil.
47. Liston, J. 1960. The bacterial flora of fish caught in the Pacific. J. Appl. Bacteriol. 23: 469-470.
48. Liston, J. e Raj, H. 1962. Food poisoning problems of frozen seafoods. Sanitarian's J. Environmental Health. 25: 235-250.
49. Liuzzo, J.A., Farag, M.K. e Novak, A.F. 1968. Effect of low-level radiation on proteolytic activity of bacteria in oysters. J. Food Sci. 32: 678-681.
50. Long, H.F. e Hammer, B.W. 1941. Classification of organisms important in dairy products. III. Pseudomonas putrefaciens. Iowa Agr. Expt. Sta., Research Bull. 285 pp.
51. Mitchell, N.J. 1970. A simplified method for quantitative microbiological examination of deep frozen seafoods. J. Appl. Bacteriol. 33: 523-527.
52. Nashif, S.A. e Nelson, F.E. 1953. The lipase of Pseudomonas fragi. III. Enzyme action in milk and cream. J. Dairy Sci. 36: 481-488.

53. Mashif, S.A. e Nelson, F.E. 1953. The lipase of Pseudomonas fragi. I. Characterization of the enzyme. J. Dairy Sci. 36: 459-470.
54. Newman, J.N. Cosenza, B.J. e Buck, J.D. 1972. Aerobic microflora of the blue-fish. (Pomatomus saltatrix) intestine. J. Fish. Res. Board Can. 29: 333-336.
55. Parker, R.B., Coldwell, A.L. e Elliker, P.R. 1953. Psychrophilic bacteria - A sanitation problem. J. Milk and Food Technol. 16: 136-139.
56. Parker, R.B., Smith, V.N. e Elliker, P.R. 1951. Bacteria associated with a gelatinous or slimy curd defect of cottage cheese. J. Dairy Sci. 34: 887-893.
57. Reay, G.A. e Shewan, J.M. 1949. The spoilage of fish and its preservation by chilling. Advances in Food Research vol. IV. p343-392. New York Academic Press.
58. Seleen, W.A. e Stark, C.N. 1943. Some characteristics of green-fluorescent pigment producing bacteria. J. Bacteriol. 46: 491-500.
59. Shaw, B.G. e Shewan, J.M. 1968. Psychrophilic spoilage bacteria of fish. J. Appl. Bacteriol. 31: 89-96.
60. Shewan, J. M. 1971. The microbiology of fish and fishery product a progress report. J. Appl. Bacteriol. 34: 299-315.
61. Shewan, J.M., Hobbs, G. and Hodgkiss, W. 1960. The Pseudomonas and Achromobacter groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. J. Appl. Bacteriol. 23: 463-468.

62. Shiflett, M.A., Lee, J.S. e Sinnhuber, R.O. 1966. Microbial flora of irradiated dungeness crabmeat and Pacific oysters. Appl. Microbiol. 14: 411-415.
63. Sierra, G. 1956. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek 23: 15-22.
64. Sizemore, R.K. e Stevenson, H.L. 1970. Method for the isolation of proteolytic marine bacteria. J. Appl. Microbiol. 20: 991-992.
65. Skerman, V.B.D. 1967. "A guide to the identification of the gener of a bacteria". 2nd Ed. Willians and Willians Co. Baltimore, USA.
66. Tarr, H.L.A. 1954. Microbiological deterioration of fish post-mortem its detection and control. Bacteriol. Rev. 18: 1-15.
67. Thornley, M.J. 1968. Properties of Acinetobacter and related genera. In. Gibbs, B.M. and Shapton, P.A. "Identification Methods for Microbiologists", Part B. 212 pp, Academic Press, London England.
68. Thornley, M.J. 1967. A taxonomic study of Acinetobacter and related genera. J. Gen. Microbiol. 49: 211-257.
69. Watanabe, K. 1962. Aspectos bacteriológicos do pescado da costa Sul do Brasil. Bol. Inst. Oceanog. São Paulo - Tomo XII, 3: 69-100.
70. Witter, L.D. 1961. Psychrophilic bacteria. A review. J. Dairy Sci. 46: 983-1015.

71. Vanderzant, W.C. 1957. Proteolytic enzyme from Pseudomonas putrefaciens. I. Characteristics of an extracellular proteolytic enzyme system. Food Res. 22: 151-157.
72. Vanderzant, W.C., Nickelson, R. e Judkins, P.W. 1971. Microbial flora of pond-reared brown shrimp (Penaeus aztecus). Appl. Microbiol. 21: 916-921.

APÊNDICE

I. MEIOS DE CULTURA

1. CALDO NUTRIENTE 0,5% CLORETO DE SÓDIO

Composição

Extrato de carne.....	3,0g
Peptona.....	5,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Água destilada.....	1.000 mg
pH - 6,8	

Preparo

Todos os ingredientes são misturados e aquecidos até a dissolução total, distribuídos em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 1.000ml (500 ml aproximadamente por frasco), autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

2. AGAR-MARINHO

Composição

Peptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	1,0 g
Citrato de ferro.....	0,1 g
Cloreto de sódio.....	19,45g
Bicabornato de sódio.....	0,16g
Ácido bórico.....	0,022 g
Silicato de sódio.....	0,004 g

Cloreto de magnésio.....	8,8 g
Sulfato de sódio.....	3,24g
Cloreto de cálcio.....	1,8 g
Cloreto de potássio.....	0,55g
Cloreto de estrôncio.....	0,034g
Brometo de potássio.....	0,08g
Fluoreto de sódio.....	0,0024g
Nitrato de amônio.....	0,0016g
Fosfato dissódico.....	0,008g
Agar.....	15 g
Água destilada.....	1.000 ml
pH - 6,8	

Preparo

Divide-se os ingredientes em duas partes:

- a) A primeira, composta dos seguintes sais: cloretos de magnésio, cálcio, potássio, fluoreto de sódio, nitrato de amônio e fosfato dissódico; dissolver estes ingredientes em 600 ml de água destilada e colocar em frascos de Erlenmeyer de 2.000 ml.
- b) A segunda, composta dos ingredientes restantes são misturados e aquecidos até dissolver totalmente o agar, distribuir em frascos (400 ml por frasco Erlenmeyer de 1.000 ml). A primeira parte como a segunda são autoclavadas separadamente a 121°C por 15 minutos, misturando-se as partes pouco antes de colocar em placas de Petri a 45°C.

3. AGAR LEITE - AGAR MARINHO

Composição

Leite desnatado.....	20 g
Agar.....	15 g
Água destilada.....	1.000 ml
pH - 6,8	

3.2. Preparo

Preparar uma solução 20% de leite desnatado, num Erlenmeyer previamente tarado, pesar 20 g do leite e completar para 100 g com água destilada. O restante da água é utilizada na preparação do agar simples (10S). As duas porções do meio (solução 20% de leite desnatado e agar simples) são esterilizados separadamente a 121°C por 15 minutos, misturando-se assepticamente pouco antes de colocar em placas de Petri a 45°C (10cc do meio por placa). Após a solidificação desta por resfriamento a temperatura ambiente, é colocada uma camada de agar-marinho (5 cc), previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos e mantido a 45°C.

4. AGAR-TWEEN 80

Composição

Peptona.....	10 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Cloreto de cálcio.....	0,1 g
Tween 80.....	10 ml
Agar.....	15 g
Água destilada.....	1.000 ml

pH - 6,8

Preparo

Misturar e aquecer os ingredientes, com exceção do Tween 80, até a dissolução total do agar, distribuir em frascos de Erlenmeyer de 1.000 ml (500 ml por frasco), autoclavar a 121°C por 15 minutos. O Tween 80 (Polioxi-etileno sorbitan mono-oleato) colocado em um tubo de ensaio é autoclavado também a 121°C por 15 minutos, e misturado aos outros ingredientes a 45°C, pouco antes de colocar em placas de Petri (15 cc do meio por placa).

5. KING A

Composição

Peptona.....	20 g
Glicerol.....	10 ml
Cloreto de magnésio.....	1,4 g
Sulfato de potássio.....	10 g
Agar.....	15 g
Água destilada.....	1.000 ml

pH - 6,8

Preparo

Os componentes são misturados e aquecidos até dissolver o agar completamente, distribuir em tubos de ensaio (10 ml aproximadamente por tubo), esterilizar a 121°C por 15 minutos. Em seguida, inclinar os tubos de modo a formar um ângulo de aproximadamente 30° e deixar em repouso até que o meio solidifique totalmente.

6. KING B

Composição

Proteose peptona nº 3.....	20 g
Glicerol.....	10 ml
Fosfato de potássio dibásico.....	1,5g
Sulfato de magnésio.....	1,5g
Agar.....	15 g
Água destilada.....	1.000 ml

pH - 6,8

Preparo

Dissolver completamente todos os ingredientes, distribuir em tu bos de ensaio (10 ml aproximadamente por tudo) e autoclavar a 121°C por 15 minutos. Em seguida, inclinar o tubo como no meio de cultura número 5.

7. AGAR NUTRIENTE 0,5% NaCl

Composição

Extrato de carne.....	3 g
Peptona.....	5 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Agar.....	15 g
Água destilada.....	1.000 ml

pH - 6,8

Preparo

Dissolver todos os ingredientes completamente, por aquecimento, distribuir aproximadamente 10 ml em cada tubo de ensaio (16 x 150 mm), esterilizar a 121°C por 15 minutos. Em seguida, incli nar os tubos como no meio de cultura número 5.

8. AGAR MARINHO MODIFICADO

Composição

Os mesmos ingredientes do meio número 2, reduzindo a quantidade de agar de 15 para 3 gramas por 1.000 ml do meio de cultura.

Preparo

Dividir os ingredientes em duas partes:

- a) A primeira, composta dos seguintes sais: cloretos de cálcio, magnésio e potássio, fluoreto de sódio, nitrato de amônio e fosfato dissódico; dissolver estes componentes em 600 ml de água destilada.
- b) A segunda, composta dos ingredientes restantes, são mistura dos em 400 ml de água destilada e aquecidos até dissolver to talmente o agar. Adiciona-se à primeira parte do meio de cul tura, distribuí-se em tubos de ensaio (16 x 150 mm), e auto clava-se a 121°C por 15 minutos, deixando em repouso a tempe ratura ambiente, na posição perpendicular até a solidificação.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fumio Yokoya pela dedicação como orientador deste trabalho.

Ao Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos Dr. André Tosello pelo estímulo e facilidades dispensados ao autor.

Especiais agradecimentos a Organização dos Estados Americanos, patrocinadora do Curso de Pós Graduação, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento, Salvador - Bahia, do qual o autor é bolsista e a todos indistintamente que colaboraram na elaboração deste trabalho.

DATILOGRAFADO E IMPRESSO NA
FUNDAÇÃO CENTRO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
RUA DR. PELÁGIO LOBO, Nº 63 FONE: 87822
13.100 CAMPINAS - SP