

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRICOLA

APLICAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO MICROBIANO
PARA AVALIAR O GRÁU DE CONTAMINAÇÃO DA PESÇA DO FOGUETE
(Microdon ancylostomus)

Gonzalo Bonilla Salas
Microbiólogo (M.S.).C.

ORIENTADOR

Dr. Fumio Yokoyama

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

Outubro de 1976

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dedico este trabalho

à meus pais

à minha esposa

e minha filha Ana Catalina

AGRADECIMENTOS

O autor expressa os mais sinceros agradecimentos ao Dr. Fumio Yokoyama pela orientação deste trabalho.

A Direção da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, pelas facilidades proporcionadas.

A Universidad de Costa Rica por ter permitido o afastamento do autor.

Ao amigo Emilio Bello pela sua valiosa ajuda.

Finalmente, estende seus agradecimentos a todos que, de uma forma ou de outra, ajudaram na realização desta tese.

ÍNDICE DE TABELAS

	<u>PÁGINA</u>
TABELA 1. Relação das linhagens utilizadas no trabalho, absorvência e número de bactérias.	17
TABELA 2. Contagens totais das amostras de quebras e pele em meio l.i.C.T. a 20°C, expressas em logaritmo do número de germes por grama para quebras e log. do número de germes por cm ² para pele.	19
TABELA 3. Características morfológicas e fisiológicas das bactérias isoladas em meio l.i.C.T. a 20°C. Resultados expressos em número de cepas isoladas	20
TABELA 4. Comportamento das bactérias isoladas em meio A.f.T.F. a 20°C. Resultados expressos em número de cepas.	21
TABELA 5. Valores de log. de R para estimativa bacteriana em pele.	23
TABELA 6. Valores de log. de R. para estimativa bacteriana em quebras.	24
TABELA 7. Valores de k (min. ⁻¹) para estimativa bacteriana em pele.	25
TABELA 8. Valores de k (min. ⁻¹) para estimativa bacteriana em quebras.	26
TABELA 9. Tempo (em minutos) para atingir uma absorvência de 0.10 das amostras de quebras.	28
TABELA 10. Tempo (em minutos) para atingir uma absorvência de 0.10 das amostras de pele.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>PÁGINA</u>
Fig. 1 Lâmina utilizada para amostragem de superfícies.	14
Fig. 2 Área de amostragem, remoção de pele e músculo dorsal.	14
Fig. 3 Curva de crescimento bacteriano.	16
Fig. 4 Relação entre absorbância e número de células/ml.	17

INDICE GERAL

	<u>PÁGINA</u>
INDICE DE TABELAS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMO	1
SUMMARY	2
I. INTRODUÇÃO	3
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
REFERÊNCIAS.....	30
APÊNDICE.....	33

RESUMO

O presente trabalho consta da obtenção de parâmetros em curvas de crescimento bacteriano e sua utilização para avaliação da sua população em alimentos.

Utilizou-se amostras de pescada foguete (Macrodon ancylodon) por ser esta espécie de grande valor para a economia pesqueira do Brasil e também pela informação que se pode obter de trabalhos anteriores neste laboratório.

As curvas de crescimento foram determinadas usando o incubador de temperatura gradiente (18 até 40°C) efetuando-se leituras em espectrofotômetro a diferentes intervalos de tempo, de acordo com a velocidade de crescimento. As contagens bacterianas para guelras e pele foram efetuadas em meio para contagem total a temperatura de 20°C. A contagem bacteriana expressa em logaritmo variou de 5.42 a 11.45 por cm² para pele e de 5.03 a 10.35 por grama para guelras.

Posteriormente realizou-se uma classificação preliminar das culturas predominantes em cada um dos tubos de incubador gradiente. Os resultados de 720 cepas mostram a predominância de bactérias em bastonetes Gram negativos, oxidativos e catalase positiva.

A análise dos parâmetros de crescimento no incubador de temperatura gradiente provaram que as temperaturas de 26 a 28°C e 36 a 38°C eram mais adequadas para avaliar as populações de bactérias psicrófilas e mesófilas no pescado. Por esse método o grau de contaminações podem ser avaliados em 8 horas

SUMMARY

This work attempts to obtain parameters for bacterial growth curves and to utilize them to evaluate bacterial populations in foods.

The samples used were "pescada fogueira" (Microdon unguis), due to the fact that it is a species of great value in the Brazilian fishing economy and also because of the information that was available from previous work in this laboratory.

Growth curves were obtained using a gradient temperature incubator (18 to 40°C), also making spectrophotometer readings after different intervals of time according to the growth rate.

Bacterial counts for gills and skin were done on plate count agar medium at 20°C temperature. Bacterial counts expressed as logarithms varied from 5.42 to 11.45/cm² for skin, and from 5.03 to 10.35/g for gills.

Subsequently, a preliminary classification of the predominant cultures in each of the gradient incubator tubes was made. The results of 720 samples showed the predominance of Gram negative rod bacteria, oxidizing properties and a positive test for catalase.

An analysis of the growth parameters in the gradient temperature incubator showed that 26 to 28°C and 36 to 38°C temperatures were the most suitable to evaluate the psychrophile and mesophile bacterial populations in fish. With this method, the degree of food contamination could be estimated in minutes.

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos os microbiologistas tem-se preocupado na detecção e enumeração de microorganismos nos diversos produtos alimentares, como meio de controlar a sua qualidade de conservação. Recentemente deu-se especial atenção ao desenvolvimento e avaliação das técnicas rápidas para a obtenção de estimativas dos microorganismos contaminantes, a fim de poder utilizar no controle microbiológico da recepção de matéria prima e dos processos de industrialização. Tais métodos, como medida do tempo de redução de indicadores de oxido-redução e contagem microscópica direta, tem sido usados em casos especiais com algum sucesso.

Entretanto, esses métodos não podem ser aplicados na maioria dos alimentos e os resultados obtidos são em geral bastante controversos. A principal dificuldade reside na especificidade de metabolitos para diferentes microorganismos, para o caso da redução de indicadores e na incerteza nas distinções entre as células microbianas e corpúsculos de alimentos para o caso de contagem microscópica.

O presente trabalho pretende aplicar uma técnica rápida de amostragem na superfície e obter parâmetros nas curvas de crescimento dos microorganismos em suspensão para avaliar as populações bacterianas em curto tempo. Como material a ser estudado utilizou-se pescada fogueada, por se tratar de um alimento bastante perecível e de grande importância para o país.

O método usado para amostragem foi adaptado daquele usado neste laboratório para amostragem de superfícies de carnes. Os parâmetros aqui utilizados foram aqueles descritos pelos trabalhos anteriormente efetuados, também neste laboratório.

11. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A identificação e enumeração da população microbiana em determinada superfície de produto ou equipamento é de grande importância em microbiologia de alimentos e requer a aplicação de métodos específicos. Os laboratórios oficiais e das indústrias estão fazendo grandes esforços para uniformizar esses métodos e assim poder recomendar especificações microbiológicas de uso geral em alimentos. Insalata e outros (1967).

1. Método de amostragem da Superfície.

Favero e outros (1969) citam quatro métodos básicos para a enumeração de microorganismos na superfície:

A. Técnica do Cotonete.

Nesta técnica, um cotonete esterilizado é esfregado na superfície a ser examinada. O cotonete é a seguir transferido assépticamente num tubo contendo um diluente esterilizado. Após a agitação, retira-se uma alíquota para semear as placas com o meio de cultura adequado.

Esta técnica é recomendada pela American Public Health Association, (1972) usando-se lã de alginato de cálcio, poliéster e rayon em lugar de algodão, pois as fibras de algodão retêm alguns microorganismos causando uma redução na contagem. Segundo outros autores, há evidências de que o alginato não remove adequadamente os microorganismos da superfície como faz o cotonete de algodão, além de inibir alguns microorganismos. Williams, (1973).

B. Técnica de Imersão-agitação.

A superfície contaminada é imersa num fluido esterilizado e submetida a agitação manual ou mecânica. Essa Técnica é mais precisa do que a anterior porque analisa-se toda a superfície, embora não possa ser usada em superfícies grandes ou estacionárias.

C. Método de Contato Pelo Agar.

O meio de agar é colocado em contato com a superfície contaminada

removido e colocado em placa de Petri estéril e incubado para contagem de colônias. Se houver colônias espalhadas ou grande número de bactérias por cm^2 ou fungos, torna-se difícil uma contagem precisa. Atualmente há alguns fabricantes de meios de cultura que já produzem esses materiais para pronto uso. Oxoid (1971).

D. Método de Amostragem pelo Agar Direto na Superfície.

O nutriente agar esterilizado é colocado numa superfície contaminada e deixado para solidificar. Deve-se proteger o agar de contaminações adicionais com um recobrimento estéril. Após incubação contam-se as colônias superficiais na interfase.

Yokoya e Zülzke (1975) utilizaram uma técnica para amostragem de superfícies em carnes. Comparando este método com a técnica do cotonete, notou-se certa superioridade do método proposto em relação a rapidez e facilidade na amostragem.

2. Métodos Rápidos para Avaliar Populações Bacterianas.

Ao mesmo tempo que se tem desenvolvido os métodos para retirada de amostras, os métodos rápidos para avaliar as populações bacterianas tem aumentado nos últimos anos. Entre os mais conhecidos, podemos citar: uso de filtro de membrana, técnicas microscópicas, medição de turbidez foto-eléctrica, medição da dispersão da luz, radiometria, método de reflectância, medição de redução do meio de crescimento e método da medida de crescimento.

A. Filtro de membrana.

A técnica de filtro de membrana permite a determinação da densidade das populações microbianas esparsas, em muitos casos em tempos mais curtos que as técnicas clássicas de semeadura em placas.

MacLeod (1973), relatou um método para a rápida detecção de bactérias viáveis baseado na habilidade dos microrganismos de incorporar o fósforo marcado (^{32}P) como ortofosfato inorgânico. Foi possível detectar

algumas bactérias de diferentes espécies com este método. Dufour e Cabelli (1975) aplicaram esta técnica para definir a distribuição de coliformes em água de mar de acordo com o gênero componente. Este processo utiliza uma série de testes de substratos "in situ" para eliminar replicagem de colônias para sua identificação. Também proporciona uma estimação da densidade total de coliformes. O método demonstrou ser satisfatório.

Winter e outros (1971), utilizaram um método rápido de filtro de membrana com coloração para enumeração de microorganismos viáveis em alimentos e equipamentos de processamento.

B. Microscopia e Técnicas de Coloração.

Esta técnica permite a detecção rápida na contaminação em alimentos, e com a utilização de corantes permite a diferenciação morfológica de acordo com a reação de Gram. APHA (1966).

Paton e Jones (1973), relatam dois métodos para observação de superfícies por microscopia fluorescente e descrevem sua aplicação para estudos associados com a manufatura de alimentos.

C. Medição de Turbidez.

O termo turbidimetria é aplicado a métodos para determinar a concentração de sistemas por meio da luz dispersada. Lamanna e Hallette (1975).

O turbidímetro fotoelétrico é usado para medir a concentração celular em suspensões espessas. As medidas turbidimétricas diretas são de grande importância já que anteriormente era preciso efetuar diluições.

Fujita e Munomura (1968), usando uma modificação no turbidímetro obtiveram uma estimação direta das concentrações espessas de células por turbidimetria. Eles utilizaram uma cubeta que permite ajustar a longitude do raio continuamente entre 0,01 e 20,00 mm. Reduzindo a longitude do raio é possível medir a densidade em suspensões celulares espessas sem diluir as mesmas. Foram observados resultados satisfatórios numa grande quantidade de amostras, sugerindo a satisfatória aplicação deste método. O instrumento pode avaliar

concentrações celulares entre 10^6 e 10^9 /ml em leveduras e de 10^8 até 10^{10} /ml em bactérias.

Kurokawa e outros (1962) desenvolveram um novo método para determinar a medida turbidimétrica da densidade bacterial. Demonstraram que combinando dois tipos de transmitância da suspensão, a absorvância expressada mostra uma relação linear com a densidade bacterial.

D. Medição da Dispersão da Luz.

Este é um método bastante sensível para medir a luz dispersada quando pequenas partículas são expostas a um raio de luz. Este princípio tem sido usado com instrumentos de detecção microbiana automáticos. O sensor inclui um aparelho óptico que permite medir somente a luz dispersada por partículas que produzem um sinal numa célula fotoelétrica ligada a um medidor de pulso ou a um sistema de leitura digital.

Imrek (1969) descreveu um experimento efetuado com um espectrofotômetro, no qual a densidade óptica das suspensões de microorganismos mediu-se a duas diferentes posições no compartimento da cubeta no espectrofotômetro. Com essas duas medições foi possível avaliar o tamanho das partículas e a sua concentração.

E. Radiometria.

Os estudos de determinação microbiana por técnicas radiométricas tem sido enfatizados principalmente com espécies aeróbicas em espécimens clínicas.

Previte (1972) na sua revisão aplica este método para identificar espécies aeróbicas e anaeróbicas de grande importância em alimentos, determinando o $^{14}\text{CO}_2$ emitido no metabolismo da ^{14}C glicose. Os resultados obtidos com este método demonstram que é uma técnica aplicável em provas de esterilização de alimentos.

F. Método da Refletância.

Este método foi desenvolvido e usado para avaliar a concentração

de bactérias viáveis nas superfícies.

Jedlicka e outros (1975) usaram placas de contacto para remover os microorganismos da superfície. Depois da incubação, relacionou-se a perda de reflectância do meio com o número de bactérias. As principais vantagens enumeradas foram: a sua utilidade em determinar superfícies grandemente contaminadas, investimento mínimo em equipamento microbiológico e tempo mínimo por teste.

G. Métodos de Redução dos Indicadores de Potencial de Oxido-Redução.

Alguns métodos rápidos utilizando indicadores de oxido-redução tais como azul de metileno e resazurina tem-se aplicado para avaliar contaminação bacteriana em produtos lácteos.

Os métodos dependem da habilidade da bactéria de crescer e utilizar o oxigénio dissolvido na mistura (amostra e indicador) o qual aboixa o potencial de oxido-redução.

Agrega-se uma solução do indicador azul de metileno ou resazurina para medir a actividade bacteriana e para mostrar visivelmente o grau de utilização de oxigénio por meio da mudança gradual de cor. APHA (1972).

Tengerdy e outros (1967) relatam um método para avaliação quantitativa do crescimento bacteriano com a redução de sais de tetrazotio.

H. Método de Medida da Velocidade de Crescimento.

O método baseia-se na premissa de que quanto maior for o número de bactérias presentes em uma suspensão, mais rápido se consegue obter um certo número. Dessa forma, o tempo decorrido até atingir esta densidade celular pode expressar indirectamente o número inicial de células. É certo que esse tempo depende de vários outros factores, como a temperatura e condição de incubação, meio de cultura utilizado, estado fisiológico das células presentes além das características intrínsecas das espécies envolvidas.

Yokoya e Canhos (1975) descobriram a expressão matemática para a

fase de crescimento microbiano e mostraram que as curvas podem ser representadas considerando dois parâmetros seguintes: (1) constante específica de crescimento (k) e (2) coeficiente de intersecção (R). O valor k é a expressão do crescimento exponencial; $\frac{dX}{dt} : k.X$, onde X é o número de células bacterianas vivas e t o tempo. O valor R é representado pela relação X_0/X_p onde X_0 é o número inicial de células e X_p é a extensão da reta do crescimento exponencial até o tempo t_0 . Esses autores mostraram que, com as suspensões de culturas puras, as estimativas obtidas com uso dessas fórmulas eram bastante próximas aos valores teóricos esperados.

3. Incubadores de Temperatura Gradiente.

Os incubadores de temperatura gradiente foram usados num grande número de estudos com bactérias para determinar as temperaturas cardinais de crescimento, as variações das constantes de crescimento com a temperatura de incubação, assim como as relações específicas a várias temperaturas. Além disso, os incubadores tem sido usados para estudos com outros microorganismos que não são bactérias. Este equipamento permite aos organismos crescerem a diferentes temperaturas num mesmo tempo.

Oppenheimer e Drost-Hansen (1960) introduziram o politermostato que consiste num bloco de alumínio no qual a temperatura gradiente é produzida. Um lado do bloco é esquentado por três barras de ferro. O outro lado do bloco é esfriado com água fria, a qual circula por meio de aberturas. Um termoregulador controla a bomba que faz circular a água fria.

Okami e Sasaki (1967) descrevem um aparelho que consiste numa caixa retangular dividida em dois compartimentos. Cada compartimento tem água quente ou fria que vem de uma bomba com temperatura regulada. Para cultivos líquidos recomendam tubos em forma de "L". A velocidade de agitação e amplitude de inclinação pode-se mudar se for preciso.

Nakae (1966), utilizou um aparelho chamado "Denho de Temperatura Gradiente" o qual consiste num cilindro de 20,5 cm de diâmetro dividido

em dois compartimentos horizontais. A água é bombeada através dos compartimentos superior e inferior a temperaturas constantes selecionadas e atua como meio de transferência de calor.

4. Microflora.

Nos últimos anos tem sido feitos numerosos trabalhos relacionados com a microflora em pescado, por serem esses microorganismos os principais responsáveis pelo curto período de tempo de utilização desses produtos e pelas inúmeras dificuldades na sua industrialização.

A maioria dos investigadores concorda em que as bactérias predominantes em pescado fresco e em mal estado são as psicrotróficas Gram negativas. Shewan (1976).

Outros autores realizaram contagens totais das colônias na flora bacteriana em pele durante estocagem do pescado em gelo. Os resultados mostram que os organismos do gênero Pseudomonas e Flavobacter são os predominantes na decomposição do pescado. Liston (1960), Shewan e outros (1960). Pelos resultados obtidos parece que o odor e sabor característicos em pescado decomposto é devido a ação das Pseudomonas no músculo do pescado.

As contagens nas guelras pareceram ser as mais representativas por estarem expostas totalmente no meio aquoso e protegidas no momento da captura. Tudo parece indicar que o número de bactérias nas guelras antes e depois da captura seja o mesmo. Liston (1956).

Horsley (1973) efetuou um estudo para investigar as evidências que demonstrem se a flora no pescado é um reflexo da flora do meio. As principais espécies encontradas em pele e guelras foram: Laraxella, Flavobacterium, Citophaca e Pseudomonas. Também acharam membros de Acinetobacter, Lactillus, Aeromonas, Vibrio, Enterobacteriaceae, Microcococaceae e alguns Corineformes. É interessante observar que em todos os casos, a maioria dos componentes da flora em pescado foi similar à flora presente nas águas.

Longa (1975) comparando as contagens obtidas por diferentes meios,

em músculo e guelros de pescada foguete, observou melhores resultados a temperatura de 20°C.

Watanabe (1962) verificou que a flora bacteriana da pescada foguete é representada por espécies dos gêneros Pseudomonas, Chromobacter, Flavobacterium, Bacillus e Micrococcus.

Segundo Bedford (1933) a atividade bacteriana e conseqüentemente a decomposição do peixe varia com a temperatura. O mesmo autor encontrou que a temperatura de crescimento variava entre 15°C a 50°C. As temperaturas mínimas e máximas foram de -7.5°C e 45°C respectivamente. A temperatura ótima se verificou entre 20°C e 25°C.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

A. Materia Prima.

Para a execução deste trabalho foi utilizada pescada foguete (Ancodon ancodon) capturada por pequenas embarcações (tipo panelhinhas) em águas costeiras da baía de Santos, e adquirida no Entrepósito de Pesca de Santos (S.P.) após um máximo de um dia de captura. Foram utilizados 75 kg. de pescada foguete, sendo subdividida em 5 lotes. Esta foi inicialmente submetida a lavagem em água potável, e acondicionada em caixas para pesagem. O produto era então submetido a conservação em gelo, colocando-se em caixa isotérmica (isopor) contendo gelo na proporção 1:1 e transportada para o laboratório. Essa proporção de gelo e peixe foi mantida durante todo o experimento pela adição diária de quantidades adequadas de gelo.

B. Equipamentos Especiais.

Além dos equipamentos e aparelhos normais de laboratório de microbiologia, foram utilizados especialmente os seguintes:

Incubador Gradiente.

Incubador de temperatura gradiente da Scientific Industries, Inc., New York, N.Y., equipado com tubos especiais em forma de "L" (17 mm de diâmetro e 170 mm de comprimento).

Agitador de Frascos.

Agitador rotatório New Brunswick Scientific, N.B.S., modelo V.

Fotocolorímetro.

Fotocolorímetro "Causch and Lomb" Spectronic 20, adaptado para operar com tubos de 20 mm. de diâmetro externo. Comprimento de onda utilizado 660 nm. Uma adaptação especial foi feita no protetor dos raios externos para poder receber os tubos em "L" do incubador de temperatura gradiente.

C. Meios de Cultura e Reagentes.

Os meios de cultura utilizados nestes ensaios foram os seguintes:

1. Infusão de Miolo e Coração (IHC)
2. Agar Nutriente (AN)
3. Agar Açúcar Triplo-Ferro (AATF)
4. Meio para Contagem Total (ICT)
5. Meio para Motilidade (MM)

O meio IHC foi obtido da Difco Laboratories, Inc. (Brain Heart Infusion Broth) com adição de 0.5% de Cloreto de Sódio. Os meios AN e ICT também foram obtidos do mesmo laboratório (respectivamente "Nutrient Agar" e "Plate Count Agar") e adicionou-se 0.5% de Cloreto de Sódio. Aos meios AATF e MM, respectivamente "Triple-Sugar Iron Agar" e "Motility Agar" da Difco, não houve adição de sal. Difco (1974)

Solução Tampão

As diluições para contagem foram feitas utilizando-se tampão de fosfato a pH 7.2 preparado de acordo com as recomendações do "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (1972)

Reagentes para Teste de Catalase.

Adicionou-se sobre as colônias com menos de 48 horas de incubação no meio de agar nutriente gotas de água oxigenada a 3% (v/v). Taylor e Fichartz (1972). A formação de bolhas indicou a presença de catalase.

2. Métodos.

A. Obtenção de Suspensões Microbianas.

Para a determinação das análises bacteriológicas, as amostras de 4 a 6 exemplares foram coletadas ao acaso entre os peixes armazenados em gelo. As guelras foram removidas tomando cuidados normais de assepsia, e para as amostras de pele e músculo dorsal utilizou-se uma lâmina de aço inoxidável (96x58x1.6 mm) com uma área determinada no centro de 8.24 cm² para cada corte (ver fig. 1), conforme o método descrito por Yokoya e Zutke (1975) para amostra de carne.

A lâmina previamente esterilizada foi pressionada contra a superfície do

pele (ver fig.2) tendo os lados interiores uma concavidade para que desta forma possa-se retirar a área em exposição com uma faca ou bisturi.

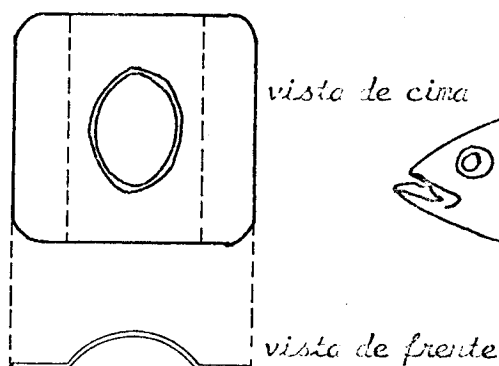


FIGURA 1 Lâmina utilizada para amostragem de superfícies

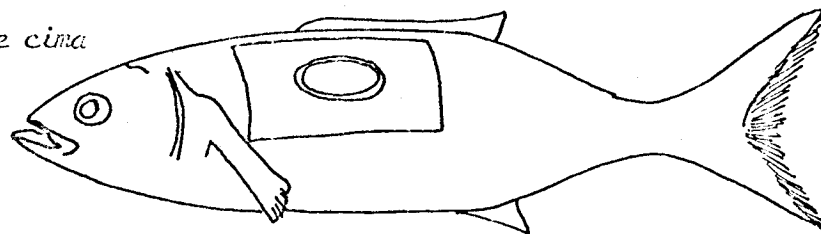


FIGURA 2. Área de amostragem, remoção de pele e músculo dorsal

As porções removidas, tanto de pele como guelbras, foram colocadas em frasco Erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml de água destilada estéril. Nesse frasco adicionou-se 1 ml de Twen 80 (oleato de polietilenoglicol-sorbito) estéril como agente surfactante, e se colocaram no agitador rotatório durante 20 minutos e a uma velocidade de 250 r.p.m.

B. Contagem total de microrganismos.

Depois de diluições decimais adequadas, 1,0 ml de inoculo foi colocado em placas de Petri e adicionou-se o meio MCT, previamente derretido e resfriado a 45-50°C, deixando solidificar após agitação adequada para obter distribuição uniforme das bactérias.

As placas foram incubadas a 20°C por 48 horas e o número de colônias formadas, multiplicadas pela diluição foi expresso em logaritmo do número de bactérias por grama para guelbras e do número de bactérias por cm² para pele.

C. Determinação dos Parâmetros de Crescimento (k e R).

A semeadura para a determinação das constantes de crescimento foi feita transferindo-se 1.0 ml da suspensão obtida em 2.A. para cada tubo do incubador gradiente contendo 9.0 ml. de meio M.C. O intervalo de temperatura

do incubador foi ajustado para 18°C até 40°C e utilizaram-se 15 tubos nessa faixa de temperatura para cada amostra obtida de gubras e de pele. A variação máxima de temperatura em cada tubo durante a incubação foi de $\pm 0.75^\circ\text{C}$.

A incubação foi feita sob agitação recíproca na velocidade de 60 r.p.m. e o crescimento dos microorganismos foi detectado pelo método colorimétrico usando o fotocolorímetro "Bausch and Lomb" Spectronic 20. Foram feitas leituras a intervalos de 15 ou 30 minutos, dependendo da velocidade de crescimento. A constante de crescimento (k) foi determinada da porção retilínea do máximo declive na curva de crescimento.

Para se obter um equilíbrio de temperaturas entre o meio e o incubador, os tubos foram colocados no incubador pelo menos 30 minutos antes da inoculação.

O valor R foi dado pela seguinte equação:

$$R = \frac{n_0}{n_1} \cdot 10^{k(t_1 - t_0)}$$

n_0 e n_1 são as populações microbianas a tempo inicial (t_0) e a tempo t_1 respectivamente (ver fig.3).

Todos os cálculos foram feitos por computador. A leitura dos dados é feita pelo programa principal descrito no apêndice.

D. Isolamento de Culturas Predominantes.

Após a obtenção do crescimento exponencial nos tubos de incubador de temperatura gradiente, tomou-se uma amostra com alça de platina, semeou-se por esgotamento em placas de Petri contendo o meio solidificado de MCT para obtenção de colônias separadas. As colônias predominantes foram transferidas para meio M_1 inclinado a fim de proceder a posterior testes bioquímicos e fisiológicos para identificação preliminar das

microorganismos.

E. Identificação Preliminar de Microrganismos Predominantes.

Os testes realizados para a identificação preliminar foram: catalase, comportamento em *n.t.t.f.* (U.S. Department of Agriculture, 1974), coloração de Gram e motilidade.

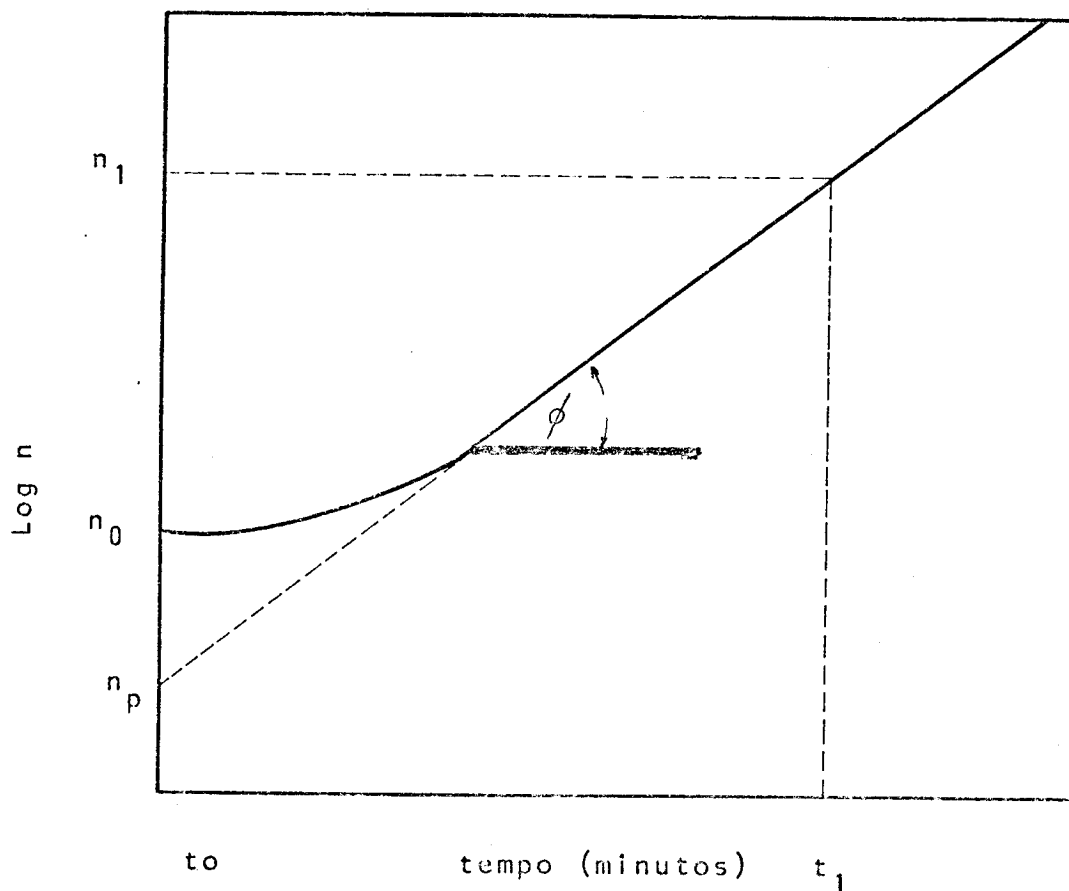


FIGURA n°3. Curva de Crescimento Bacteriano, nas ordenadas o n_0 , nº de células e o tempo de incubação nas abscisas.

F. Desenvolvimento da Relação Absorbância versus número de bactérias.

Foram selecionadas algumas linhagens para se estabelecer a relação entre a absorbância e o número de microrganismos como mostra a tabela 1.

Essas linhagens eram bactérias em bastonetes Gram negativos, isolados dos tubos de incubador gradiente.

TABELA Nº1. Relação das linhagens utilizadas no trabalho, absorbância e número de bactérias.

Linhagens	Absorbância	nº de bactérias/ml $\times 10^7$
1	0.4	80
2	0.4	76
3	0.4	130
4	0.4	42
5	0.4	52
		média $\frac{52}{76}$

A relação linear encontrada para os diferentes linhagens pode ser vista na figura 4.

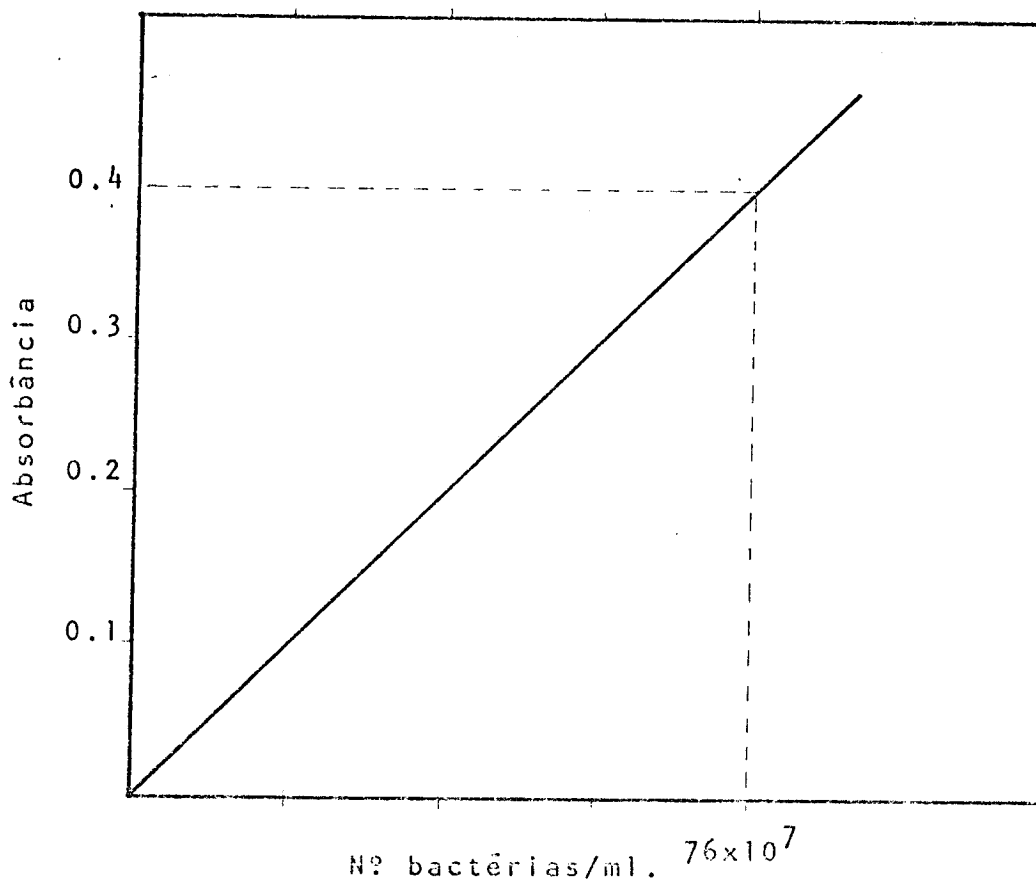


FIGURA Nº 4. Relação entre absorbância e número de células/ml.

A relação mostrada na figura 4 foi utilizada para estabelecer a transformação do valor de absorvância em número de bactérias por ml nos ensaios deste trabalho.

Para uma leitura de 0.4 de absorvância a média foi de 76×10^7 bactérias/ml, portanto a relação entre absorvância/nº de bactérias apresentou um valor de 0.05×10^{-8} que foi a constante para converter os valores de absorvância em logaritmo do número de bactérias.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Característica dos microorganismos contidos no músculo.

Todas as amostras foram submetidas a contagens totais, de modo de permitir uma avaliação de qualidade microbiológica da pescada fogueite armazenada em gelo.

Os resultados encontrados em meio M.C.T. e a uma temperatura de incubação de 20°C e expressos em logaritmo do número de bactérias por cm² para pele, variaram de 5.42 a 11.45, ao passo que para quebras, o número de bactérias por grama expressos em logaritmo variou de 5.03 a 10.35, conforme mostra a tabela 2.

TABELA Nº 2. Contagens Totais das Amostras de Quebras e Pele em meio M.C.T. a 20°C., expressas em logaritmo do número de germes por grama para quebras e logaritmo do número de germes por cm² para pele.

Fonte	Repetições	Tempo de armazenamento em gelo				
		0-2 dias	2-4 dias	4-6 dias	6-8 dias	8-10 dias
Quebras	1	4.03	6.47	7.34	7.92	9.01
	2	4.61	5.11	6.26	8.23	8.69
	3	4.79	6.01	7.05	9.05	12.57
	4	6.13	8.96	9.81	11.94	11.13
	5	5.61	6.18	7.35	9.66	-
	média	<u>5.03</u>	<u>6.55</u>	<u>7.56</u>	<u>9.36</u>	<u>10.35</u>
Pele	1	4.24	5.68	8.14	9.05	11.48
	2	4.93	5.34	8.29	8.66	9.72
	3	5.21	6.95	7.79	10.45	-
	4	7.42	8.47	9.07	11.17	11.57
	5	5.31	8.61	8.61	12.17	13.03
	média	<u>5.42</u>	<u>7.01</u>	<u>8.38</u>	<u>10.29</u>	<u>11.45</u>

Forem encontradas contagens mais altas para pele, comparados com os dados encontrados na literatura (Shaw, 1960), devido ao tipo de amostragem utilizado pois com o método aqui empregado, retira-se a pele e uma porção do músculo de uma só vez, juntamente com toda população microbiana já existente, ao passo que, nos métodos clássicos, a remoção dos microorganismos de pele dificilmente era completa.

Foram isoladas 720 cepas de bactérias distribuídas em 360 cepas poro quebras e 360 poro pele. Esses cepas constituíam de linhagens predominantes nas subculturas em tubos incubados a diferentes temperaturas no incubador gradiente. De acordo com a tabela 3 as bactérias em bastonetes Gram negativos foram encontradas em maior porcentagem (76.8%), seguida de cocos Gram positivos (11.1%) e bacilos Gram positivos (7.1%). Por último os cocos Gram negativos foram encontrados em menor porcentagem (5%).

Predominaram os microorganismos cocos Gram positivos para os tubos incubados às temperaturas extremas; menores de 22°C e maiores de 37.5°C. No primeiro caso houve predominância de células esféricas bastante pequenas, no outro extremo, a temperaturas maiores de 37.5°C, predominaram os cocos Gram positivos, ocorrendo em pares ou tetrades.

Na faixa de 26-36°C, houve melhor crescimento de microorganismos em bastonetes Gram negativos. Estes isolamentos foram efetuados quando a absorbância do tubo de incubação atinge a uma leitura de 0.4 a 0.8, ou seja após alcançar um certo crescimento no incubador de temperatura gradiente.

A reação de catalase positiva foi observada na maioria de bastonetes Gram negativos. Nenhum bactéria em cocos Gram positiva apresentou catalase negativa.

TABELA No. 3 Características morfológicas e fisiológicas das Bactérias Isoladas em meio m.C.T. a 20°C. Resultados expressos em número de cepas isoladas.

Fonte	Gram		Cocos		Mobilidade		Catalase	
	Bastonetes (+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Quebras	30	273	35	22	323	37	262	98
Pele	21	200	45	14	300	60	323	37

(+) reação positiva (-) reação negativa

Considerando que o peixe foi armazenado por algum tempo em gelo (máximo 10 dias) é fácil compreender a importância dos microrganismos capazes de crescerem em condições de baixas temperaturas e serem os principais encarregados de deterioração, especialmente aqueles produtores de H_2S e não fermentativos. Isto foi confirmado nesse ensaio como mostra a Tabela 4 que apresenta um maior número de cepas produtoras de H_2S e não fermentativas.

TABELA Nº 4. Comportamento das Bactérias Isoladas em meio I.A.T.F. a $20^{\circ}C$. Resultados expressos em número de cepas.

Fonte	H_2S		Fermentativas	Não Fermentativas
	(+)	(-)		
Quebras	221	139	128	232
Pele	235	125	148	212

(+) Reação positiva

(-) Reação negativa

Os resultados aqui apresentados mostram que as bactérias predominantes nos tubos de incubador gradiente são em geral aquelas responsáveis pela deterioração de pescado armazenado no gelo. Isso vem indicar a validade do método turbidimétrico proposto neste trabalho para avaliar o grau de deterioração desse produto.

2. Avaliação do método de Estimativa Baseado na curvatura da densidade.

As tabelas de 5 a 8 mostram os resultados para os parâmetros R e k em pele e quebras. Esses resultados indicam que a contagem feita com incubação a temperatura de $20^{\circ}C$ pode ser avaliada pelo método aqui proposto, incubado na faixa de temperatura de $23-36^{\circ}C$, pois os valores mais consistentes foram encontrados nessas temperaturas.

Os valores dos parâmetros k e R foram similares para as amostras de quebras e de pele. Os valores de k variaram entre 3 a 5

para as temperaturas mais baixas de incubação (26 e 29°C) e entre 5 a 7 para as temperaturas altas (35 a 38°C). Nas amostras de peixe congeladas por períodos longos (6 a 10 dias) no gelo, havia tendência de apresentar os valores de R dos tubos incubados a temperatura mais baixa, que nas amostras recém capturadas. Isso indica que nas amostras congeladas no gelo, as bactérias capazes de desenvolver a temperatura de 26-29°C estavam em estado de crescimento. Essa tendência não foi observada nos tubos incubados a 35-38°C.

Os valores de k variaram entre 0.0095/min e 0.015/min para tubos incubados a temperatura de 26 e 29°C e de 0.0085/min a 0.020/min para os tubos incubados a temperatura de 35 a 38°C.

Havia uma pequena tendência em aumentar o valor de k obtido a temperaturas baixas com o congelamento das amostras no gelo. Por outro lado, mostrou uma redução marcante no valor de k obtido às temperaturas de 35-38°C. Isso é explicado pelo aparecimento de predominância de bactérias psicrófilas e nas amostras congeladas no gelo.

TABELA Nº 5
VALORES DE LOG. DE R. H. N. ESTIMATIV. BACTERIOL. EM PELE

		TEMPERATURAS °C														
		17.5	20.0	22.0	23.5	25.0	26.5	27.5	28.0	30.5	32.0	33.5	35.0	36.0	38.0	40.0
0-2 DIAS	1	0.82	2.07	-0.24	-0.24	2.15	-0.24*	-0.24*	1.91*	1.91*	6.41	6.71	9.67	9.42	9.06	5.08
	2	0.22	1.52	0.90	1.24	2.50	1.19*	0.23*	6.97	4.69	3.20	4.18	3.79	4.01	6.14	3.61
	3	37.37	37.37	1.00	0.46	5.58	37.37*	5.34	5.83	4.69	3.85	4.67	6.18	6.69	5.29	7.22
	4	1.33	3.46	2.57	2.68	3.46	2.93	2.93	3.38	4.61	5.63	6.07	7.36	8.42	8.31	5.59
	5	0.26	2.32	1.18	1.24	1.84	2.50	3.23	0.17*	0.17*	4.57	6.63	4.67	5.67	4.68	5.74
	x	-	-	-	-	-	2.72	3.83	5.39	4.66	4.73	5.65	6.33	6.84	6.70	5.45
2-4 DIAS	1	3.95	4.40	4.35	3.19	3.14	1.83*	0.73*	1.50*	5.10	6.79	3.46	6.15	7.41	6.71	6.24
	2	0.31	0.62	0.18	3.42	2.43	2.91	0.31*	0.18*	37.31*	5.73	4.08	4.25	4.96	6.15	3.45
	3	0.84	1.72	0.29	1.52	2.95	5.64	3.14	2.60	4.71	5.63	3.89	4.22	3.43	4.03	5.77
	4	0.52	2.09	1.82	2.05	2.60	2.27	2.42	2.81	3.44	3.62	5.29	4.92	4.70	8.46	5.91
	5	1.30	1.43	1.62	2.51	3.21	2.62	3.98	0.44*	3.01	1.95*	4.11	4.50	4.28	4.37	4.12
	x	-	-	-	-	-	3.36	3.18	2.71	4.09	5.44	4.17	4.93	4.96	5.95	5.10
4-6 DIAS	1	2.64	2.57	37.37	5.66	37.31	3.25	6.59	6.53	8.08	4.58	6.49	6.84	5.50	9.45	9.11
	2	2.42	3.45	1.51	2.25	2.51	2.11	2.97	2.72*	3.86	5.59	6.01	7.93	7.09	8.53	8.80
	3	2.27	2.95	1.69	3.91	1.48	1.39*	2.10	1.94*	2.18	2.50	2.93	3.67	4.76	4.67	3.70
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	1.73	1.52	1.31	1.65	1.76	2.27	1.69*	2.10	3.47	2.42	3.17	5.03	4.35	4.28	4.74
	x	-	-	-	-	-	2.54	3.89	3.78	4.40	3.77	4.65	5.87	5.43	6.73	6.59
6-8 DIAS	1	2.78	1.97	1.20	1.75	1.64	1.83	1.25*	2.11	2.03	1.56*	3.13	2.63	3.18	5.90	7.19
	2	3.34	2.44	3.18	2.34	2.01	2.39	2.55	2.55	2.82	3.63	2.20	4.54	4.66	7.47	9.75
	3	0.66	1.36	1.51	1.91	1.75	1.91*	1.67*	1.65*	1.56*	1.36*	2.57	5.25	4.68	4.20	5.27
	4	1.38	1.58	1.74	1.63	1.63	1.65*	1.77*	1.71*	1.70*	2.10	2.04	3.13	2.51	2.81	3.72
	5	2.20	1.58	2.26	1.53	1.27	1.38*	2.36	2.20	2.10	1.89*	2.75	3.82	4.10	4.57	6.25
	x	-	-	-	-	-	2.04	2.46	2.29	2.32	2.87	2.66	3.87	3.83	5.03	6.44
8-10 DIAS	1	1.43	1.47	19.30	1.75	1.75	2.45	15.26*	2.83	1.75*	19.81*	1.83*	1.82*	3.05	0.53*	0.89*
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	1.79	4.08	1.30	1.24	1.87	1.61*	2.81	1.70*	2.00	1.67*	3.02	3.24	2.90	4.59	4.04
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.78	-	-

(**) VALORES NÃO COMPUTADOS NA MÉDIA.

TABELA No. 6

VALORES DE LOG. DE R PARA ESTIMATIVA BACTERIANA EM GUELDAS

TEMPERATURA		TEMPERATURAS °C														
TEMPERATURA		17.5	20.0	22.0	23.5	25.0	26.5	27.5	29.0	30.5	32.0	33.5	35.0	36.0	38.0	40.0
TEMPO DE INCUBAÇÃO	REPETIÇÕES															
0-2 DIAS	1	6.17	3.51	0.27	3.91	5.07	7.87	34.33*	9.11	7.72	9.85*	10.99*	7.23	10.50*	6.37	9.97
	2	0.31	2.24	0.09	1.16	1.95	6.05	6.80	33.48*	5.17	5.62	5.53	4.94	6.17	5.51	8.00
	3	6.10	0.86	37.34	10.62	5.36	5.30	4.57	3.93	2.63*	6.22	8.49	6.20	6.11	3.32*	27.72*
	4	4.91	5.56	37.35	37.34	37.33	4.54	5.09	5.45	6.42	7.09	6.27	7.36	7.00	7.52	5.92
	5	-0.11	1.29	1.33	1.63	1.95	1.64*	2.81	5.05	6.63	4.76	8.12	9.00	8.22	9.61	8.37
	x	-	-	-	-	-	5.94	5.49	4.81	6.49	5.93	7.10	7.05	7.03	7.25	8.07
2-4 DIAS	1	2.92	6.75	2.49	4.45	4.21	3.71	3.05	4.25	5.16	6.98	5.13	10.09*	5.29	9.23	6.59
	2	-0.15	1.00	2.09	2.21	2.8	3.11	5.61	4.13	33.56*	8.44	4.68	4.24	6.75	37.35*	9.96
	3	1.96	2.06	5.72	8.24	3.95	4.21	4.22	4.55	5.01	6.59	7.66	8.48	6.87	4.90	7.19
	4	4.54	2.62	4.63	4.41	3.58	3.23	2.55	3.42	3.44	4.77	6.53	8.49	9.63	10.88*	13.56*
	5	4.21	5.05	2.75	3.02	1.54	2.20	3.44	4.46	3.52	4.52	5.03	4.50	6.43	4.69	6.68
	x	-	-	-	-	-	3.29	3.79	4.16	4.28	5.72	5.81	6.43	6.99	6.27	7.61
4-6 DIAS	1	4.94	4.44	5.53	6.92	4.76	5.24	5.38	5.85	5.63	2.97	2.17	3.55	37.35*	29.77*	4.97
	2	1.08	4.58	1.70	2.75	2.73	1.45*	1.70*	5.29	5.12	6.57	6.30	6.52	7.50	8.52	11.01*
	3	2.53	1.37	31.13	4.44	4.79	1.29*	3.03	2.92	3.45	4.31	5.33	5.84	5.44	5.95	7.78
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	3.98	2.61	1.87	3.67	2.61	3.15	3.40	3.14	2.90	29.76*	7.03	8.78	9.28	23.15*	34.80*
	x	-	-	-	-	-	4.20	3.94	4.30	4.28	4.62	5.21	6.17	7.41	7.24	7.91
6-8 DIAS	1	3.68	2.93	2.95	2.95	2.39	2.42	2.31	2.16	2.50	3.11	2.88	2.47*	8.04	4.78	2.42
	2	3.27	3.30	3.02	4.66	4.80	3.97	4.15	2.81	4.12	4.43	5.79	7.30	37.35*	37.33*	2.92
	3	1.00	1.78	1.72	2.12	2.42	2.62	2.90	3.20	3.06	4.13	5.17	7.09	6.10	10.68*	10.43*
	4	24.85	1.93	3.46	1.95	2.45	2.33	3.60	2.89	2.89	4.22	7.37	8.95	37.35*	2.42	2.46
	5	2.33	1.65	1.63	1.79	1.77	2.74	2.10	2.27	2.02	2.64	2.99	8.35	8.25	10.07*	10.87*
	x	-	-	-	-	-	2.82	3.01	2.67	2.82	3.71	4.98	7.92	7.46	3.60	2.61
8-10 DIAS	1	19.77	2.69	1.58	1.97	1.31	1.95*	2.40	1.97*	2.54	1.69*	2.02	2.68	3.07	1.08	37.37*
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	1.73	2.17	1.62	2.14	2.51	1.48*	2.25	2.67	1.97*	1.84*	1.69*	2.65	3.42	4.20	3.62
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	x	-	-	-	-	-	-	2.33	-	-	-	-	2.67	3.25	-	-

(* VALORES NÃO COMPUTADOS POR DIA)

TABELA Nº7

VALORES DE k (min⁻¹) PARA ESTIMATIVA BACTERIANA EM PELE

TEMPO DE EXPOSIÇÃO EM DIAS	TEMPERATURAS °C														
	17.5	20.0	22.0	23.5	25.0	26.5	27.5	29.0	30.5	32.0	33.5	35.0	36.0	38.0	40.0
0-2 DIAS	1	.00286	.00516	.00001	.00001	.00516	.00001*	.00001*	.00516*	.01206	.01263	.01574	.01909	.01938	.01222
	2	.00555	.00573	.00516	.00458	.00317	.00516*	.00573*	.01456	.01032	.00987	.00998	.01055	.01642	.00990
	3	.00335	.00395	.00286	.00301	.01456	.00395*	.01453	.01215	.01135	.01362	.01857	.02206	.01746	.01512
	4	.00322	.00302	.00639	.00317	.00860	.00528	.00585	.00640	.00863	.01120	.01408	.01671	.02024	.01495
	5	.00573	.00577	.00286	.00516	.00452	.00683	.01032	.00454*	.00935	.01345	.01019	.01308	.01090	.01326
	Σ	-	-	.00286	.00516	-	.00606	.00927	.01196	.01028	.01036	.01273	.01520	.01660	.01024
2-4 DIAS	1	.00329	.00917	.00936	.00621	.00648	.00817*	.00639*	.00727*	.01364	.00655	.01240	.01581	.01555	.01300
	2	.00204	.00516	.00454	.01198	.00639	.00683	.00516*	.00454*	.01463	.01140	.00662	.01231	.01574	.00972
	3	.00400	.00539	.00454	.00322	.00337	.01190	.00618	.01185	.01234	.00930	.01174	.00874	.01035	.01365
	4	.00465	.00389	.00373	.00445	.00364	.00508	.00541	.00617	.00741	.00757	.01142	.01050	.01050	.01050
	5	.00479	.00477	.00666	.00881	.01124	.00919	.01397	.00573*	.00597	.00636*	.00879	.00931	.00931	.00992
	Σ	-	-	.00666	.00881	-	.00825	.00852	.00762	.00843	.01205	.00946	.01084	.01133	.01307
4-6 DIAS	1	.00516	.00516	.00385	.01115	.01118	.00361	.01236	.01324	.00831	.01175	.01210	.01053	.01061	.01008
	2	.00516	.00379	.00516	.00597	.00668	.00317	.00936	.00570	.00985	.01070	.01639	.01530	.01178	.01097
	3	.00443	.00575	.00387	.01383	.00379	.00468*	.00496	.00727*	.00515*	.00551	.00777	.01036	.01089	.00987
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	.00476	.00388	.00452	.00574	.00817	.00792	.00587*	.00731	.01273	.00938	.00664	.01004	.01025	.01175
	Σ	-	-	-	-	-	.00637	.00923	.00875	.01315	.00920	.01178	.01156	.01288	.01462
6-8 DIAS	1	.01110	.01065	.00639	.01074	.00891	.00994	.01148*	.01255	.00929*	.01472	.00761	.00847	.01605	.01885
	2	.00784	.00645	.00000	.00523	.00719	.01124	.01198	.01198	.00932	.01092	.01005	.01002	.01007	.02000
	3	.00390	.00917	.00936	.01198	.00557	.01198	.01032*	.00660*	.00917*	.00336	.01152	.01025	.01054	.01282
	4	.00317	.00513	.00565	.00305	.00507	.00512*	.00903*	.00559*	.00427*	.00602	.00719	.00563	.00600	.00579
	5	.00902	.00630	.00936	.00522	.00494	.01333*	.00981	.00907	.00804	.00761*	.00378	.00979	.01138	.01568
	Σ	-	-	-	.00522	-	.01105	.01090	.01120	.01003	.01065	.00853	.00884	.01201	.01535
8-10 DIAS	1	.00570	.00596	.01652	.01185	.01072	.01397	.01172*	.01636	.01072*	.00930*	.01009*	.00816	.00301*	.00301*
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	.00334	.01641	.00624	.00614	.01039	.00821*	.01120	.00945*	.01119	.00642*	.00775	.00302	.01204	.01007
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Σ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.01010	-	-

(*) VALORES NAO COMPUTADOS PARA MEDIA

TABELA Nº 8

VALORES DE k (min⁻¹) PARA ESTI NATIVA BACTERIANA EM GUELDAS

TEMPO DE ARZEMBILITO EM DIAS	REPETIÇÕES	TEMPERATURA °C														
		17.5	20.0	22.0	23.5	25.0	26.5	27.5	29.0	30.5	32.0	33.5	35.0	36.0	38.0	40.0
C-2 DIAS	1	.01198	.00745	.00516	.00778	.01024	.01478	.11536*	.01909	.01787	.02264*	.02519*	.01743	.02492*	.01933	.01910
	2	.00516	.00917	.00301	.01333	.00701	.01304	.01813	.11823*	.01530	.01869	.01933	.01742	.02150	.01933	.02301
	3	.01140	.00516	.11990	.02314	.01265	.01237	.01077	.01001	.00932*	.01830	.02492	.01794	.01768	.00306*	.12374*
	4	.00931	.01148	.11479	.11647	.11924	.01230	.01517	.01619	.01934	.02099	.01865	.02326	.02157	.02134	.01352
	5	.00301	.00286	.00286	.00516	.00400	.00535*	.01522	.01030	.01514	.01144	.01981	.02191	.02335	.02335	.01903
	Σ	-	-	-	-	-	.01367	.01482	.01390	.01757	.01728	.02053	.01959	.02020	.02094	.01867
2-4 DIAS	1	.00516	.01523	.00753	.01092	.01321	.00997	.00851	.01171	.01359	.01739	.01255	.02072*	.01168	.01948	.01440
	2	.00301	.00656	.00727	.00701	.00777	.00917	.01435	.01376	.10713*	.01995	.01171	.01287	.01728	.12052*	.03186
	3	.00727	.00632	.01219	.01598	.00885	.02942	.01033	.01302	.01330	.01876	.02368	.02309	.02042	.01536	.02344
	4	.00879	.00521	.00930	.00915	.00720	.00672	.00727	.00713	.00772	.02993	.01360	.01895	.02072	.00328*	.02444*
	5	.00346	.01043	.00936	.00636	.00516	.00886	.00745	.00961	.00815	.01075	.01237	.01195	.01754	.01244	.01630
	Σ	-	-	-	-	-	.00781	.00958	.01105	.01082	.01540	.01458	.01719	.01753	.01576	.01528
4-6 DIAS	1	.01276	.01359	.01437	.02116	.01785	.01964	.02016	.02192	.02109	.01119	.00317	.00307	.12052*	.07993*	.01149
	2	.00516	.00917	.00516	.00578	.00817	.01032*	.01116*	.01100	.01154	.01445	.01483	.01535	.01822	.01945	.02253*
	3	.00496	.00727	.11536	.00865	.00959	.01842*	.00714	.00669	.00740	.00950	.01209	.01366	.01365	.01440	.01872
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	.00095	.00929	.00535	.01037	.00929	.00396	.00967	.01117	.01032	.11020*	.01896	.02275	.02497	.11020*	.10121*
	Σ	-	-	-	-	-	.01430	.01232	.01270	.01254	.01835	.01351	.01496	.01895	.01693	.01574
6-8 DIAS	1	.01449	.01296	.01523	.01523	.01337	.01355	.01294	.01213	.01065	.01438	.01213	.00672	.02172	.01232	.00692
	2	.00778	.00731	.00717	.01110	.01198	.00861	.00929	.01333	.01021	.01182	.01332	.01573	.12339*	.10212*	.00636
	3	.00219	.00283	.00563	.00437	.00517	.00500	.00736	.00758	.00658	.00917	.01303	.01524	.01401	.02371*	.02493*
	4	.00849	.00500	.01043	.00625	.00574	.00723	.01146	.00831	.00741	.01174	.01721	.02038	.11479*	.01784	.00770
	5	.00784	.00741	.00660	.00551	.00750	.01110	.00932	.00708	.00866	.01032	.01021	.02054	.02106	.02575*	.02319*
	Σ	-	-	-	-	-	.00926	.01001	.00969	.00870	.01161	.01318	.02054	.01893	.00603	.00676
8-10 DIAS	1	.07305	.01182	.02737	.01072	.02614	.01065*	.01436	.00921*	.01281	.00796*	.00946	.00386	.00937	.00516	.11536*
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	.01022	.01204	.00375	.01090	.01293	.00729*	.01157	.01307	.01035*	.00795*	.00539*	.00835	.01084	.01080	.01351
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Σ	-	-	-	-	-	-	.01297	-	-	-	-	.00861	.00761	.00798	-

(* VALORES NÃO CONSIDERADOS PARA A DETERMINAÇÃO)

As tabelas 9 e 10 apresentam os tempos em horas necessários para que a absorvância cumente de 0.1 pontos no aparelho Spectronic 20. Esses mostram que os resultados com suspensões bacterianas da pele (tabela 10) apresentam-se mais consistentes em virtude de serem mais uniformes às contaminações, comparada com as guebras

Com os dias de armazenamento em gelo, o tempo para alcançar uma absorvância de 0.1 diminui em ambos os casos.

Os resultados dos estudos aqui apresentados mostram que a avaliação da contaminação pode ser feita por técnica do aumento de absorvância pela incubação dos tubos inoculados em tempo inferior a 8 horas. Os parâmetros k e R da curva de crescimento devem ser conhecidos para que o método seja aplicável com certa segurança. Controlando a temperatura de incubação dos tubos, pode-se distinguir a contaminação de pescado por bactérias psicrófilas e mesófilas. No presente caso as temperaturas adequadas de incubação variam respectivamente de $26.5 - 27^{\circ}\text{C}$ e $35 - 36^{\circ}\text{C}$.

TABELA 9. Tempo (em horas) necessários para atingir uma absorbância Δ de 0.10 nas amostras de quebras.

Tempo de armazenamento no gelo	Repetições	Temperaturas de Incubação (°C)			
		26.5	27.5	35.0	36.0
0-2 dias	1	9.00	8.75	6.75	6.75
	2	8.25	6.25	4.50	4.50
	3	7.00	6.50	5.25	5.25
	4	5.75	5.50	5.25	5.25
	5	8.75	8.50	6.25	6.25
	media	7.75	7.10	5.60	5.60
2-4 dias	1	6.00	5.25	7.00	6.75
	2	8.25	7.50	6.25	6.75
	3	6.75	6.25	5.00	6.25
	4	7.25	5.50	7.25	7.00
	5	8.00	7.75	5.75	5.50
	media	7.25	6.45	6.25	6.45
4-6 dias	1	4.00	4.00	7.00	7.75
	2	7.75	7.75	6.00	6.50
	3	-	-	-	-
	4	5.25	5.25	4.00	7.25
	5	5.25	4.75	5.50	5.50
	media	5.56	5.44	5.63	6.75
6-8 dias	1	3.00	3.00	5.00	6.00
	2	4.75	4.50	6.50	6.75
	3	4.00	5.00	6.75	7.00
	4	2.50	2.75	4.00	4.25
	5	-	-	-	-
	media	3.56	3.81	5.56	6.00
8-10 dias	1	2.75	2.75	4.00	4.00
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	4.25	4.00	6.00	6.00
	5	-	-	-	-
	media	3.50	3.38	5.00	5.00

TABELA 10. Tempo (em horas) necessários para atingir uma absorvância Δ de 0.10 nas amostras de pele.

Tempo de armazenamento no gelo	Repetições	Temperaturas de Incubação (°C)			
		26.5	27.5	35.0	36.0
0-2 dias	1	9.75	9.25	8.00	8.00
	2	8.25	8.25	6.00	7.75
	3	8.25	8.25	6.00	6.00
	4	8.50	10.00	7.25	5.25
	5	8.00	8.00	7.50	5.00
	Media	8.55	8.75	6.95	6.10
2-4 dias	1	8.50	8.00	8.25	7.75
	2	8.25	6.75	6.75	7.25
	3	8.25	5.25	7.00	6.25
	4	7.50	6.25	8.25	7.75
	5	6.25	9.00	7.00	5.00
	Media	7.75	7.05	7.45	6.80
4-6 dias	1	9.25	7.50	7.00	7.25
	2	6.75	5.50	7.00	7.25
	3	-	-	-	-
	4	7.25	4.25	5.25	5.50
	5	6.50	3.00	3.00	5.75
	Media	7.75	5.06	5.56	4.00
6-8 dias	1	5.50	4.00	4.50	5.00
	2	5.75	5.25	7.50	5.75
	3	4.00	3.75	5.00	5.00
	4	5.00	4.50	8.00	4.50
	5	-	-	-	-
	Media	5.06	4.00	6.25	5.06
8-10 dias	1	2.75	2.75	3.00	4.75
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	2.25	3.75	2.00	3.00
	5	-	-	-	-
	Media	2.50	3.25	2.50	3.50

REFERENCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1966. *Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 2nd ed. American Public Health Association. New York, N.Y.
-
- _____. 1972. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 13th ed. American Public Health Association, Inc., New York, N.Y.
- BEDFORD, R.H. 1933. Marine Bacteria of the Northern Pacific Ocean. The Temperature Range of Growth. *Contrib. Can. Biol. Fish.* 7: 431-438.
- DIFCO. 1974. *Supplementary Literature*. Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.
- DUFOUR, A.P. e GABELLI, V.J. 1975. Membrane Filter Procedure for enumerating the Component Genera of the Coliform Group in Seawater. *App. Microb.* 29: 826-833.
- FAVERO, M.S., Mac DADE, J.J., ROBERTSEN, J.A., HOFFMAN, R.K. e EDWARDS, R.W. 1968. Microbiological Sampling of Surfaces. *J. Appl. Bact.* 31: 336-343.
- FUJITA, T., NUMONAKA, K. 1968. New Turbidimetric Device for measuring Cell Concentrations in Thick Microbial Suspensions. *Appl. Microbiol.* 16: 212-215.
- HORSLEY, R.W. 1973. The Bacterial Flora of the Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) in Relation to its Environment. *J. Appl. Bact.* 36: 377-386.
- INSALATA, N.F., DORKER, E. e HARROW, S.L. 1967. The Need and Perspectives for Rapid Microbiological Test Methods. *Food Technol.* 2: 141-144.
- JEDLIČKA, G.J., HILL, W.M. e HECK, J.G. 1975. A Reflectance Method for the Enumeration of Surface Bacteria. *J. Food Sc.* 40: 647-648.
- KUROKAWA, M., HATANO, M., KASHIWAGI, N., SAITO, T., ISHIDA, S. e HONMA, R. 1962. A New Method for the Turbidimetric Measurement of Bacterial Density. *J. Bacteriol.* 83: 14-19.
- LAWANNA, C. e NALLETTE, M.F. 1965. *Basic Bacteriology*. 3rd Ed. The William and Wilkins Co., Baltimore, Md.

- LlSTON, J. 1956. Quantitative Variations in the Bacterial Flora of Flatfish. *J. Gen. Microbiol.* 15: 305-314.
- _____. 1960. The Bacterial Flora of Fish Caught in the Pacific. *J. Appl. Bact.* 23: 469-470.
- Mac LEOD, R.A., WHITE, L.A. e CURRIE, J.F. 1970. Detection of ferobacter aerogenes by labeling with Radioactive Phosphorus. *Appl. Microb.* 19: 701.
- MATCHES, J.R. e LlSTON, J. 1973. Temperature-Gradient Incubator for the Growth of Clostridia. *Can. J. Microbiol.* 19: 1161-1165.
- MEREK, E.L. 1969. Estimating the Size and Concentration of Unicellular Microorganisms by Light Scattering. *Appl. Microb.* 17: 219-221.
- MORGA, A.A. 1975. Avaliação do Índice de Frescor da Pescada Fogueite (Macrodon ancylodon) Conservada em Gelo. Tese Mestrado. Biblioteca da Fac. de Eng. de Alimentos e Agrícola. Unicamp, Campinas, S.P.
- NAKAE, T. 1966. Method of Temperature-Gradient Incubation and its Application to Microbiological Examinations. *J. Bacteriol.* 91: 1-6.
- OKAMI, Y. e SASAKI, Y. 1967. Temperature Gradient Tools. 1. Temperature Gradient Shaking Machine. *Appl. Microbiol.* 15: 1252-1255.
- OPPENHEIMER, C.H. e DROST-HANSEN, W. 1960. A relationship Between Multiple Temperature Optima for Biological Systems and the Properties of Water. *J. Bacteriol.* 80: 21-24.
- OXOID. 1971. The Oxoid Manual of Culture Media, Ingredients and Other Laboratory Services. 3rd ed. Oxoid Limited. London.
- PATON, A.M. e JONES, S.M. 1973. The observation of microorganisms on Surface by Incident Fluorescence microscopy. *J. Appl. Bact.* 36: 441-443.

- PREVITE, J.J. 1972. Radiometric Detection of Some Food-Borne Bacteria. *Appl. Microbiol.* 24: 535-539.
- SHEWAN, J.M. 1976. *The Bacteriology of Fresh and Spoiling Fish and the Biochemical Changes Induced by Bacterial Action.* Torry Research Station. England.
- _____, HOBBS, G. e HODGKISS, W. 1960. The Pseudomonas and Achromobacter Groups of Bacteria in the Spoilage of Marine White Fish. *J. Appl. Bact.* 23: 463-468.
- TAYLOR, W.I. e ACHANZAR, D. 1972. Catalase Test and an Aid to the Identification of Enterobacteriaceae. *Appl. Microbiol.* 24: 58-61.
- TEGERDY, R.P. NAGY, J.G. e MARTIN, B. 1967. Quantitative Measurement of Bacterial Growth by the Reduction of Tetrazolium Salts. *Appl. Microbiol.* 15: 954-955.
- U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Scientific Services. 1974. *Animal and Plant Health Inspection Service. Microbiology Laboratory Widebook.* Washington, D.C.
- WATANABE, K. 1962. Spoilage in Iced Pescada Fogueira (Macrodon ancylodon) from South Brazilian Fishing Grounds. *Bol. Inst. Oceanográfico, U.S.P.* 12: 65-77.
- WILLIAMS, M.L.B. 1967. A New Method for Evaluating Surface Contamination of Raw Meat. *J. Appl. Bacteriol.* 30: 498-499.
- WINTER, F.H., YORK, G.K. e EL-NAKAL, H. 1971. Quick Counting Method for Estimating the Number of Viable Microbes on Food and Food Processing Equipment. *Appl. Microbiol.* 22: 89-92.
- YOKOYA, F., CANHOS, P.V. 1975. Use of Growth Curve Parameters on Estimation of Microbial Population. *Intern. Conf. on Mechanized Microbiology.* Ottawa, Canada.
- _____, e ZULZKE, M.L. 1975. Method for Sampling Meat Surfaces. *Appl. Microbiol.* 29: 551-552.

PROGRAMA UTILIZADO PARA OS CALCULOS DE k e R

```

SUBROUTINE REGRES(IMIN,IMAX,J)
COMMON/DADO/C1,C2,YDADO(100,50),XDADO(100)
SX=0.
SY=0.
SX2=0.
SXY=0.
N=IMAX-IMIN+1
DO 10 I=IMIN,IMAX
SX=SX+XDADO(I)
SY=SY+YDADO(I,J)
SX2=SX2+XDADO(I)**2
10 SXY=SXY+XDADO(I)*YDADO(I,J)
DENO=N*SX2-SX**2
C1=(SY*SX2-SX*SXY)/DENO
C2=(N*SXY-SX*SY)/DENO
RETURN
END

```

FUNÇÃO PARA ACHAR O PONTO MÍNIMO DO INTERVALO DA RETA $Y = C1 + C2X$

```

FUNCTION INFE(MAIOR,TOL)
COMMON/BLOCO/XDE(100)
IF(MAIOR.EQ.1)GO TO 1
DO 10 I=MAIOR-1,1,-1

```

```

10 IF(ABS((XDE(I)-XDE(MAIOR))/XDE(MAIOR)).GT.TOL)GO TO 2
I=0.
INFE=I+1
RETURN
END

```

FUNÇÃO PARA ACHAR O PONTO MÁXIMO DO INTERVALO DA RETA $Y = C1 + C2X$

```

FUNCTION ISUP(MAIOR,MAX,TOL)
COMMON/BLOCO/XDE(100)
IF(MAIOR.EQ.MAX)GOTO 1
DO 10 I=MAIOR+1,MAX

```

```

10 IF(ABS((XDE(I)-XDE(MAIOR))/XDE(MAIOR)).GT.0.)GO TO 2
I=MAX+1
ISUP=I-1
RETURN
END

```

PROGRAMA PRINCIPAL

```

DIMENSION RESULT(3,50),TITULO(80),RESTO(50),TEMP(50)
COMMON/BLOCO/XDE(100)
COMMON/DADO/C1,C2,YDADO(100,50),XDADO(100)

```

```

READ(2,1)NEXP,NTUB,IMT,ITEMP,TOL,CONST
READ(2,3)(TEMP(I),I=1,NTUB)
WRITE(3,15)NEXP,NTUB,IMT,ITEMP,TOL,CONST
DO 100 I=1,NEXP

```

```
TYPE 1000
```

```
FORMAT(' ',1P'PASO 1')
```

```
READ(2,2)NLEI,XNO
```

```
WRITE(3,16)NLEI,XNO
```

```
READ(2,11)(TITULO(I),I=1,80)
```

```
READ(2,3)(RESTO(I),I=1,NTUB)
```

```
READ(2,3)((YDADO(I,J),J=1,NTUB),I=1,NLEI)
```

```
WRITE(3,6)((YDADO(I,J),J=1,8),I=1,NLEI)
```

```
WRITE(3,14)
```

```
WRITE(3,7)((YDADO(I,J),J=9,NTUB),I=1,NLEI)
```

CLAVAZÃO DOS INTERVALOS DE LEITURA

```
XDADO(1)=0.
```

```
DO 10 I=2,NLEI
```

```
XDADO(I)=XDADO(I-1)+ITEMP
```

SUBTRAÇÃO DA LINHA DO VETOR RESTO

```
DO 20 J=1,NTUB
```

```

20  YDADO(1,J)=ABS(YDADO(1,J)-RESTO(J))
    SUBTRACÇÃO DAS OUTRAS LINHAS DA LINHA 1
DO 300 J=1,NTUB
AUX=YDADO(1,J)
DO 200 I=2,NLEI
YDADO(I,J)=ABS(YDADO(1,J)-AUX)
IF(YDADO(I,J).EQ.0.)YDADO(I,J)=0.01
200  CONTINUE
IF(YDADO(1,J).EQ.0.)YDADO(1,J)=0.01
300  CONTINUE
DO 50 J=1,NTUB
NLI=NLEI
INT=INT
DO 400 I=1,NLEI
IF(YDADO(I,J).GT.0.6)GO TO 12
400  YDADO(I,J)=ALOG10(YDADO(I,J)/CONST)
NLI=NLEI
GO TO 13
12  IF(I.LE.5)INT=INT-2
NLI=NLI-1
    ROTINA DE CALCULO DAS DECLIVIDADES DAS (NLI INT) RETAS
13  DO 30 I=1,NLI-INT
CALC REGRES(I,I+INT,J)
30  XDE(I)=C2
    ROTINA PARA ACHAR MAIOR DECLIVIDADE
AUX=XDE(1)
MAIOR=1
DO 40 I=2,NLI-INT
IF(AUX.GT.XDE(I))GO TO 40
AUX=XDE(I)
MAIOR=I
10  CONTINUE
IMIN=INFE(MAIOR,TOL)
IMAX=ISUP(MAIOR,NLI-INT,TOL)+INT
    CHAMADA FINAL PARA CALCULO DA RETA Y= C1+C2X
18  WRITE(3,18)IMIN,IMAX,NLI,INT
FORMAT(' ',2X,'IMIN=',I3,'IMAX=',I3,2X,'NLI=',I3,'INTER=',I3)
CALC REGRES(IMIN,IMAX,J)
RESULT(1,J)=C1
RESULT(2,J)=C2
50  RESULT(3,J)=XNO*10**-(C2*XDADO(IMAX))/YDADO(IMAX,J) => R
WRITE(3,4)(TITULO(1),I=1,80)
WRITE(3,6)((YDADO(I,J),J=1,8),I=1,NLEI)
WRITE(3,14)
WRITE(3,7)((YDADO(I,J),J=9,NTUB),I=1,NLEI)
WRITE(3,14)
WRITE(3,6)((RESULT(1,J),J=1,8),I=1,3)
WRITE(3,14)
WRITE(3,7)((RESULT(1,J),J=9,NTUB),I=1,3)
WRITE(3,14)
100  CONTINUE
1  FORMAT(4I,F,E)
2  FORMAT(I,F)
3  FORMAT(15F)
4  FORMAT('1',23X,'RESULTADOS PARA ',80A1)
6  FORMAT(' ',8E)
7  FORMAT(' ',7E)
11  FORMAT(80A1)
14  FORMAT(///)
15  FORMAT(' ',5X,'DADOS DE ENTRADA',4I5,F,E)
16  FORMAT(' ',2X,'NUMERO LEITURAS=',I3,' XNO=',E,///)
STOP
END

```