



T/UNICAMP
D167c
BCCL

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CÁLCULO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO
MICROBIANO POR COMPUTADOR

Sérgio Roberto Dall'Oca
Engº Mecânico

Orientador:

Dr. Fumio Yokoya

Professor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ÍNDICE

	página
I - INTRODUÇÃO.....	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	14
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
V - CONCLUSÕES.....	57
VI - APÊNDICE I.....	58
VII - APÊNDICE II.....	59
VIII - APÊNDICE III.....	68
IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

RESUMO

Através do uso de computador digital foi desenvolvida uma função para a relação da densidade óptica e a densidade celular. A equação da hipérbole mostrou ser a que melhor se ajustava.

A partir desta relação foi desenvolvido um programa de computador para a obtenção das constantes de crescimento e equação de Arrhenius. Pela comparação dos valores da temperatura característica μ obtida pelo computador a aquela obtida manualmente, verificou-se uma boa concordância entre ambas.

SUMMARY

It was established a relationship between turbidity (optical density) and cell mass, by the use of a digital program. The hyperbolic function demonstrated to be the best fit.

After this it was developed a computer program to obtain the growth rate constant and Arrhenius equation. By comparing the values of temperature characteristics " μ " obtained by the computer and that one obtained by hand, very closely values were found.

INTRODUÇÃO

Para medição rápida da densidade celular, o método da turbidimetria é comumente utilizado, depois de se estabelecer uma relação entre a densidade óptica e a massa celular. Comumente isto é feito através de um gráfico e pela medida das densidades ópticas obtem-se a massa celular. Até o presente, não foi definida uma função adequada para toda porção da curva da relação entre a densidade óptica e massa celular.

Uma vez obtida a densidade óptica, que é uma função da densidade celular, a diversos intervalos de tempo de incubação, pode-se determinar a curva de crescimento de qualquer microrganismo. A velocidade específica de crescimento (k) é calculada a partir da porção exponencial da curva de crescimento. Tomando-se a curva de crescimento a várias temperaturas tem-se diferentes valores de k , que podem ser analisados pela curva de Arrhenius.

Este tipo de experimento é essencial no estudo da fisiologia dos microrganismos, principalmente com relação ao efeito da temperatura em seu crescimento.

Entretanto, o método convencional é muito complexo e lento e todos os gráficos e cálculos são feitos manualmente. O uso de programas de computador pode reduzir o tempo de trabalho e aumentar a precisão nos cálculos.

O presente trabalho apresenta um programa de computador que calcula os parâmetros de crescimento celular. Para tanto, foi desenvolvida uma equação que adapta adequadamente à relação densidade óptica e a densidade celular de uma suspensão de microrganismos. A seguir foi desenvolvido o programa para determinar a velocidade específica de crescimento, k , e finalmente a curva de Arrhenius.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Crescimento Microbiano

O crescimento microbiano é acompanhado tanto por um aumento no número de células como por aumento da massa do protoplasma celular.

Lamanna e Malette (1965) definiram a expressão "crescimento" como sendo a adição de novas substâncias ao protoplasma da célula do microrganismo ou aumento da massa do protoplasma. O aumento no número de células é definido como multiplicação. No presente trabalho, a atenção foi voltada na medida do "crescimento" microbiano, isto é, no aumento da massa do protoplasma celular.

MÉTODOS DE MEDIDA

Os métodos usuais para a estimativa do crescimento ou aumento do protoplasma podem ser listados brevemente como a seguir:

A. Métodos Diretos

São os que medem algum parâmetro de volume do protoplasma ou algum constituinte do mesmo.

Massa Úmida - Representada por total de conteúdo do protoplasma, inclusive água, a parede celular e a água intercelular. É medida por centrifugação de um volume conhecido de cultura, onde as células são depositadas e após a retirada do sobrenadante procede-se à pesagem da massa celular, obtém-se, desse modo, a quantidade da massa do protoplasma por unidade de volume da cultura.

Massa Seca - Representada por total de sólidos do protoplasma, da parede celular e da cápsula ou substância extracelular.

Pode ser determinada repetindo-se as etapas descritas para obtenção de massa úmida e secando-se as células de modo a retirar toda a água. A vantagem deste método sobre o anterior é que ele é mais preciso, visto que a influência da água na massa é difícil de ser determinada.

Nitrogênio - As células são lavadas para remover todos os constituintes nitrogenados do meio de cultura. O nitrogênio das células é então determinado por processos analíticos usuais para determinação quantitativa desse elemento.

Outros componentes podem ser usados para a medida de crescimento celular. Assim, poderia ser feito determinando-se a quantidade de ácidos nucleicos, proteínas, etc.

B. Métodos Indiretos

Medidas do consumo de metabólitos ou acumulação de produtos metabolizados são, também, utilizados para avaliar a quantidade de protoplasma bacteriano. O consumo de oxigênio e a produção de ácidos de um carboidrato fermentável tem sido utilizado como estimativa do crescimento do protoplasma bacteriano.

Turbidimetria - Uma suspensão de bactérias apresenta o efeito de Tyndall igual a qualquer sistema coloidal. Então, tanto a absorbância como a dispersão da luz pode ser usada para medir a quantidade de protoplasma bacteriano.

Para o seu emprego na suspensão bacteriana admite-se que a Lei de Beer-Lamberdt seja aplicável. Essa Lei relaciona a quantidade de luz absorvida por um soluto e é expressa quantitativamente pela expressão:

$I = I_0 e^{-kcl}$; onde "I" é a intensidade de um fecho de luz depois de passado através da solução, "I₀" é a intensidade da luz incidente, "e" é a base do logarítmo natural, "k" é uma constante característica do soluto, "c" é a concentração do soluto e "l" é o comprimento da

trajetória da luz através da solução.

Aplicando-se o logarítmo decimal à expressão acima obtem-se:

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \frac{kcl}{2.303} \approx acl \quad (1)$$

onde "a" é chamado absorbância, absorvidade, índice de extinção ou densidade óptica.

Na prática, a equação (1) é satisfeita pelo menos sobre uma determinada concentração da substância. A medição das intensidades da luz é feita geralmente em colorímetros ou espectofotômetros. Estes instrumentos marcam a intensidade da luz que atravessa a cubeta com suspensão celular de célula fotoelétrica sensível a variação de intensidade da luz.

Nas concentrações elevadas de células a Lei de Beer e Lamberdt não é aplicável devido ao desvio considerável da linealidade. Kurohawa e outros (1962) propoz uma forma para superar essa dificuldade. O método consiste em considerar a linealidade até o valor da densidade óptica de 0,5 e para valores mais elevados utilizar a aproximação $0,6 + \log (1 - T)$; onde T é a transmitância da suspensão.

2. Velocidade de Crescimento

A. Fases de Crescimento

Transferindo uma bactéria para um meio adequado e incubando em condição favorável, ela irá crescer e multiplicar até chegar a um ponto de crescimento máximo de população. Depois do ponto máximo de população que pode durar de alguns minutos a dias, haverá um declínio, indo à extinção.

O desenvolvimento de uma cultura bacteriana pode ser estudado convenientemente separando-a em diversas fases consecutivas. Segundo Monod (1942), o crescimento de uma cultura microbiana pode ser dividido nas seguintes fases:

Fase de Latência Inicial. - Também chamada de ajuste ou fase "lag", é a fase onde praticamente não existe crescimento. Nesta fase o organismo transferido ao meio novo se organiza para iniciar o crescimento. Uma série de reações de adaptação, como indução e repressão, ocorrem nesse momento.

Fase Exponencial. Também chamada de fase logarítmica, é a fase que sucede a fase de latência e é caracterizada por um rápido desenvolvimento da cultura bacteriana. Durante a fase exponencial o crescimento do protoplasma e a multiplicação celular seguem uma proporção constante, portanto ao se medir um pode-se calcular o outro.

Fase de Decréscimo. É a fase que sucede a fase exponencial. Sempre ocorre, ou por exaustão de alimento, ou por acúmulo de substâncias tóxicas. Desde que esses fenômenos ocorram gradualmente numa cultura, não existe uma quebra na curva de crescimento, mas uma diminuição gradativa da declividade até chegar à fase seguinte.

Fase Estacionária. A exaustão de nutrientes e o acúmulo de substâncias tóxicas chega a parar o crescimento da cultura bacteriana, caracterizando-se a presente fase.

Fase de Declínio. A fase estacionária é seguida por uma fase de decréscimo na população. Existe, até o presente momento, muito pouco estudo sobre a fase de declínio. Acredita-se que o acúmulo de substâncias tóxicas e criação de condições adversas à sobrevivência das células são as principais responsáveis por este fenômeno.

B. Parâmetros de Crescimento

Tempo de Geração Média (g). Desde que a bactéria multiplica-se por fissão binária, cada duplicação do número de bactérias em uma cultura representa uma geração.

Conhecendo-se, portanto, o número de microrganismos no início e no fim de um período de incubação de uma cultura, pode-se calcular o número de gerações ocorridas nesse período.

Se y for o número de células de microrganismo no fim de um período de tempo e x o número da mesma no início e " n " o número de gerações ocorridas neste período, a equação seguinte é válida.

$$y = x2^n \quad (2)$$

tomando-se o logarítmo

$$\log_{10} y = \log_{10} x + n \log_{10} 2$$

$$n = \frac{\log_{10} y/x}{\log_{10} 2} = \frac{\log_{10} y/x}{0,301} \quad (3)$$

Se quiser o período de tempo que se levou para que a população duplicasse ou "tempo de geração média" (g), divide-se o tempo dado pelo número de gerações ocorridas.

$$g = \frac{t}{n} \quad (4)$$

C. Constante de Crescimento

Um dos modelos de crescimento microbiano é o da síntese - autocatalítica do material celular. Uma célula inoculada em um meio nutriente começa a crescer em tamanho até que se divide em duas células irmãs semelhantes à célula mãe.

No modelo da síntese autocatalítica, a velocidade de formação celular é proporcional à massa, m , de células.

$$\frac{dm}{dt} = km \quad (5)$$

Integrando-se a equação acima obtem-se:

$$\ln \frac{m}{m_0} = kt \quad \text{ou} \quad m = m_0 e^{kt} \quad (6)$$

onde m_0 é a quantidade de material celular no começo do processo. Esta equação é chamada "lei logarítmica".

Uma locação do $\ln m/mo$ "versus" tempo, nos dá uma reta com declividade igual a k , que é definido como constante específica de crescimento.

3. Efeito da Temperatura no Crescimento Celular

Sendo o crescimento de um microrganismo uma reação bioquímica complexa, é difícil analisar a influência da temperatura na velocidade do mesmo. É interessante rever alguns problemas mais gerais do efeito da temperatura nos processos físicos e químicos.

A. Equação de Arrhenius

A equação de Arrhenius é usada comumente na cinética química para determinar a energia de ativação das reações químicas, e tem a seguinte forma:

$$k = A e^{-\frac{\Delta E}{RT}} \quad (7)$$

onde k é a velocidade de reação; A é uma constante; ΔE é a energia de ativação; R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta do sistema. Para os microrganismos, usa-se a equação de Arrhenius substituindo a velocidade de reação (k) pela velocidade de crescimento e determina-se a temperatura característica (μ) que é análoga à energia de ativação ΔE .

Se aplicarmos o logaritmo à equação (7), obtem-se:

$$\ln k = \ln A - \frac{\Delta E}{R} \frac{1}{T}$$

que é a equação de uma reta:

A representação gráfica do logaritmo neperiano de k "versus" o inverso da temperatura absoluta que se fez a incubação para as diferentes temperaturas mostra uma reta cuja declividade será $-\frac{\Delta E}{R}$. O valor de R é conhecido e depende da unidade que se utiliza; portanto, se C_2 for o declive da reta:

$$C_2 = - \frac{\Delta E}{R} \quad \text{ou} \quad \Delta E = - C_2 \cdot R \quad \mu = - C_2 \cdot R \quad (8)$$

O valor de μ pode ser explicado como o número de calorias necessárias para trazer todas as moléculas de um mol de reagente - para o estado de energia requerido para que a reação se processe.

O valor de " μ " tem sido utilizado em diversos trabalhos. Primeiramente tentou-se diferenciar bactéria mesófilas de psicrofílas baseado nesses parâmetros (Ingraham, (1958)). Shaw (1967) diferenciou leveduras mesófilas de psicrofílas através do valor " μ ". Ng, Ingraham and Marr (1962), anos depois, acharam valores diferentes dos valores calculados anteriormente para a mesma bactéria. Hanus e Morita (1967) explicaram que os valores de " μ " diferem por que os investigadores empregam meios de cultura diferentes para o mesmo microrganismo, e que é difícil comparar as bactérias através do valor de μ .

Yokoya (1974) usou " μ " para comparar o efeito do cloreto de sódio sobre o crescimento de Staphylococcus aureus e Canhos, V. P. (1975) comparou o efeito da concentração de etanol sobre o crescimento de bactérias acéticas através dos valores de " μ ".

B. Coeficiente de Temperatura (Q_{10})

Em muitas reações químicas, as constantes específicas de reação (k); obtidas a diferentes temperaturas mostram relações constantes. Assim sendo, isto pode ser expresso pelo coeficiente de temperatura

$$Q_{\Delta t} = \frac{k_{t_2}}{k_{t_1}}$$

O fenômeno acima é explicado como uma variação na população de moléculas contendo energia cinética suficiente para que a reação se processe com a mudança da temperatura. Quando $\Delta t = 10^\circ\text{C}$, teremos o valor de Q_{10} . Para reações fotoquímicas e radioativas o valor de Q_{10} é uma unidade, indicando pequena influência da temperatura em tais reações.

Para mudanças físicas Q_{10} varia entre 2 e 3, exceto para mudanças de viscosidade ou processos baseados em forças de superfície. Numa reação de degradação de proteínas o valor de Q_{10} é bastante elevado, chegando a ser de 10.000 ou maior para certas proteínas em certos intervalos de temperatura.

DESENVOLVIMENTO DAS EQUAÇÕES

1. Análise de Regressão

O objetivo desta secção não é o de compilar as fontes de literatura, mas dar uma descrição compreensiva dos princípios básicos empregados no presente trabalho. Os parágrafos seguintes descrevem a metodologia empregada nesta análise.

A. Método dos Quadrados Mínimos

É frequentemente necessário representar por uma relação funcional um certo número de dados que são coletados como pares ordenados (x, y) . Nos experimentos deste tipo, obtem-se conjuntos de valores de x e y . Se estes valores tiverem de ser utilizados em algum cálculo em computador, defrontam-se com uma série de problemas, a saber:

1. Haverá erros experimentais nos valores de y . Seria interessante proceder a avaliação de tais erros.
2. Poderíamos querer saber os valores de y correspondentes a algum x intermediário a dois valores de x experimentais.
3. Poderíamos desejar extrapolar, isto é, achar o valor de y correspondente a um x fora do intervalo dos valores experimentais de x .

Todas estas considerações nos levam à necessidade de uma relação funcional entre x e y através de uma fórmula e, se possível, de uma fórmula simples. A questão é achar uma curva que se aproxime dos dados experimentais com suficiente precisão.

Considere-se que a dispersão de um ponto dado é a diferença entre os valores experimentais e calculados da relação funcional. Tem sido demonstrado que o melhor método empregado para a solução de problemas desta natureza é através do método dos quadrados mínimos.

Seja y_i os pontos y correspondentes aos valores experimentais x_i . Então:

$$S = \sum_{i=1}^N (y_i - y'_i)^2 \quad (9)$$

Será menor quando as partes calculadas y'_i pela função que melhor se adaptou à curva for menor possível, ou seja, quando a curva ajustada $y_i = f(x_i)$ der resultados que melhor se aproximem dos pares ordenados experimentais (x'_i, y'_i) .

Se considerarmos $y_i = f(x_i)$ como sendo uma relação polinomial de grau M, teremos:

$$y_i = C_1 + C_2 x_i + C_3 x_i^2 + \dots + C_{M+1} x_i^M$$

para que a relação (9) seja mínima:

$$\frac{\partial S}{\partial C_1} = 0; \quad \frac{\partial S}{\partial C_2} = 0; \quad \dots; \quad \frac{\partial S}{\partial C_{M+1}} = 0$$

Feita as diferenciais tem-se um sistema de equações lineares da forma seguinte:

$$\begin{aligned} NC_1 + \Sigma x_1 C_2 + \dots + \Sigma x_1^M C_{M+1} &= \Sigma y_i \\ \Sigma x_1 C_1 + \Sigma x_1^2 C_2 + \dots + \Sigma x_1^{M+1} C_{M+1} &= \Sigma (x_i y_i) \\ \vdots &\vdots \\ \Sigma x_1^M C_1 + \Sigma x_1^{M+1} C_2 + \dots + \Sigma x_1^{2M} C_{M+1} &= \Sigma (x_i^M y_i) \end{aligned} \quad (10)$$

Tal metodologia pode ser aplicada a outras relações além da polinomial. Seja por exemplo a relação exponencial abaixo:

$$y = ax^b \quad (11)$$

Se for aplicada a técnica descrita acima diretamente tem-se um sistema de equações não lineares. Pode-se evitar esta dificuldade tomando os logarítmos.

$$\log y = \log a + b \log x \quad (12)$$

Agora, os quadrados mínimos das diferenças entre os logarítmos dos pontos experimentais de y e a expressão da direita na equação anterior é dada pela expressão:

$$S = (\log y_i - \log a - b \log x_i)^2 \quad (13)$$

Diferenciando em relação a a e b como anteriormente, obtem-se as seguintes equações:

$$N \log a + \sum (\log x_i) b = \sum (\log y_i)$$

$$\sum (\log x_i) \log a + \sum (\log x_i)^2 b = \sum (\log x_i \log y_i)$$

As incógnitas são log a e b, que quando achadas, nos darão os valores de a e b da equação (11).

B. Método da Eliminação de Jordan

Para solução do sistema de equação acima (10) existem uma série de métodos.

Um dos mais aplicados e que requer menor número de cálculos é o método da eliminação de Jordan (Nowosad, 1974) que descrevemos a seguir.

Dados m variáveis independentes $x_1, x_2, \dots, x_m$ e n variáveis dependentes $y_1, y_2, \dots, y_n$ que dependem linearmente das primeiras, isto é, tais que

$$y_i = a_{i1}x_1 + \dots + a_{im}x_m \quad (i = 1, 2, \dots, n) \quad (14)$$

a eliminação de Jordan consiste simplesmente em trocar os papéis de uma variável dependente e uma independente.

Por exemplo, se considerarmos o coeficiente a_{rs} diferente de zero ($a_{rs} \neq 0$) podemos eliminar a variável independente x_s na expressão:

$$y_r = a_{r1}x_1 + \dots + a_{rs}x_s + \dots + a_{rm}x_m \quad (15)$$

obtendo:

$$x_s = \frac{1}{a_{rs}} (y_r - a_{r1}x_1 - \dots - a_{rm}x_m) \quad (16)$$

Substituindo-se agora esta expressão de x_s na expressão das variáveis y_i restantes, ficamos com:

$$y_i = a_{i1}x_1 + \dots + a_{i,s-1}x_{s-1} + a_{i,s+1}x_{s+1} + \dots + a_{i,m}x_m + \frac{a_{is}}{a_{rs}} (y_r - a_{r1}x_1 - \dots - a_{r,s-1}x_{s-1} - a_{r,s+1}x_{s+1} - \dots - a_{r,m}x_m) \quad (17)$$

Reagrupando os coeficientes vemos que o novo coeficiente de x_1 é $a_{i1} - \frac{a_{is}}{a_{rs}} a_{r1}$, o de x_2 é $a_{i2} - \frac{a_{is}}{a_{rs}} a_{r2}$, etc e o de y_r é $\frac{a_{is}}{a_{rs}}$, isto na expressão de y_i , para $i \neq r$, $i = 1, 2, \dots, n$

Se y_i for constante, então, o sistema de equações ficaria

$$\begin{aligned} a_{11}x_1 + \dots + a_{1n}x_n &= a_1 \\ \vdots & \\ a_{n1}x_1 + \dots + a_{nn}x_n &= a_n \end{aligned} \quad (18)$$

Se agruparmos o sistema da seguinte forma

$$\begin{aligned} 0 &= a_{11}x_1 + \dots + a_{1n}x_n - a_1 \\ 0 &= a_{21}x_1 + \dots + a_{2n}x_n - a_2 \\ \vdots & \\ 0 &= a_{n1}x_1 + \dots + a_{nn}x_n - a_n \end{aligned} \quad (19)$$

... e aplicarmos a eliminação de Jordan obteremos:

$$\begin{aligned} x_1 &= b_{11}x_0 + \dots + b_{1n}x_0 - b_1 \\ x_2 &= b_{21}x_0 + \dots + b_{2n}x_0 - b_2 \\ \vdots & \\ x_n &= b_{n1}x_0 + \dots + b_{nn}x_0 - b_n \end{aligned} \quad (20)$$

Portanto, a solução será:

$$\begin{aligned} x_1 &= b_1 \\ x_2 &= b_2 \\ \vdots & \\ x_n &= b_n \end{aligned} \quad (21)$$

MATERIAL E MÉTODOS

A. Desenvolvimento da curva DENSIDADE ÓPTICA versus DENSIDADE CELULAR

Foram selecionados alguns microrganismos para estabelecer a relação entre a densidade óptica e a massa celular seca, conforme mostra a tabela abaixo (Tabela 1).

TABELA 1 - Relação dos microrganismos utilizados neste trabalho - com as respectivas siglas dos meios e as temperaturas - de incubação.

(*) Ver apêndice I para composição dos meios.

MICRORGANISMOS	MEIO (*)	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)
<u>Staphylococcus aureus</u>	BHI	30
<u>Escherichia coli</u>	TSB	37
<u>Enterobacter aerogenes</u>	TSB	30
<u>Sarcina lutea</u>	TSB	30
<u>Bacillus megaterium</u>	TSB	37
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	TSB	37
<u>Sacharomyces cerevisiae</u>	BYMB	25

O meio preparado foi dividido em dois frascos, um dos quais foi inoculado com uma alçada de um dos microrganismos. O frasco inoculado foi incubado em agitador de temperatura controlada - (New Brunswick Scientific Mod. NBS-G 25) por 24 horas. As temperaturas de incubação de cada microrganismo estão na Tabela 1, e a agitação foi de 250 rpm.

Após a incubação, o seguinte método foi utilizado para a determinação da massa de células por 10 ml de cultura.

Com uma pipeta volumétrica retirou-se 10 ml da cultura e filtrou-se em uma membrana de acetato de celulose da "Millipore" com porosidade de 0,45 μ . Após a filtração fez-se a lavagem das células com aproximadamente 50 ml de água destilada.

O "blank" foi preparado utilizando-se o meio de cultura sem as células. Para cada microrganismo, foi repetido o procedimento acima duas vezes.

As membranas assim obtidas foram primeiramente secas em uma estufa a 55°C por 30 minutos depois colocadas em uma estufa a 110°C por 4 horas para a remoção total da água. Após a secagem, foram pesadas em uma balança analítica, e foram obtidos os seguintes valores:

MC = maior valor dos pesos das membranas com células

MM = maior valor dos pesos das membranas sem células

mc = menor valor dos pesos das membranas com células

mm = menor valor dos pesos das membranas sem células

O peso seco de células por ml de suspensão foi:

$$P = \frac{P_m}{10} = \frac{MC-MM}{10(mc-mm)}$$

Paralelamente determinou-se a densidade óptica (DO). Para isso foi utilizado o procedimento seguinte:

Vinte ml de suspensão foi centrifugado a 8.000 rpm (aproximadamente 10.000 g) por 10 minutos. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 20 ml de água destilada. Essa operação foi repetida mais uma vez, obtendo-se uma suspensão de células lavadas em 20 ml de água destilada. Em um balão volumétrico de 100 ml essa suspensão foi diluída cinco vezes, e em seguida foram retirados 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0 ml de suspensão que foram completados com 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ml de água destilada, respectivamente, em 11 tubos de ensaio de tal maneira que em cada tubo de ensaio havia 10 ml de suspensão diluída. A densidade óptica de cada uma destas suspensões foi lida em um espectrofotômetro, Spectronic 20 da Bausch & Lomb, e foram usados para tomada da DO tubos de ensaio de 11,8 milímetros de diâmetro interno.

Esses ensaios foram repetidos com tubos de colorímetros de diâmetro externo 17,0 mm e 22,5 mm. Como esses tubos necessitam de maiores volumes do material para proceder a leitura da densidade óptica, as diluições foram preparadas utilizando-se o dobro dos valores acima apresentados (volume total para cada tubo de 20 ml).

Através da aplicação do programa TESE 1 e por tentativa, diversas funções foram testadas para a relação D.O. versus densidade celular.

O programa TESE 1 descrito no apêndice II faz o ajuste de polinômios de até grau 10.

B. Desenvolvimento da Curva de Arrhenius

O estudo do crescimento em diferentes temperaturas foi feito em um incubador de temperatura gradiente com agitador da Scientific Industries Inc. Foram utilizados 30 (trinta) tubos em L, especiais para o aparelho e a tomada de densidade óptica foi feita de 15 em 15 minutos. A densidade óptica foi medida em um espectrofotômetro Espectronic 20 da Bausch & Lomb. O diâmetro do tubo foi de ϕ 17 mm e o comprimento de onda foi de 600 m μ .

Em cada tubo em L foram colocados 10 ml do meio apropriado. Aguardou-se cerca de 15 minutos para o perfeito equilíbrio de temperaturas. A leitura "blank" foi feita medindo-se a densidade óptica de cada tubo com meio de cultura sem ser inoculado com a célula. Após a inoculação com 1 ml de cultura preparada em um frasco Erlenmeyer e em um agitador por 12 horas e à temperatura de acordo com a Tabela 1, procedeu-se a leitura da densidade óptica dos trinta tubos anotando-se as leituras do tempo zero. Daí, prosseguiu-se o experimento fazendo as leituras de 15 em 15 minutos até que um ou mais tubos de cultura atingisse o valor de densidade óptica igual a 1,2.

As culturas permaneciam ainda por mais 24 horas no incubador e então eram feitas as leituras de máxima biomassa.

As D.O. resultantes da leitura no incubador gradiente foram corrigidas para densidade celular de acordo com a equação seguinte:

$$\text{Dens (A)} = \frac{A}{C_1 A + C_2}$$

onde C_1 e C_2 são os coeficientes da reta ajustada para a curva de calibração de acordo com o descrito no parágrafo anterior.

O crescimento microbiano pode ser descrito pela equação

$$\frac{dm}{dt} = km \quad \text{ou} \quad \ln \frac{m}{m_0} = kt \quad \text{ou} \quad \ln m = \ln m_0 + kt$$

indicando que representar em gráfico o logarítmo neperiano de m (densidade celular) versus o tempo existe pelo menos um intervalo de tempo em que tal curva é uma reta.

Os coeficientes da reta achados são

$$C_1 = \ln m_0$$

$$C_2 = k$$

A reta foi ajustada pelo computador através do uso do método dos quadrados mínimos para a porção da curva onde existe linearidade dentro de 10%. As figuras foram traçadas pelo computador IBM-1130 através de um traçador de gráficos ("plotter").

Para aplicar a equação de Arrhenius (equação 7) as temperaturas de incubação foram transformadas de graus centígrados para graus Kelvin, e foi achado o inverso. Os valores de C_2 foram considerados como valores de k desta equação, para os diversos organismos e, então, foi obtido o $\ln k$. Da representação gráfica de $1/T$ versus $\ln k$ foram obtidas curvas e como nestes vai haver um intervalo onde existe uma certa linearidade uma reta foi ajustada para este intervalo, utilizando para isto o método dos quadrados mínimos. Estas retas foram ajustadas pelo método convencional e pelo uso do computador. O programa que realizou os cálculos descritos acima está desenvolvido no apêndice III.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A. CURVA DA DENSIDADE ÓPTICA versus DENSIDADE CELULAR

Os resultados para a relação da densidade óptica (D.O.) versus densidade celular em peso seco de célula por ml estão apresentados nas Tabelas (2, 3, 4) para tubos de diâmetros iguais a 11,8; 17,0 e 22,5 mm.

O ajuste de polinômios a estes dados mostram uma proximidade do polinômio de grau 2 ou seja uma parábola de 2º grau dos dados experimentais, isto pode ser visto na figura 1. Como uma parábola tem a forma $Y = A + Bx + Cx^2$ e possui três coeficientes a saber A, B e C, não é uma boa curva para ser usada. Portanto, foi tentado uma função linear para a relação densidade óptica (D.O.) versus densidade celular (D.C.). Da representação gráfica de $1/D.O.$ versus $1/D.C.$ obtivemos uma aproximação muito boa da reta. Esta relação pode ser vista na figura 2 para os microrganismos estudados neste trabalho. Podemos notar que existe uma reta que passará muito próxima dos pontos locados. Os coeficientes das retas achadas através do computador para a relação $1/D.O.$ versus $1/D.C.$ estão apresentados na Tabela 5, para os diâmetros de tubos iguais a 11,8; 17,0 e 22,5 mm.

Da análise dos resultados da tabela podemos notar que quanto maior o diâmetro do tubo, maior o declive da reta ajustada para o inverso das variáveis. Como a reta ajustada para o inverso das variáveis é na realidade uma hipérbole, a função não é definida no ponto onde as D.C. ou D.O. forem iguais a zero. Mas isto não invalida o método uma vez que estamos interessados em medir a densidade celular ou seja um meio com pelo menos uma quantidade de células suspensas, e o "blank", ou seja, o meio de suspensão é tomado como o de D.O. igual a zero.

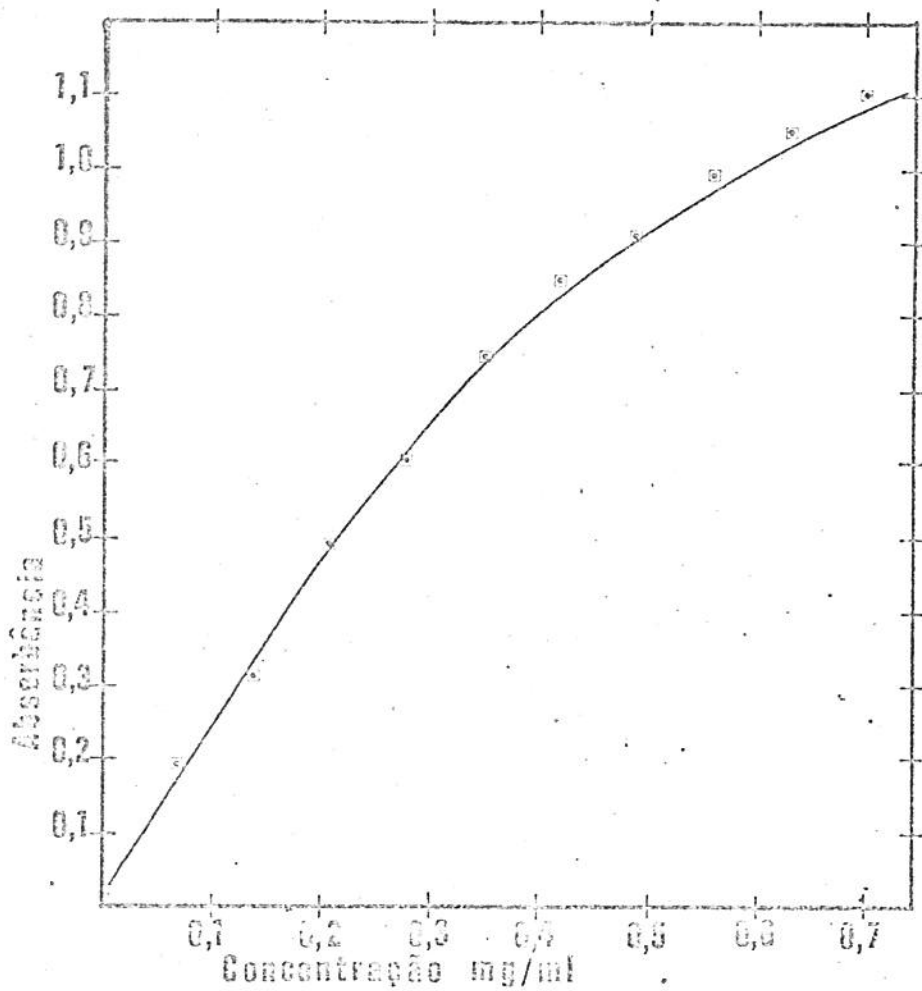
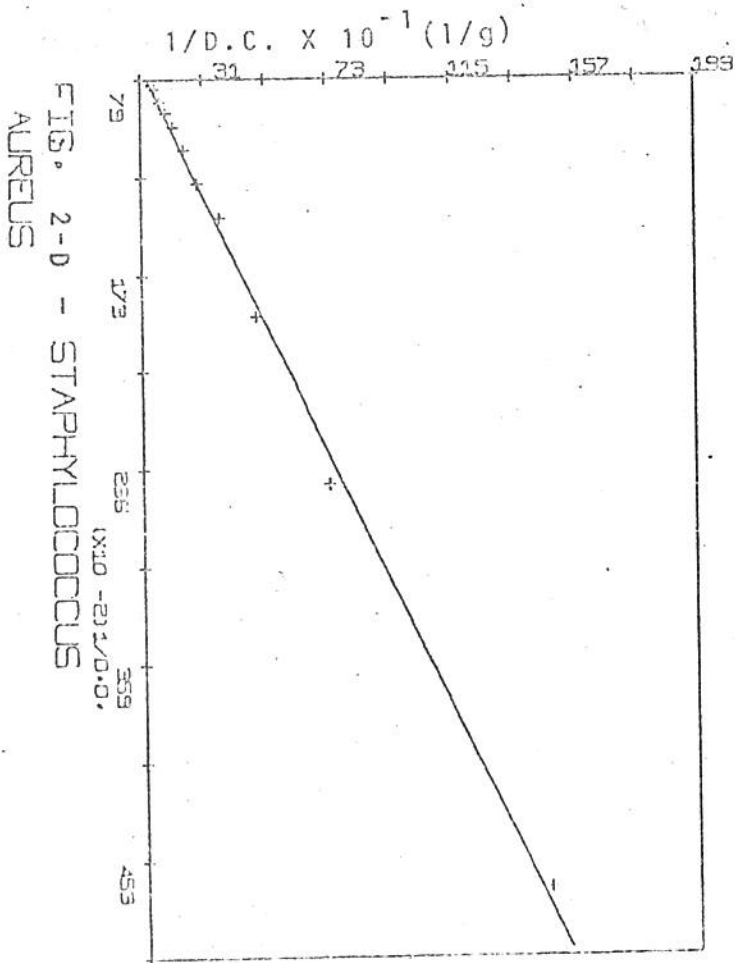
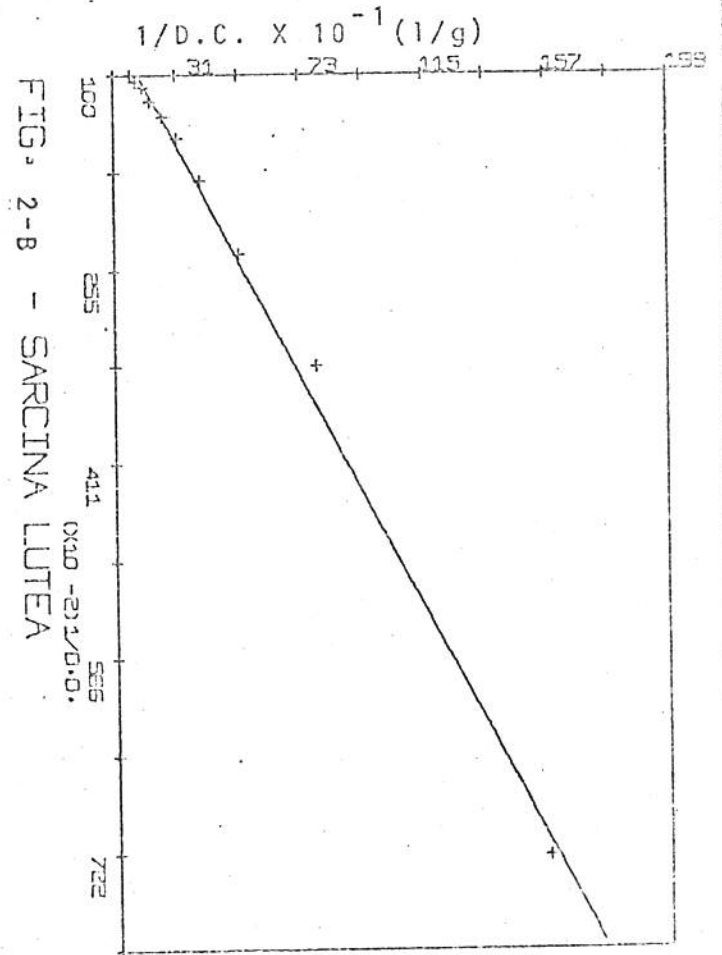
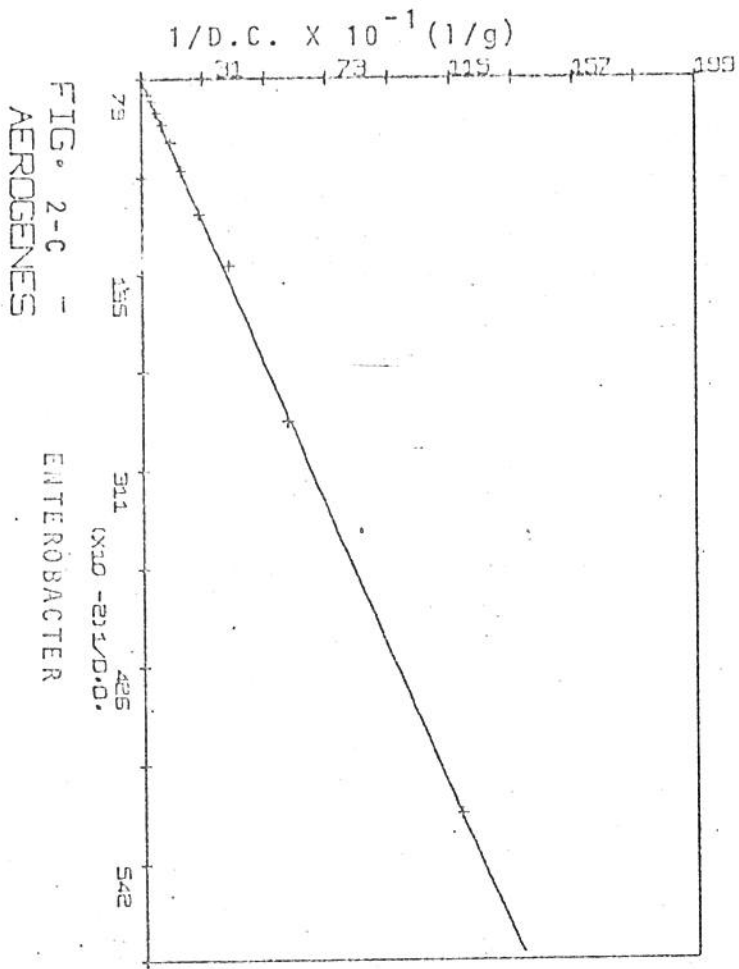
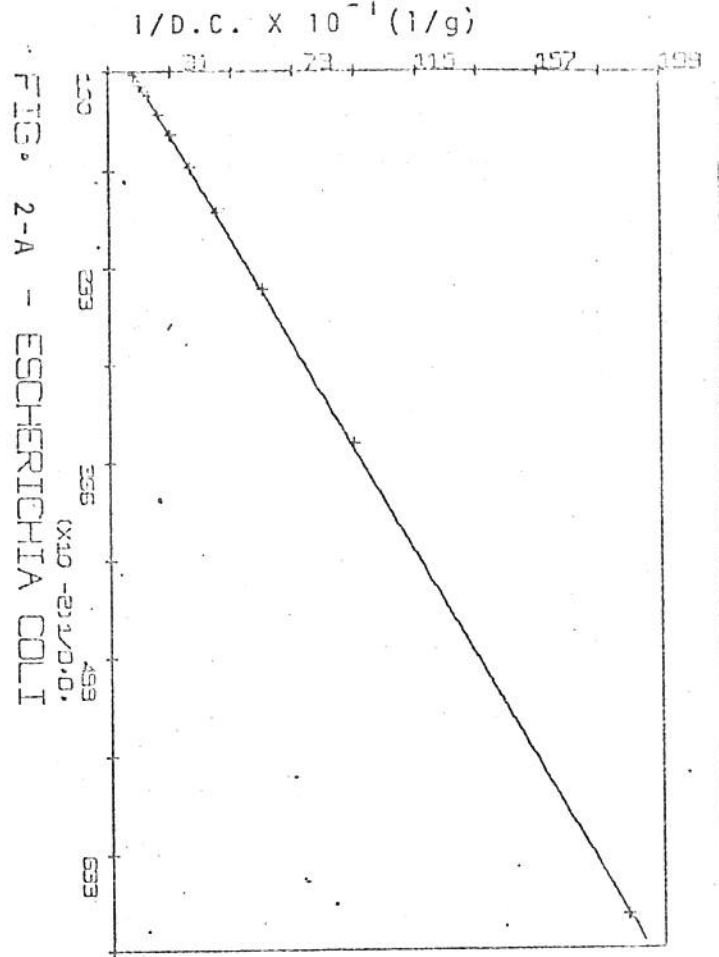


FIGURA 1 - Relação entre D.O. e D.C. peso de células secas (mg) por mililitros de suspensão de Escherichia coli. A curva apresentada é um ajuste de um polinômio do segundo grau.



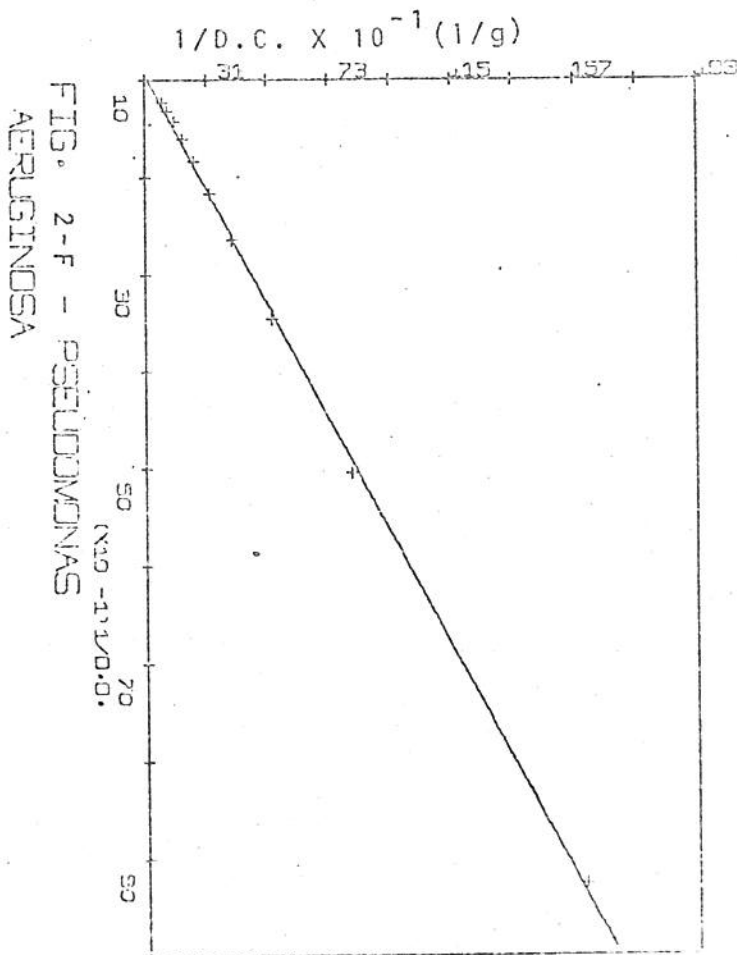
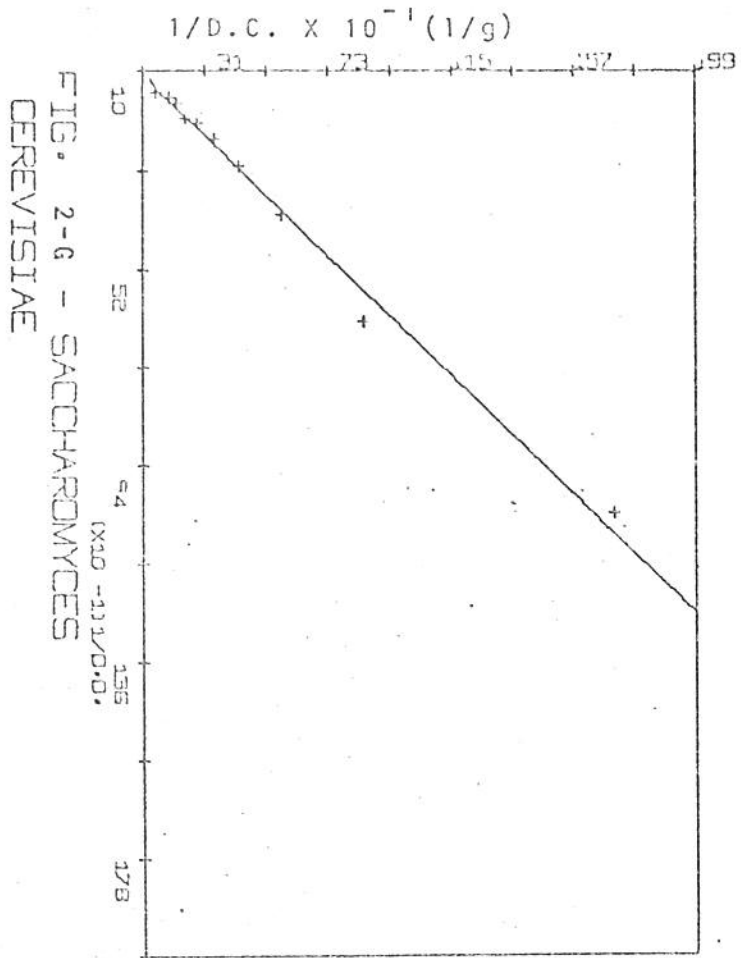
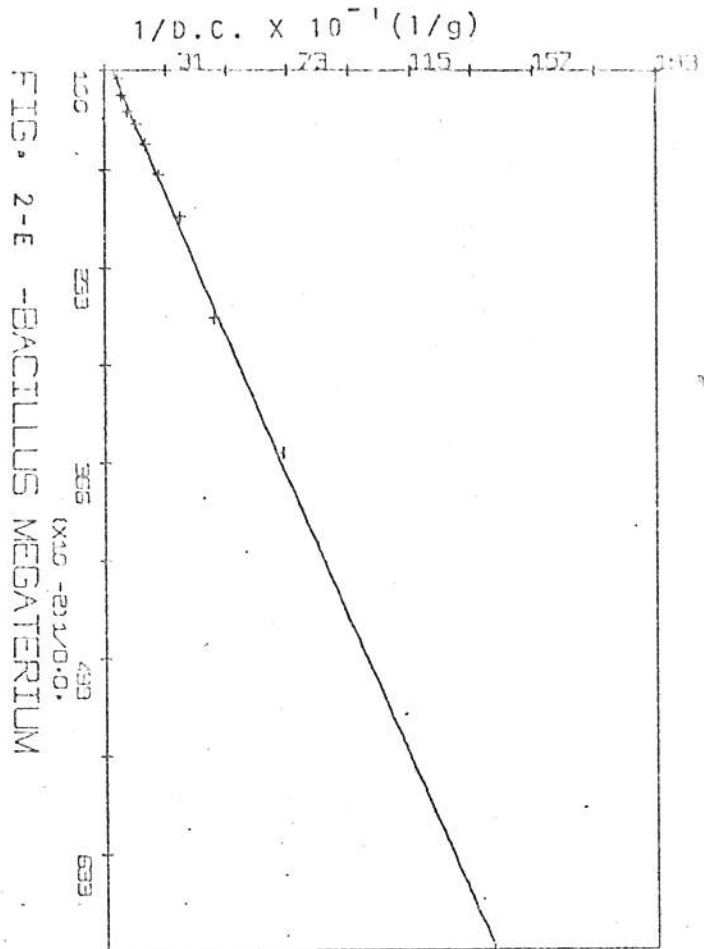


FIGURA 2 - Ajuste de uma reta à relação $1/D.O.$ e $1/D.C.$ para diâmetro do tubo = 11,8 mm feita pelo computador. Os gráficos foram feitos por um traçador de gráficos ("plotter") acoplado a um computador 1130 IBM.

TABELA 2- RESULTADOS PARA A RELACAO DENSIDADE OPTICA E DENSIDADE CELULAR
EM PESO DE CELULAS (G) POR LITRO DE SUSPENSAO PARA UM DIAMETRO DO TUBO =11.8 MM

C ENTEROBACTER	J D.C.	0.0839	0.1678	0.2517	0.3356	0.4195	0.5034	0.5873	0.6712	0.7551	0.8390
C AEROGENES	J D.O.	0.1950	0.3550	0.5250	0.6250	0.7500	0.8500	0.9300	1.0000	1.0800	1.1300
C SARCINA	J D.C.	0.0631	0.1262	0.1893	0.2524	0.3155	0.3786	0.4417	0.5048	0.5679	0.6310
C LUTEA	J D.O.	0.1380	0.3000	0.4120	0.5430	0.6660	0.7500	0.8300	0.9100	0.9550	1.0000
ESTAPHYLOCOCCUS	J D.C.	0.0674	0.1348	0.2022	0.2696	0.3370	0.4044	0.4718	0.5392	0.6066	0.6740
C AUREUS	J D.O.	0.2140	0.3650	0.5170	0.6850	0.7700	0.8800	0.9700	1.0400	1.1000	1.1800
C PSEUDOMONAS	J D.C.	0.0619	0.1238	0.1857	0.2476	0.3095	0.3714	0.4333	0.4952	0.5571	0.6190
C AERUGINOSA	J D.O.	0.1080	0.1980	0.2890	0.3780	0.4610	0.5430	0.6230	0.6980	0.7580	0.8130
C BACILLUS	J D.C.	0.0694	0.1388	0.2082	0.2776	0.3470	0.4164	0.4858	0.5552	0.6246	0.6940
C MEGATERIUM	J D.O.	0.1430	0.2780	0.3730	0.5030	0.5880	0.6680	0.7380	0.7880	0.8580	0.9480
C ESCHERICHIA	J D.C.	0.0532	0.1062	0.1596	0.2128	0.2660	0.3192	0.3724	0.4256	0.4788	0.5320
C COLI	J D.O.	0.1480	0.2830	0.4030	0.5130	0.6080	0.7030	0.7780	0.8680	0.9180	0.9730
C SACCCHAROMYCES	J D.C.	0.0583	0.1166	0.1749	0.2332	0.2915	0.3498	0.4081	0.4664	0.5247	0.5830
C CEREVISIAE	J D.O.	0.0950	0.1580	0.2480	0.3330	0.4080	0.4780	0.5080	0.6080	0.6580	0.7130

TABELA 3- RESULTADOS PARA A RELACAO DENSIDADE OPTICA E DENSIDADE CELULAR
EM PESO DE CELULAS (G) POR LITRO DE SUSPENSÃO PARA UM DIAMETRO DO TUBO =17,0 MM

ENTEROBACTER	J D.C.	0.0543	0.1086	0.1629	0.2172	0.2715	0.3258	0.3801	0.4344	0.4887	0.5430
AEROGENES	J D.O.	0.1800	0.3450	0.4930	0.6200	0.7350	0.8350	0.9150	0.9750	1.0450	1.0950
SARCINA	J D.C.	0.0635	0.1270	0.1905	0.2540	0.3175	0.3810	0.4442	0.5080	0.5715	0.6350
LUTEA	J D.O.	0.1970	0.3930	0.5570	0.7150	0.8250	0.9250	0.9950	1.0850	1.1450	1.1950
STAPHYLOCOCCUS	J D.C.	0.0705	0.1410	0.2115	0.2820	0.3525	0.4230	0.4935	0.5640	0.6345	0.7050
AUREUS	J D.O.	0.2250	0.4000	0.5850	0.7400	0.8400	0.9500	1.0300	1.0900	1.1700	1.2300
PSEUDOMONAS	J D.C.	0.0466	0.0932	0.1398	0.1864	0.2330	0.2796	0.3262	0.3728	0.4194	0.4660
AERUGINOSA	J D.O.	0.1460	0.2580	0.3710	0.4800	0.5780	0.6680	0.7380	0.8180	0.8780	0.9380
BACILLUS	J D.C.	0.0897	0.1794	0.2691	0.3588	0.4485	0.5382	0.6279	0.7176	0.8073	0.8970
MEGATERIUM	J D.O.	0.2180	0.3550	0.5380	0.6580	0.7680	0.8680	0.9380	1.0080	1.0680	1.1280
ESCHERICHIA	J D.C.	0.0697	0.1394	0.2091	0.2788	0.3485	0.4182	0.4879	0.5576	0.6273	0.6970
COLI	J D.O.	0.1960	0.3700	0.5360	0.6680	0.7780	0.8780	0.9580	1.0180	1.0880	1.1480
SACCHAROMYCES	J D.C.	0.0351	0.0702	0.1053	0.1404	0.1755	0.2106	0.2457	0.2808	0.3159	0.3510
CEREVISIAE	J D.O.	0.0700	0.1510	0.2180	0.2880	0.3680	0.4230	0.4930	0.5480	0.6230	0.6780

TABELA 4- RESULTADOS PARA A RELACAO DENSIDADE OPTICA E DENSIDADE CELULAR
EM PESO DE CELULAS (G) POR LITRO DE SUSPENSAO PARA UM DIAMETRO DO TUBO =22.5 MM

E ENTEROBACTER	J D.C.	0.0543	0.1086	0.1629	0.2172	0.2715	0.3258	0.3801	0.4344	0.4887	0.5430
E AEROGENES	J D.O.	0.2230	0.4080	0.5880	0.7280	0.8130	0.8980	0.9730	1.0280	1.0980	1.1480
E SARCINA	J D.C.	0.0635	0.1270	0.1905	0.2540	0.3175	0.3810	0.4445	0.5080	0.5715	0.6350
E LUTEA	J D.O.	0.2480	0.4880	0.6680	0.8380	0.9480	1.0480	1.1280	1.2080	1.2480	1.3180
ESTAPHYLOCOCCUS	J D.C.	0.0705	0.1410	0.2115	0.2820	0.3525	0.4230	0.4935	0.5640	0.6345	0.7050
E AUREUS	J D.O.	0.2730	0.4880	0.6930	0.8480	0.9580	1.0680	1.1480	1.2080	1.2680	1.3180
E PSEUDOMONAS	J D.C.	0.0466	0.0932	0.1398	0.1864	0.2330	0.2796	0.3262	0.3728	0.4194	0.4660
E AERUGINOSA	J D.O.	0.1580	0.3080	0.4380	0.5680	0.6880	0.7780	0.8730	0.9780	1.0280	1.0980
E BACILLUS	J D.C.	0.0897	0.1794	0.2691	0.3588	0.4485	0.5382	0.6279	0.7176	0.8073	0.8970
E MEGATERIUM	J D.O.	0.2730	0.4480	0.6280	0.7680	0.8880	0.9780	1.0680	1.1080	1.1980	1.2280
E ESCHERICHIA	J D.C.	0.0697	0.1394	0.2091	0.2788	0.3485	0.4182	0.4879	0.5576	0.6273	0.6970
E COLI	J D.O.	0.2550	0.4730	0.6600	0.8080	0.9380	0.9980	1.0980	1.1680	1.2180	1.2680
E SACCCHAROMYCES	J D.C.	0.0351	0.0702	0.1053	0.1404	0.1755	0.2106	0.2457	0.2808	0.3159	0.3510
E CEREVISIAE	J D.O.	0.0900	0.1780	0.2900	0.3880	0.4930	0.5580	0.6180	0.6980	0.7780	0.8380

TABELA 5 - Resultado dos cálculos feitos pelo computador para o ajuste da reta 1/D.O. e 1/D.C. para os diferentes microrganismos e diferentes diâmetros de tubos.

	$\phi = 22,5 \text{ mm}$		$\phi = 17,0 \text{ mm}$		$\phi = 11,8 \text{ mm}$	
	C_1	C_2	C_1	C_2	C_1	C_2
<u>Enterobacter aerogenes</u>	-1,98	4,57	-1,24	3,56	-0,99	2,51
<u>Escherichia coli</u>	-1,65	4,11	-1,09	3,04	-1,08	2,95
<u>Staphylococcus aureus</u>	-1,76	4,36	-1,35	3,48	-1,49	3,43
<u>Sarcina lutea</u>	-1,49	4,34	-0,98	3,34	-0,39	2,28
<u>Bacillus megaterium</u>	-1,72	3,45	-1,26	2,64	-0,90	2,19
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	-0,98	3,56	-1,47	3,30	-0,65	1,79
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	0,16	2,60	0,092	2,01	-0,71	1,64

B. CRESCIMENTO MICROBIANO

O resultado das leituras de D.O. feitas no incubador de temperatura gradiente corrigido para D.C. está apresentado na Tabela 6. Esta Tabela dá os valores de D.C. em função do tempo e da temperatura de incubação e foram feitas pelo computador. Os gráficos de $\ln$ D.C. "versus" o tempo para as diferentes temperaturas de incubação feitos pelo computador estão apresentados na figura 3. Analisando-se estes gráficos nota-se que existe uma parte da curva onde mostra uma certa linearidade. Levando em consideração esta linearidade e delimitando bem o intervalo de tempo onde isto ocorre, isto é, desprezando os pontos onde a linearidade não existe, a reta que aparece nas figuras foi traçada pelo computador através do método dos quadrados mínimos. Como pode-se ver, a reta se aproxima muito bem dos pontos da curva onde existe linearidade.

Os coeficientes da reta ajustada pelo computador estão apresentados na Tabela 7. Esta Tabela dá o valor de C_1 e C_2 para diferentes temperaturas e para os microrganismos estudados neste trabalho.

FIGURA 3 - Curvas de crescimento para algumas temperaturas e para os microrganismos estudados neste trabalho. Estas curvas foram traçadas por um traçador de gráficos "plotter" acoplado a um computador 1130 da IBM.

FIG. 3-1- 25.0 GR. CENT.-
ESCHERICHIA COLI

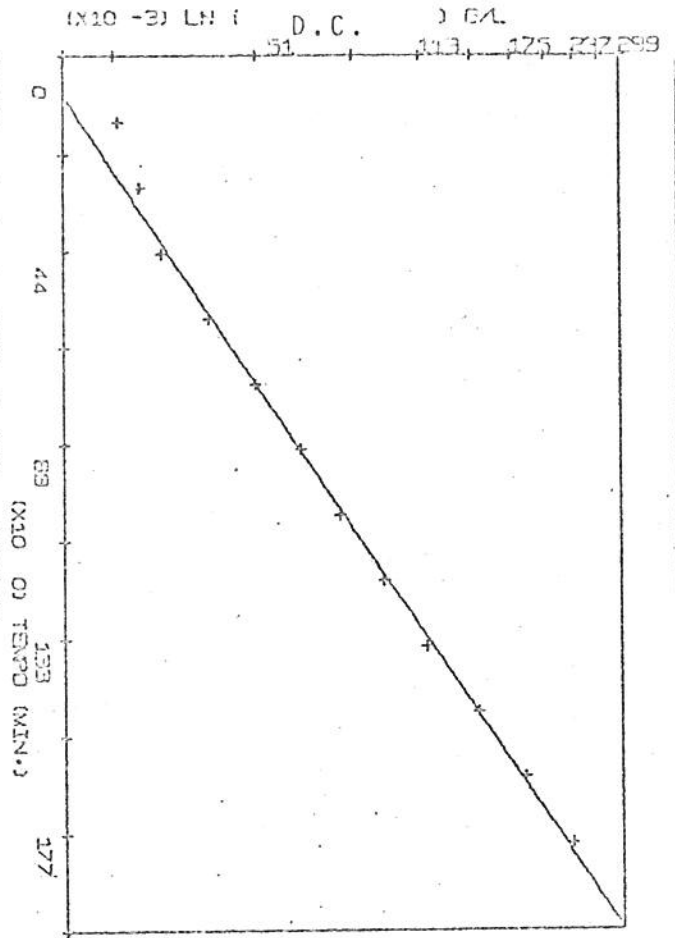


FIG. 3-2- 27.5 GR. CENT.-
ESCHERICHIA COLI

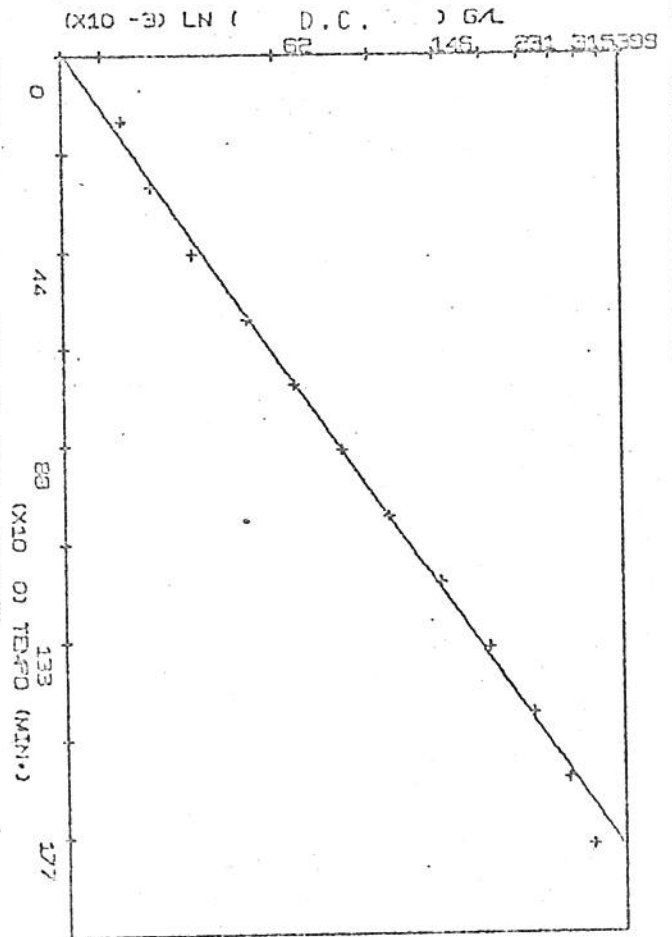


FIG. 3-3- 28.0 GR. CENT.-

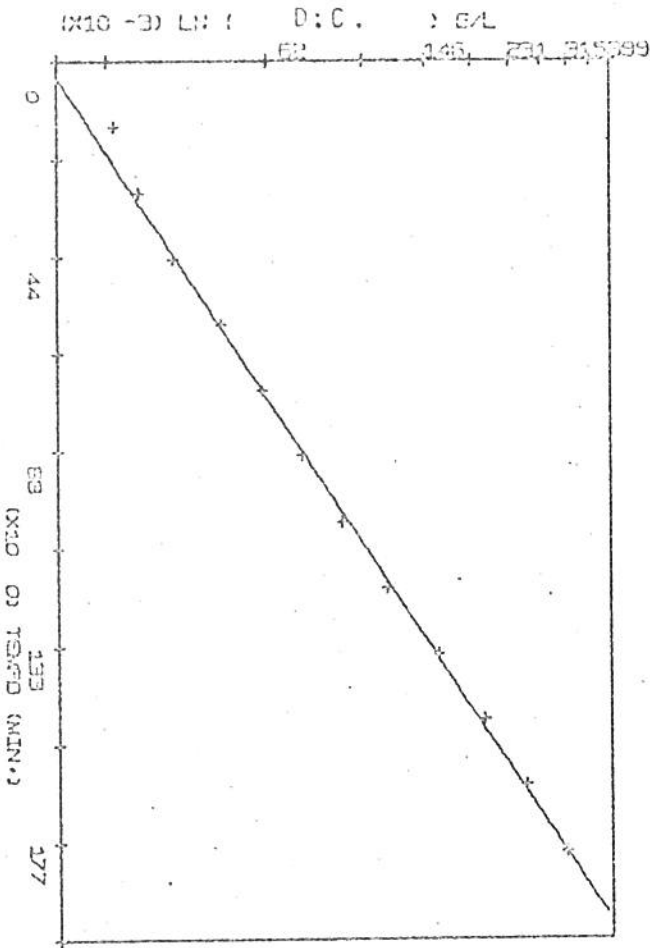
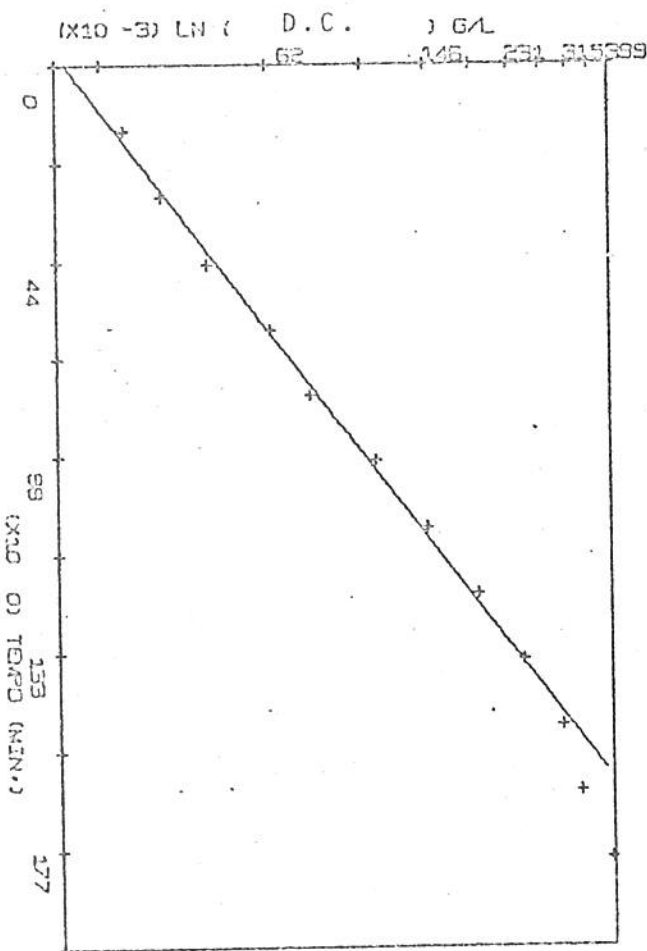
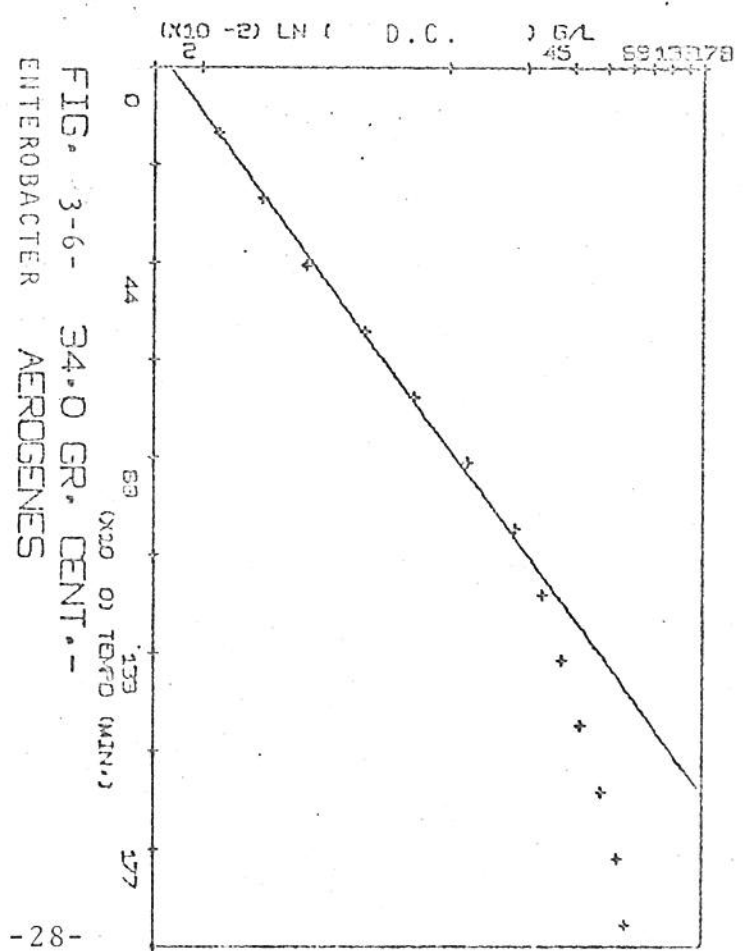
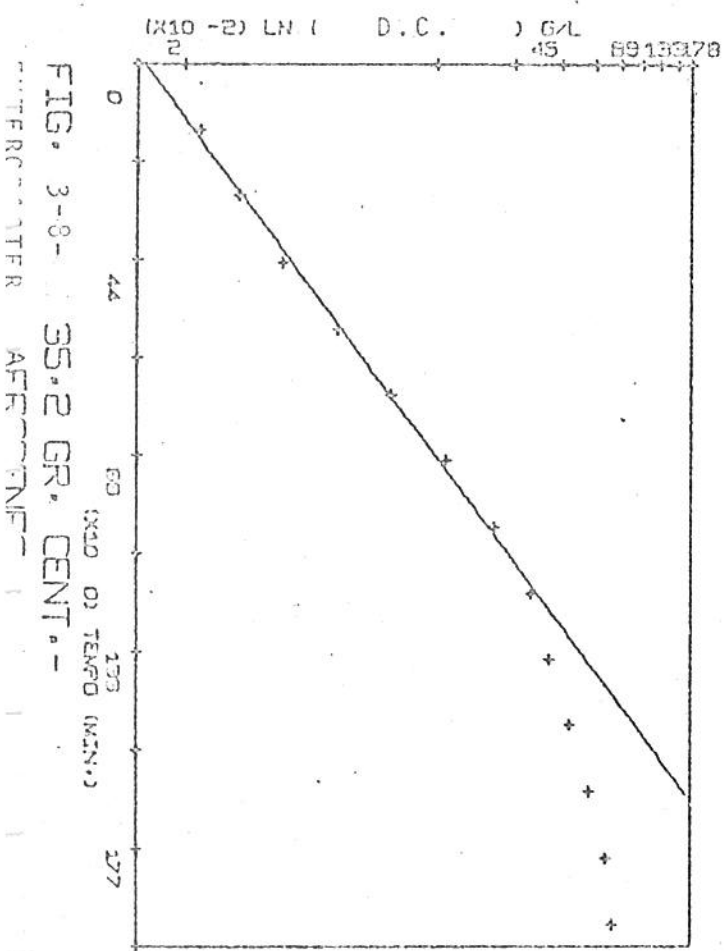
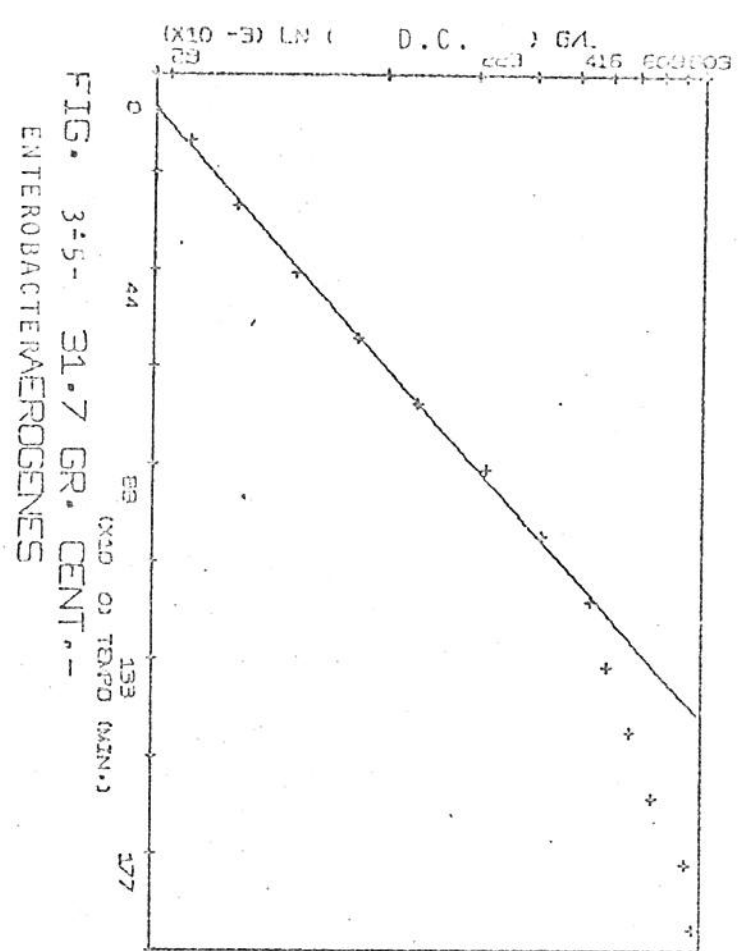
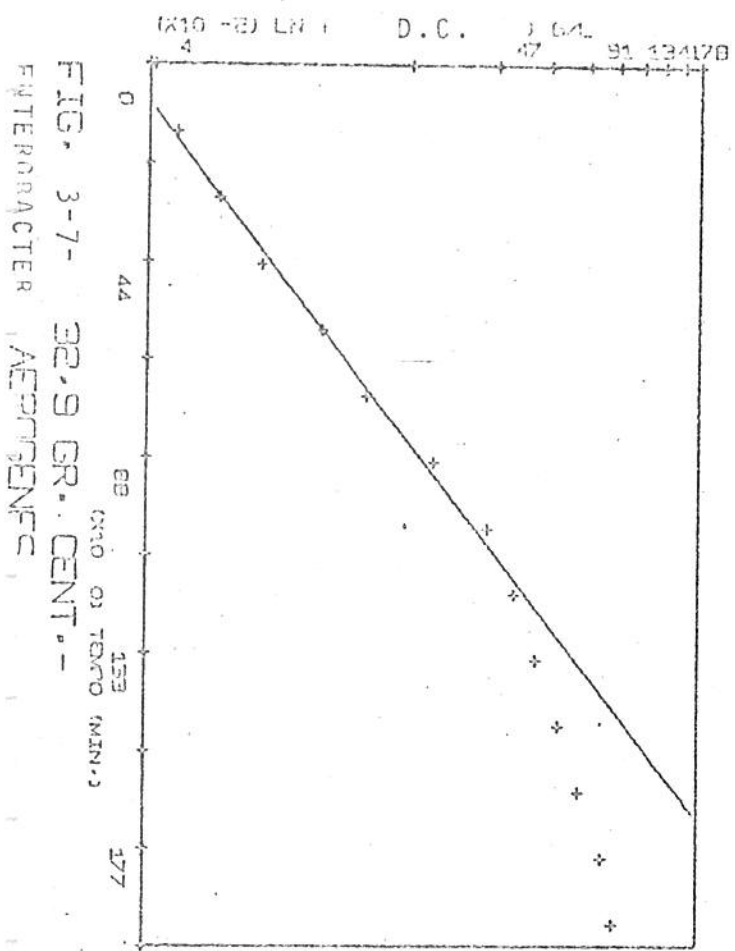
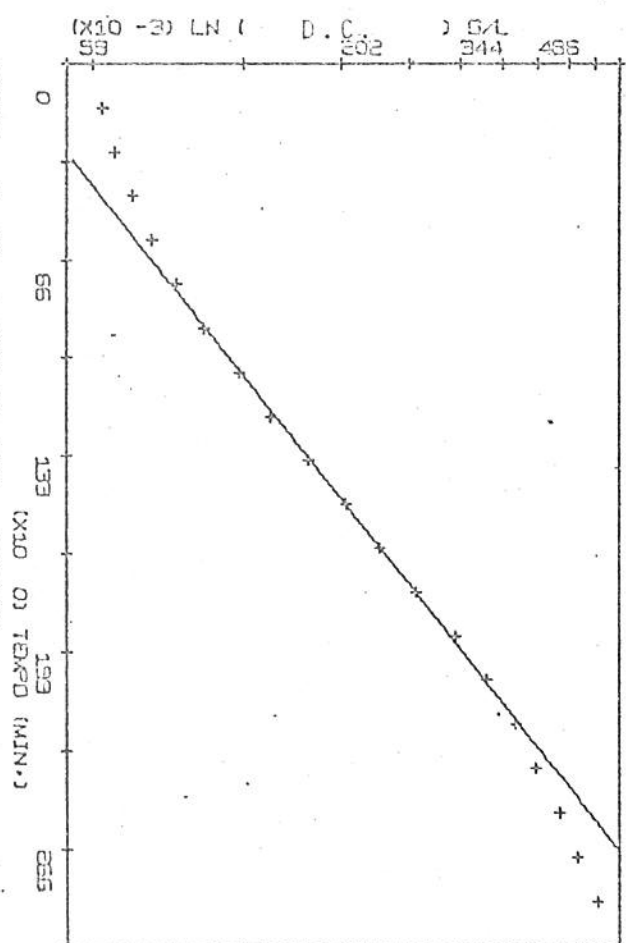
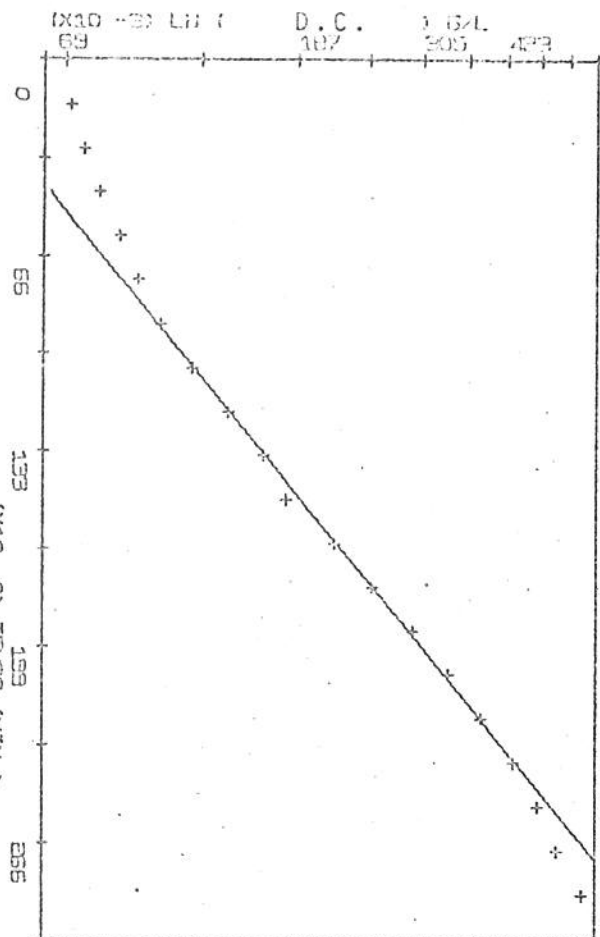
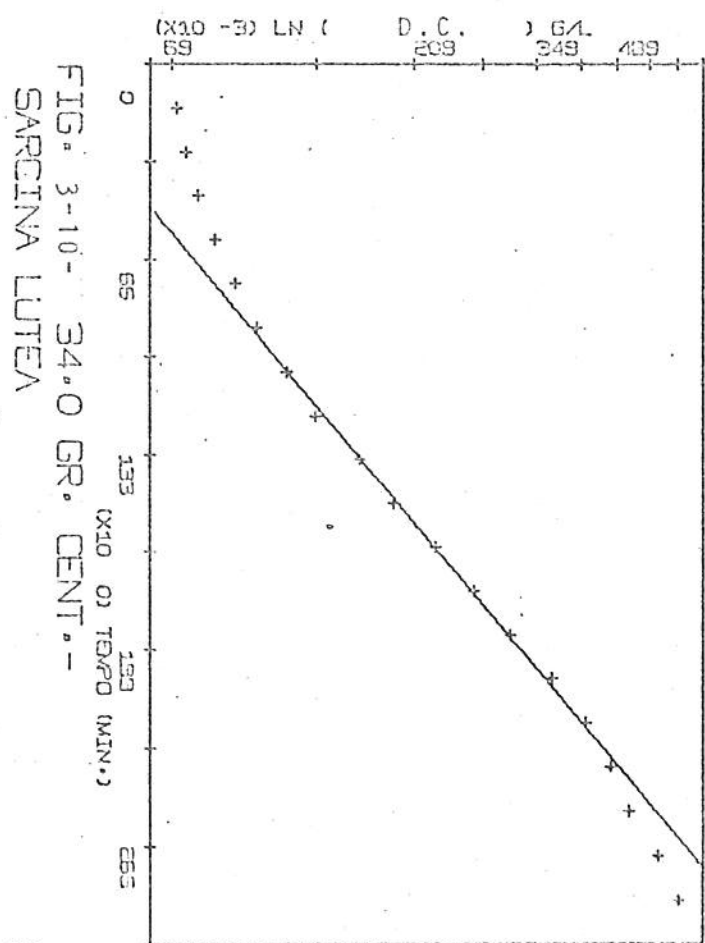
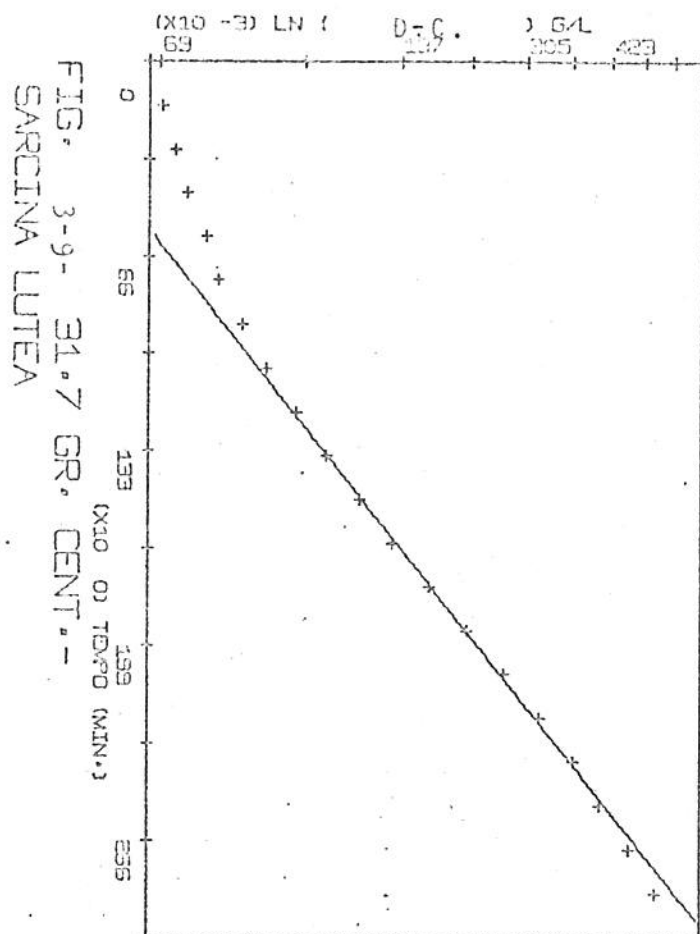
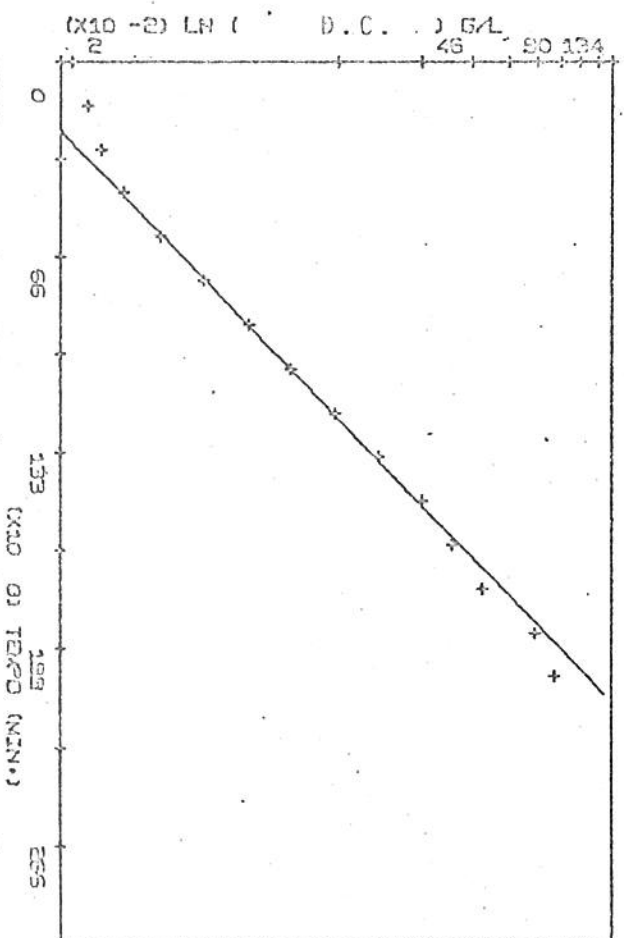
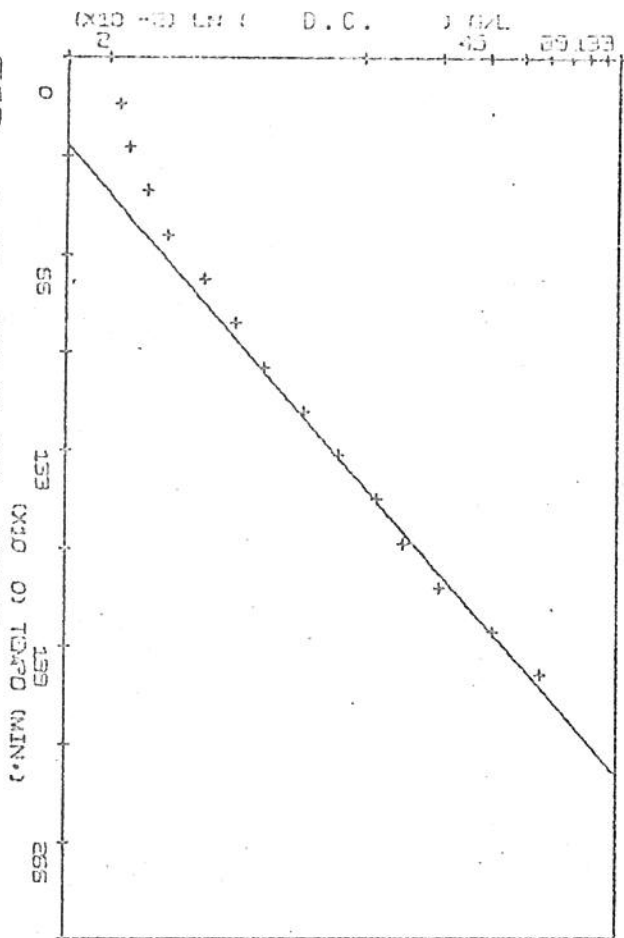
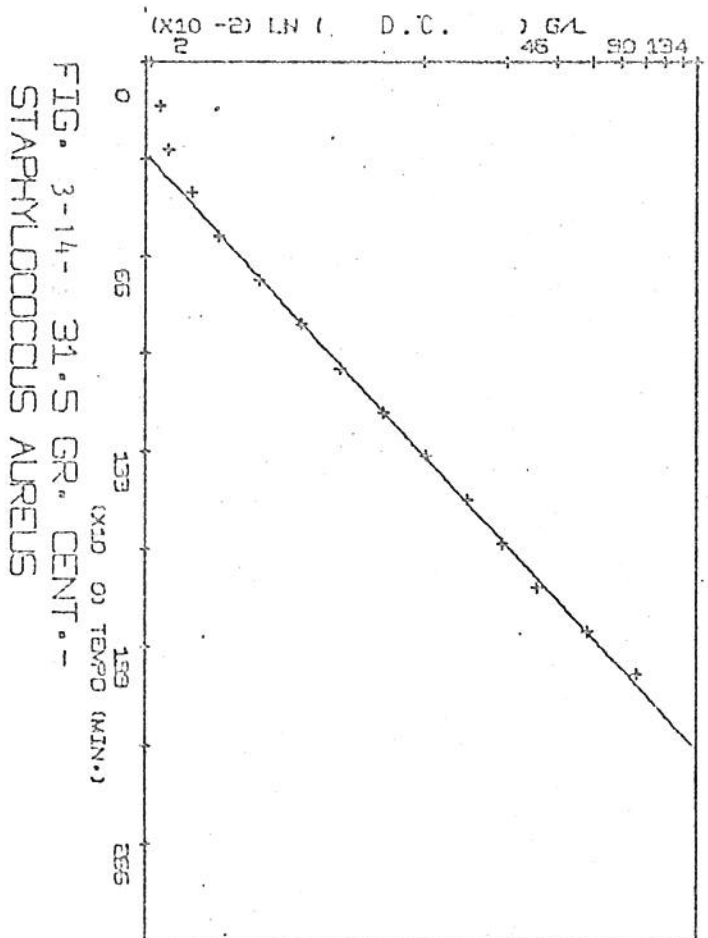
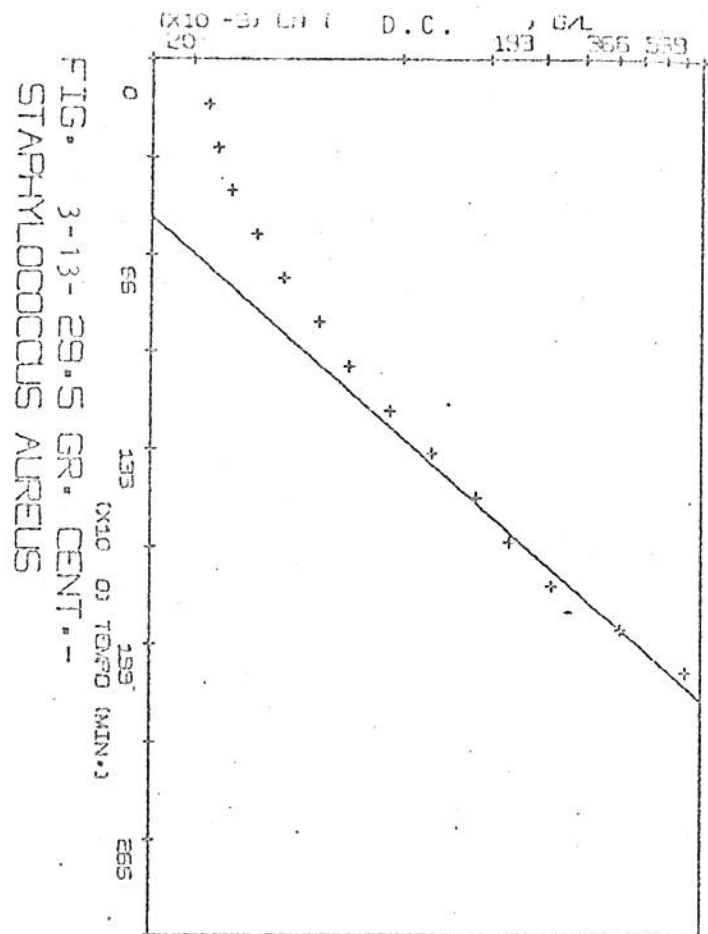


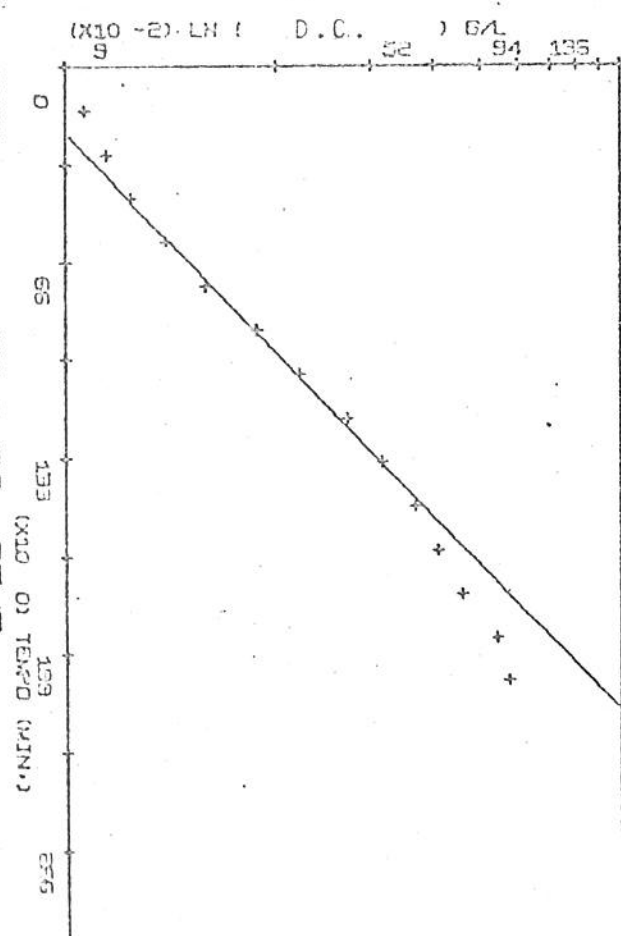
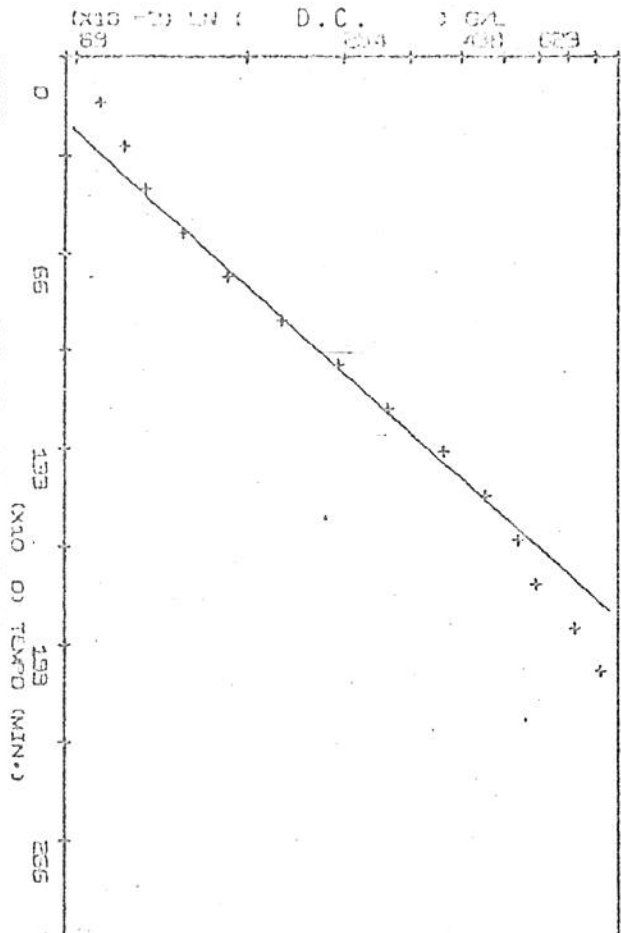
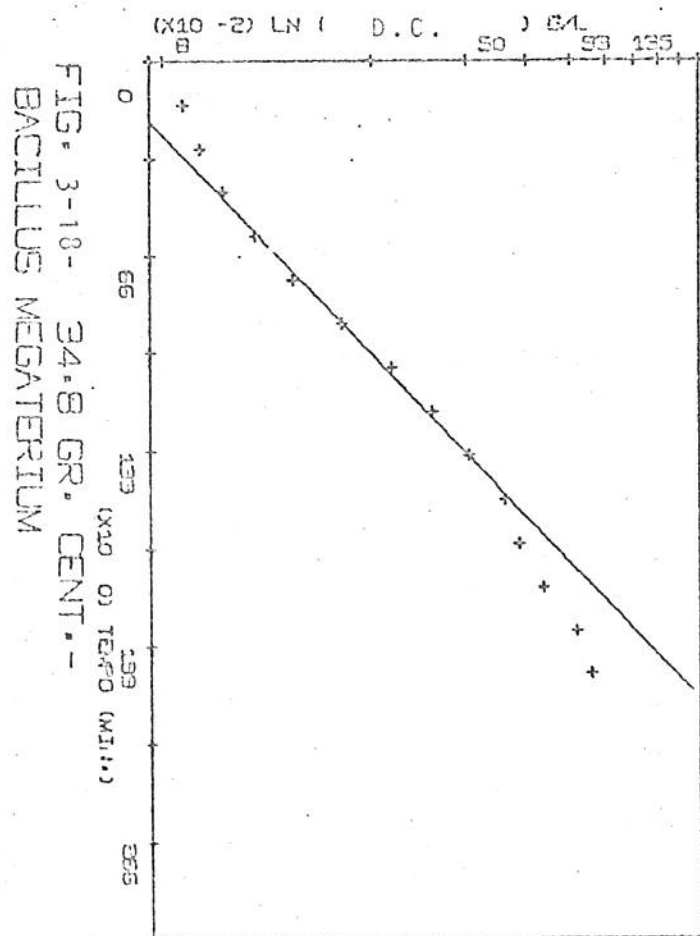
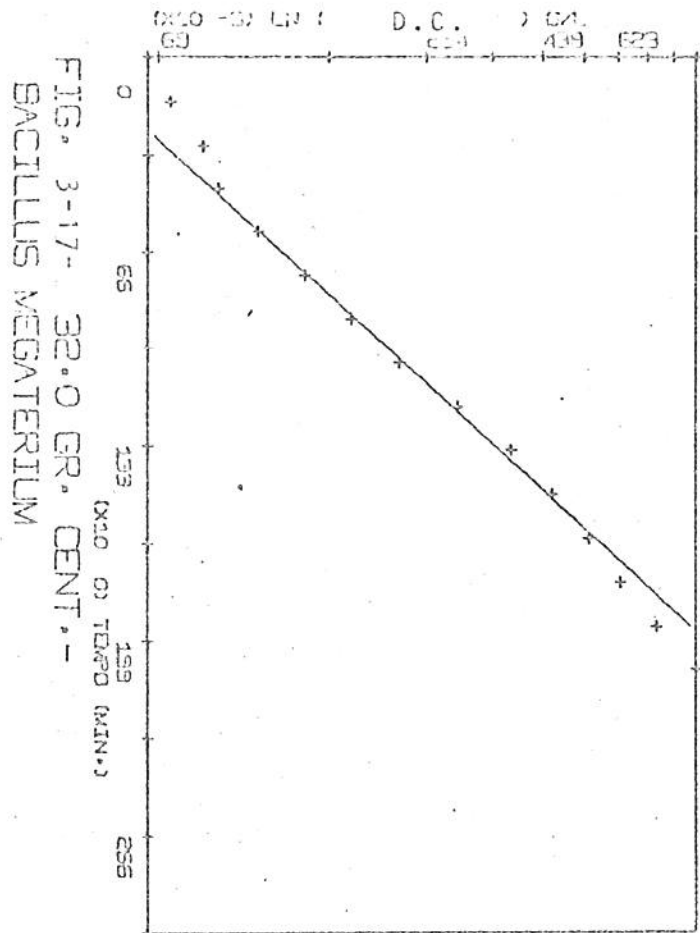
FIG. 3-4- 28.5 GR. CENT.-











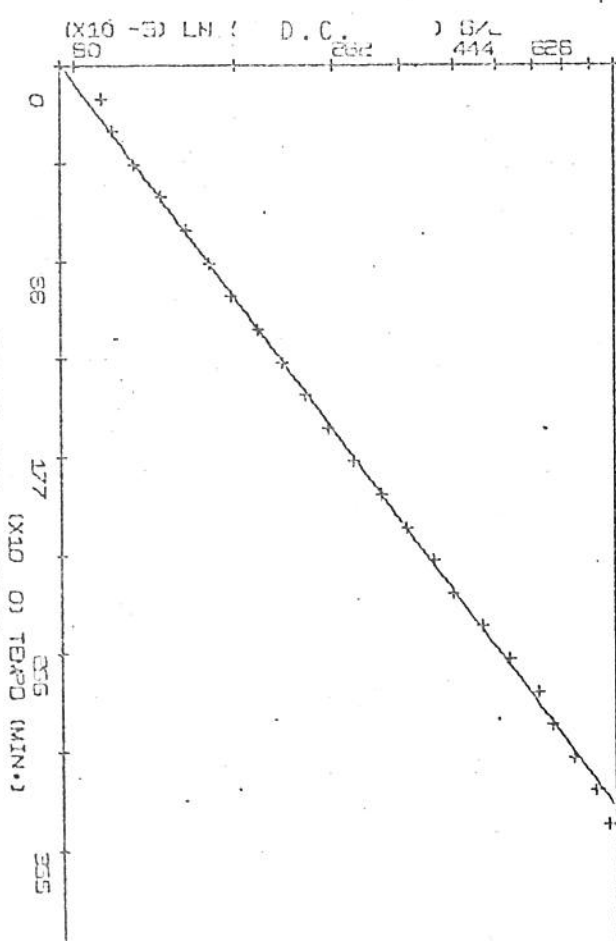
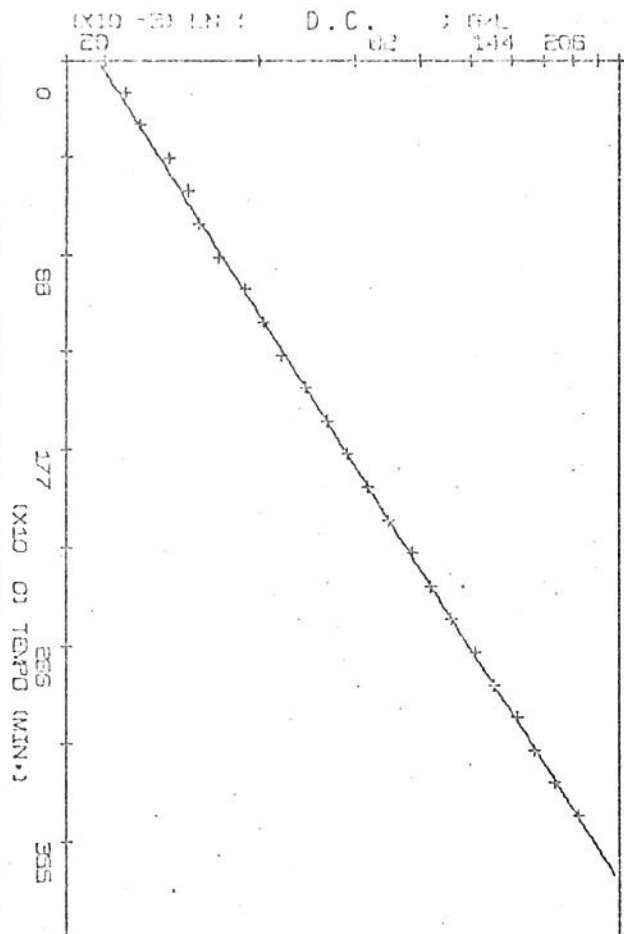
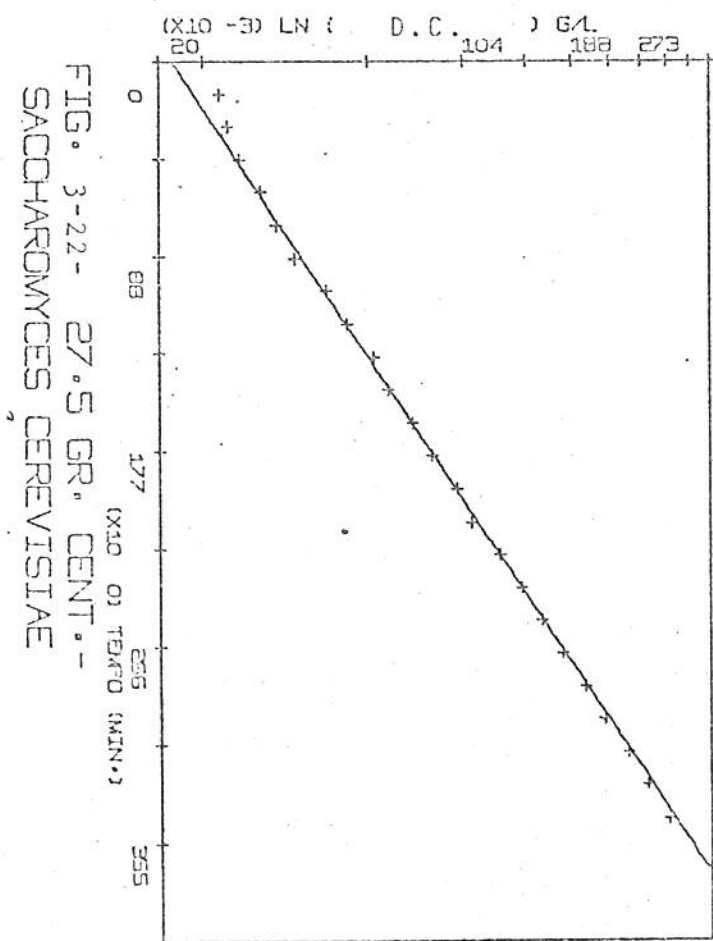
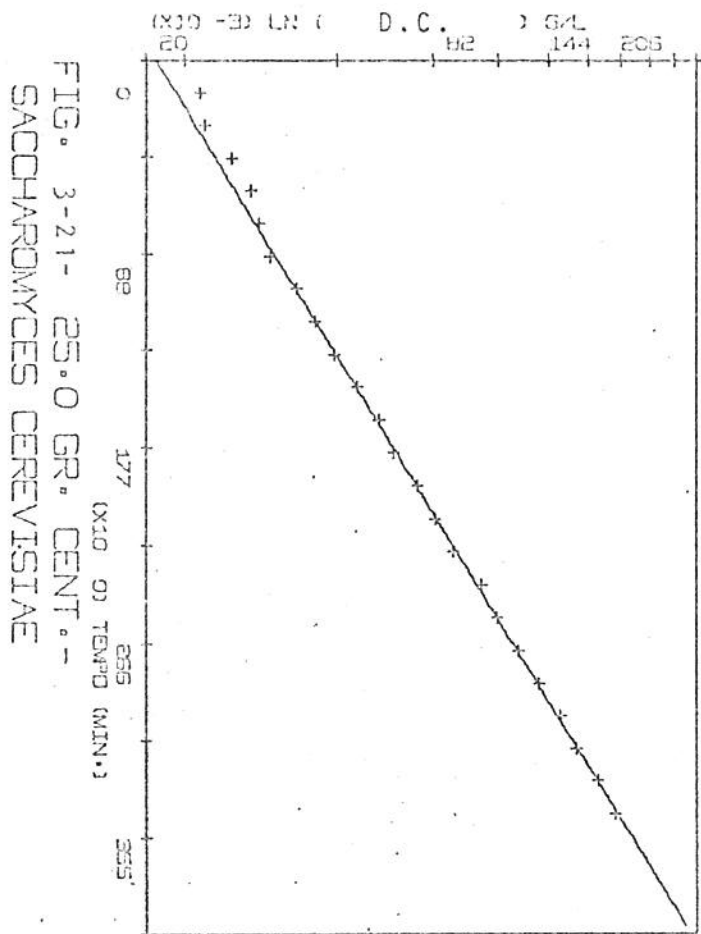


FIG. 3-25 - 36.1 GR. CENT. -
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

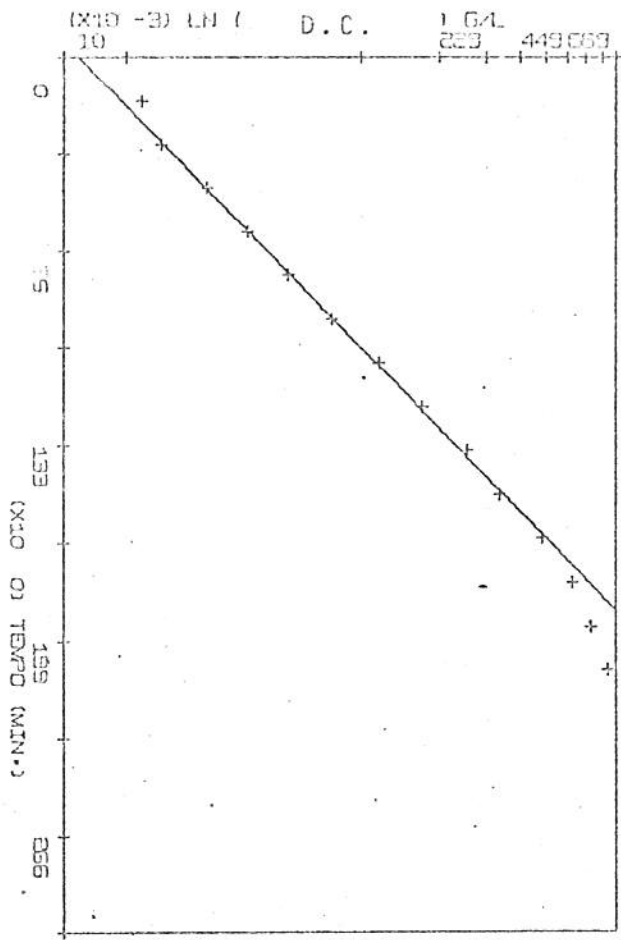


FIG. 3-26 - 39.0 GR. CENT. -
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

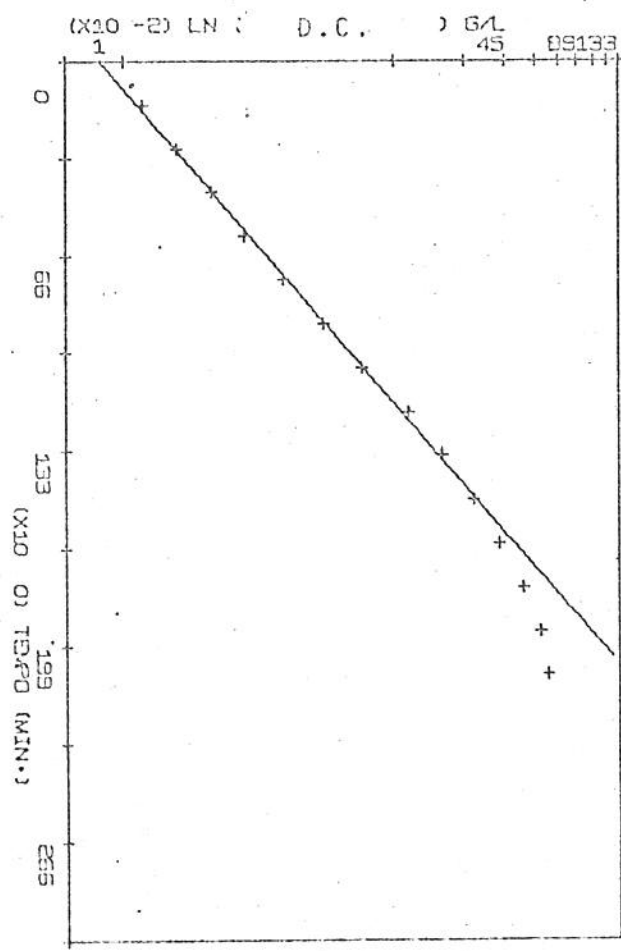


FIG. 3-27 - 37.5 GR. CENT. -
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

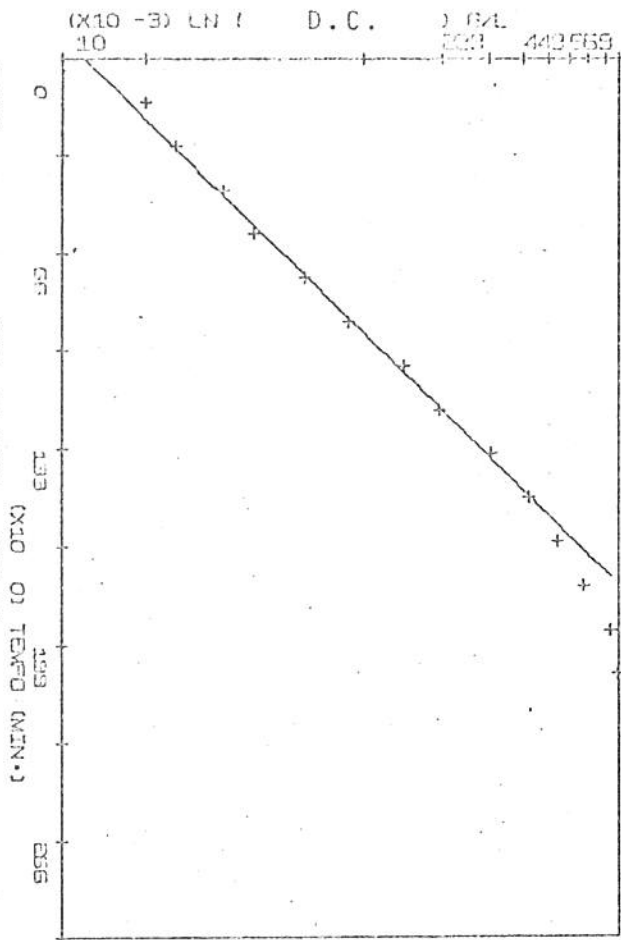


FIG. 3-28 - 40.0 GR. CENT. -
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

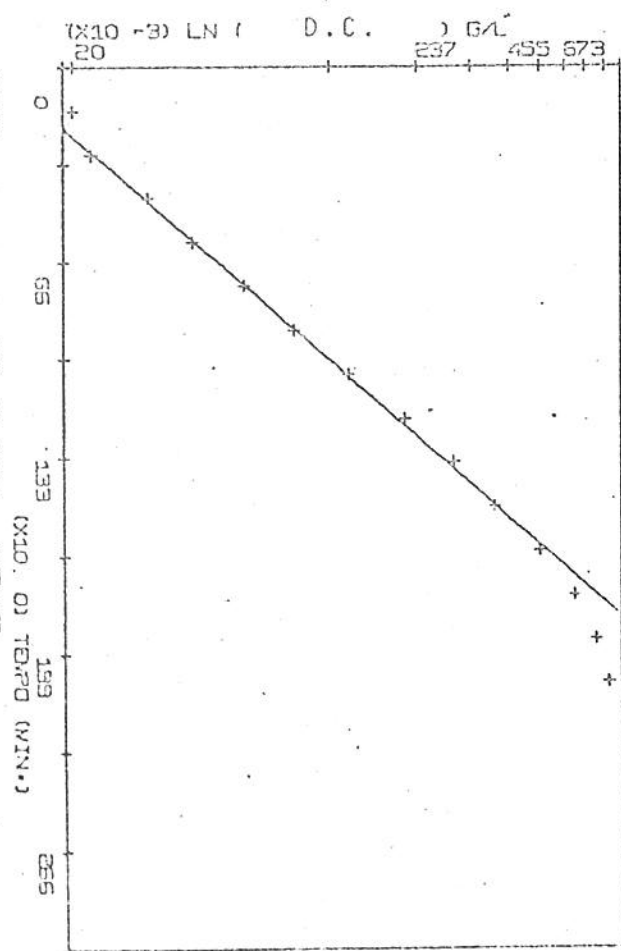


Tabela 6 - MASSA CELULAR EM MG/ML DE SARCINA LUTEA

TEMPERATURA	GR.	0.	15.	30.	45.	60.	75.	90.	105.	120.	135.	150.	165.
8,6	0,447	0,444	0,444	0,453	0,457	0,478	0,457	0,464	0,470	0,476	0,476	0,476	0,476
10,0	0,242	0,245	0,242	0,246	0,245	0,242	0,242	0,242	0,246	0,245	0,248	0,248	0,248
11,4	0,299	0,302	0,302	0,315	0,316	0,324	0,316	0,308	0,328	0,331	0,334	0,334	0,334
12,6	0,316	0,324	0,334	0,334	0,334	0,353	0,353	0,353	0,354	0,356	0,356	0,356	0,356
14,2	0,324	0,328	0,340	0,344	0,350	0,353	0,356	0,353	0,347	0,369	0,372	0,376	0,376
15,5	0,372	0,405	0,414	0,427	0,431	0,421	0,421	0,421	0,427	0,447	0,450	0,470	0,470
16,8	0,239	0,242	0,242	0,258	0,258	0,246	0,239	0,242	0,270	0,270	0,270	0,274	0,274
18,0	0,405	0,427	0,434	0,434	0,447	0,447	0,447	0,447	0,447	0,447	0,447	0,447	0,447
19,0	0,486	0,532	0,536	0,549	0,549	0,559	0,559	0,559	0,562	0,569	0,569	0,569	0,569
20,5	0,453	0,466	0,466	0,489	0,489	0,496	0,496	0,496	0,519	0,526	0,532	0,532	0,532
21,6	0,513	0,536	0,542	0,542	0,552	0,552	0,552	0,552	0,559	0,562	0,562	0,562	0,562
22,6	0,519	0,536	0,549	0,549	0,552	0,552	0,552	0,552	0,559	0,562	0,562	0,562	0,562
23,8	0,516	0,526	0,529	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532
25,0	0,526	0,550	0,556	0,556	0,556	0,556	0,556	0,556	0,556	0,556	0,556	0,556	0,556
26,3	0,529	0,539	0,546	0,552	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559
27,2	0,529	0,572	0,572	0,589	0,589	0,589	0,589	0,589	0,589	0,589	0,589	0,589	0,589
28,4	0,526	0,522	0,529	0,539	0,539	0,539	0,539	0,539	0,539	0,539	0,539	0,539	0,539
29,5	0,499	0,526	0,529	0,552	0,552	0,552	0,552	0,552	0,552	0,552	0,552	0,552	0,552
30,6	0,526	0,546	0,552	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576
31,7	0,526	0,546	0,542	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559
32,9	0,532	0,542	0,542	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569
34,0	0,536	0,546	0,546	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569	0,569
35,2	0,470	0,493	0,519	0,562	0,562	0,562	0,562	0,562	0,562	0,562	0,562	0,562	0,562
37,6	0,293	0,326	0,324	0,347	0,347	0,347	0,347	0,347	0,347	0,347	0,347	0,347	0,347
39,0	0,552	0,567	0,562	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576
40,5	0,673	0,711	0,719	0,774	0,774	0,774	0,774	0,774	0,774	0,774	0,774	0,774	0,774
42,8	0,640	0,697	0,721	0,794	0,794	0,794	0,794	0,794	0,794	0,794	0,794	0,794	0,794
43,5	0,536	0,552	0,565	0,550	0,550	0,550	0,550	0,550	0,550	0,550	0,550	0,550	0,550

UNICAMP
Centro de Cont.

MASSA CELULAR EM MG/ML DE SARCINA LUTEA

TEMPERATURA	GR.	180.	195.	210.	225.	240.	255.	270.	285.
8,6	0,486	0,485	0,493	0,486	0,485	0,485	0,485	0,486	0,486
10,0	0,248	0,258	0,267	0,267	0,267	0,267	0,267	0,267	0,267
11,4	0,334	0,342	0,360	0,363	0,363	0,363	0,363	0,363	0,363
12,6	0,366	0,382	0,389	0,389	0,395	0,398	0,398	0,398	0,398
14,2	0,376	0,401	0,401	0,405	0,405	0,405	0,405	0,405	0,405
15,5	0,470	0,486	0,499	0,546	0,553	0,559	0,556	0,559	0,559
16,8	0,286	0,286	0,293	0,312	0,312	0,312	0,312	0,312	0,312
18,0	0,496	0,529	0,529	0,546	0,559	0,556	0,579	0,592	0,592
19,0	0,653	0,673	0,701	0,706	0,710	0,710	0,710	0,710	0,710
20,5	0,579	0,622	0,629	0,656	0,664	0,670	0,672	0,675	0,675
21,6	0,563	0,644	0,714	0,763	0,750	0,815	0,832	0,871	0,871
22,6	0,756	0,794	0,843	0,885	0,891	0,891	0,891	0,891	0,891
23,8	0,759	0,811	0,867	0,895	0,892	0,899	0,899	0,899	0,899
25,0	0,864	0,935	1,007	1,094	1,160	1,265	1,300	1,465	1,465
26,3	0,865	0,949	1,052	1,157	1,269	1,395	1,500	1,685	1,685
27,2	1,007	1,112	1,224	1,349	1,461	1,657	1,863	2,067	2,067
28,4	1,079	1,213	1,345	1,592	1,705	1,955	2,225	2,497	2,497
29,5	1,231	1,372	1,506	1,633	1,760	2,055	2,360	2,673	2,673
30,6	1,345	1,540	1,713	2,071	2,332	2,671	2,958	3,375	3,375
31,7	1,521	1,775	2,080	2,414	2,791	3,146	3,557	4,013	4,013
32,9	1,646	2,107	2,553	2,939	3,401	3,784	4,130	4,619	4,619
34,0	2,006	2,354	2,855	3,348	3,773	4,119	4,744	5,266	5,266
35,2	2,097	2,543	2,778	3,444	3,930	4,298	4,734	5,266	5,266
37,6	1,423	1,754	2,059	2,424	2,752	3,161	3,498	3,830	3,830
39,0	2,749	3,229	3,446	3,886	4,238	4,670	5,062	5,475	5,475
40,5	3,272	3,452	3,891	4,292	4,664	5,122	5,428	5,903	5,903
42,8	2,599	2,979	3,161	3,498	3,773	4,072	4,236	4,607	4,607
43,5	1,525	1,705	1,913	2,128	2,253	2,442	2,676	2,772	2,772

Enterobacter Aerogenes

MASSA CELULAR FM HG/FL DE

- 35 -

TEMPERATURA	GR.	0.	15.	30.	45.	60.	75.	90.	105.	120.	135.	150.	165.
13,0	0,2228	0,2258	0,2259	0,2288	0,2277	0,2283	0,2283	0,2277	0,2314	0,2290	0,2308	0,2290	0,2290
14,6	0,2216	0,2222	0,2219	0,2222	0,2225	0,2225	0,2219	0,2274	0,2249	0,2244	0,2243	0,2249	0,2249
16,5	0,2231	0,2231	0,2231	0,2233	0,2249	0,2252	0,2252	0,2262	0,2268	0,2260	0,2271	0,2260	0,2260
18,0	0,2237	0,2231	0,2247	0,2233	0,2237	0,2237	0,2257	0,2274	0,2260	0,2260	0,2299	0,2311	0,2311
19,6	0,2234	0,2237	0,2243	0,2247	0,2268	0,2268	0,2263	0,2305	0,2314	0,2324	0,2339	0,2358	0,2358
21,0	0,2237	0,2243	0,2246	0,2258	0,2277	0,2277	0,2277	0,2311	0,2333	0,2352	0,2384	0,2425	0,2470
22,5	0,2231	0,2240	0,2246	0,2252	0,2277	0,2277	0,2277	0,2311	0,2333	0,2352	0,2384	0,2425	0,2470
24,0	0,2237	0,2246	0,2252	0,2277	0,2277	0,2277	0,2277	0,2311	0,2333	0,2352	0,2384	0,2425	0,2470
25,0	0,2237	0,2262	0,2264	0,2293	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314
26,4	0,2240	0,2247	0,2252	0,2253	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314	0,2314
27,6	0,2259	0,2283	0,2305	0,2330	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371
29,5	0,2259	0,2266	0,2305	0,2346	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371
30,2	0,2260	0,2305	0,2330	0,2346	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371
31,5	0,2305	0,2330	0,2352	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371
32,8	0,2324	0,2365	0,2363	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371	0,2371
34,6	0,2323	0,2379	0,2381	0,2384	0,2384	0,2384	0,2384	0,2384	0,2384	0,2384	0,2384	0,2384	0,2384
35,0	0,2319	0,2249	0,2321	0,2322	0,2322	0,2322	0,2322	0,2322	0,2322	0,2322	0,2322	0,2322	0,2322
37,0	0,2228	0,2266	0,2327	0,2341	0,2350	0,2350	0,2350	0,2350	0,2350	0,2350	0,2350	0,2350	0,2350
38,5	0,2225	0,2265	0,2330	0,2347	0,2347	0,2347	0,2347	0,2347	0,2347	0,2347	0,2347	0,2347	0,2347
40,0	0,2259	0,2311	0,2346	0,2376	0,2392	0,2392	0,2392	0,2392	0,2392	0,2392	0,2392	0,2392	0,2392
41,5	0,2265	0,2339	0,2341	0,2341	0,2341	0,2341	0,2341	0,2341	0,2341	0,2341	0,2341	0,2341	0,2341
43,0	0,2283	0,2333	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357
44,4	0,2268	0,2330	0,2370	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357	0,2357
46,0	0,2314	0,2390	0,2306	0,2321	0,2321	0,2321	0,2321	0,2321	0,2321	0,2321	0,2321	0,2321	0,2321
47,8	0,2290	0,2377	0,2474	0,2513	0,2777	0,2777	0,2777	0,2777	0,2777	0,2777	0,2777	0,2777	0,2777



UNICAMP
Centro de Células

MASSA CELULAR EM MG/ML DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

TEMPERATURA	GR.	180.	195.	210.
13,0	0,2314	0,2321	0,2308	0,2308
14,6	0,2262	0,2290	0,2260	0,2260
16,5	0,2299	0,2324	0,2346	0,2346
18,0	0,2336	0,2361	0,2406	0,2406
19,6	0,2377	0,2430	0,2510	0,2510
21,0	0,2464	0,2569	0,2698	0,2698
22,5	0,2533	0,2667	0,2806	0,2806
24,0	0,2718	0,2986	0,3372	0,3372
25,0	0,2960	0,3351	0,3975	0,3975
26,4	0,3115	0,3604	0,4251	0,4251
27,6	0,2063	0,3152	0,4625	0,4625
29,5	0,2769	0,4258	0,6357	0,6357
30,2	0,4188	0,6250	0,6605	0,6605
31,5	0,5347	0,7539	1,0305	1,0305
32,8	0,6568	0,9271	1,0521	1,0521
34,6	1,0354	1,1218	1,2170	1,2170
35,0	0,2146	0,9983	1,1164	1,1164
37,0	0,8575	0,9271	1,0963	1,0963
38,5	0,9656	1,0793	1,1701	1,1701
40,0	1,0207	1,1056	1,1056	1,1056
41,5	1,0354	1,0354	1,1216	1,1216
43,0	1,0110	1,0954	1,1675	1,1675
44,4	0,7752	0,8121	0,7777	0,7777
46,0	0,2150	0,2110	0,2040	0,2040
47,8	0,2920	0,2848	0,2513	0,2513

Tabela 6 - MASSA CELULAR EM MG/ML DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

TEMPERATURE		TIME (MINUTES)															
GR.	CENT.	0.	15.	30.	45.	60.	75.	90.	105.	120.	135.	150.	165.	180.	195.	210.	
1	11.0	0.208	0.218	0.174	0.174	0.174	0.174	0.183	0.218	0.238	0.213	0.238	0.213	0.243	0.243	0.243	
1	12.5	0.193	0.193	0.193	0.198	0.193	0.193	0.198	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.253	0.253	0.253	
1	14.0	0.149	0.154	0.154	0.159	0.159	0.174	0.164	0.174	0.198	0.198	0.203	0.203	0.214	0.214	0.214	
1	15.3	0.175	0.175	0.175	0.184	0.175	0.175	0.209	0.223	0.233	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	
1	16.5	0.183	0.183	0.183	0.198	0.203	0.203	0.213	0.223	0.223	0.243	0.243	0.243	0.263	0.263	0.263	
1	17.9	0.196	0.218	0.213	0.236	0.246	0.263	0.263	0.272	0.287	0.302	0.317	0.317	0.327	0.327	0.327	
1	19.0	0.178	0.163	0.193	0.193	0.203	0.203	0.243	0.243	0.243	0.272	0.292	0.292	0.302	0.302	0.302	
1	20.0	0.149	0.183	0.174	0.186	0.186	0.223	0.213	0.223	0.248	0.258	0.292	0.292	0.317	0.317	0.317	
1	21.0	0.166	0.186	0.186	0.203	0.203	0.213	0.213	0.263	0.272	0.292	0.317	0.317	0.337	0.337	0.337	
1	22.0	0.193	0.233	0.278	0.238	0.248	0.253	0.258	0.287	0.312	0.332	0.356	0.356	0.386	0.386	0.386	
1	23.1	0.216	0.253	0.248	0.282	0.287	0.292	0.307	0.347	0.361	0.401	0.445	0.445	0.486	0.486	0.486	
1	24.2	0.193	0.233	0.206	0.233	0.258	0.268	0.277	0.317	0.351	0.381	0.420	0.420	0.460	0.460	0.460	
1	25.0	0.193	0.206	0.213	0.241	0.258	0.277	0.292	0.332	0.351	0.399	0.440	0.440	0.489	0.489	0.489	
1	26.5	0.193	0.213	0.226	0.263	0.267	0.302	0.332	0.376	0.411	0.445	0.489	0.489	0.539	0.539	0.539	
1	27.5	0.203	0.223	0.233	0.245	0.277	0.302	0.352	0.391	0.435	0.489	0.539	0.539	0.589	0.589	0.589	
1	28.5	0.252	0.273	0.273	0.286	0.321	0.341	0.381	0.411	0.455	0.499	0.543	0.543	0.593	0.593	0.593	
1	29.5	0.253	0.277	0.292	0.307	0.331	0.341	0.381	0.411	0.455	0.499	0.543	0.543	0.593	0.593	0.593	
1	30.6	0.134	0.198	0.178	0.218	0.233	0.272	0.327	0.347	0.386	0.435	0.489	0.489	0.539	0.539	0.539	
1	31.5	0.164	0.178	0.174	0.203	0.213	0.272	0.302	0.361	0.411	0.455	0.499	0.499	0.549	0.549	0.549	
1	33.0	0.203	0.243	0.243	0.277	0.302	0.342	0.386	0.440	0.494	0.538	0.582	0.582	0.632	0.632	0.632	
1	34.0	0.186	0.193	0.203	0.213	0.248	0.287	0.322	0.371	0.435	0.499	0.568	0.568	0.618	0.618	0.618	
1	35.3	0.213	0.236	0.213	0.236	0.267	0.322	0.347	0.416	0.464	0.549	0.604	0.604	0.654	0.654	0.654	
1	36.5	0.245	0.253	0.258	0.262	0.272	0.307	0.357	0.405	0.477	0.524	0.578	0.578	0.628	0.628	0.628	
1	37.6	0.236	0.272	0.267	0.307	0.342	0.371	0.411	0.470	0.524	0.578	0.647	0.647	0.716	0.716	0.716	
1	39.0	0.223	0.253	0.258	0.277	0.287	0.307	0.322	0.356	0.386	0.475	0.470	0.470	0.524	0.524	0.524	
1	40.0	0.198	0.213	0.233	0.233	0.272	0.287	0.292	0.307	0.327	0.351	0.371	0.371	0.391	0.391	0.391	
1	42.6	0.159	0.228	0.238	0.228	0.233	0.238	0.243	0.253	0.277	0.287	0.302	0.302	0.322	0.322	0.322	



MASSA CELULAR EM MG/ML DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

TEMPERATURE		TEMPERATURE (MINUTES)															
GR.	CENT.	100.	105.	110.	115.	120.	125.	130.	135.	140.	145.	150.	155.	160.	165.	170.	175.
1	11.0	0248	0248	0253	0238	0253	0243	0263	0263	0263	0263	0263	0263	0263	0263	0263	0263
1	12.5	0253	0253	0253	0277	0277	0287	0287	0292	0297	0297	0297	0297	0297	0297	0297	0297
1	14.0	0226	0223	0226	0210	0223	0233	0248	0263	0263	0263	0263	0263	0263	0263	0263	0263
1	15.3	0253	0248	0253	0263	0263	0312	0322	0337	0327	0327	0327	0327	0327	0327	0327	0327
1	16.5	0262	0287	0302	0307	0317	0332	0347	0347	0351	0356	0356	0356	0356	0356	0356	0356
1	17.9	0332	0332	0366	0366	0386	0396	0416	0416	0430	0445	0445	0445	0445	0445	0445	0445
1	19.0	0312	0322	0342	0356	0366	0391	0425	0435	0450	0455	0455	0455	0455	0455	0455	0455
1	20.0	0327	0332	0371	0376	0406	0420	0450	0470	0484	0499	0519	0519	0519	0519	0519	0519
1	21.0	0381	0401	0430	0450	0450	0519	0539	0583	0627	0637	0666	0666	0666	0666	0666	0666
1	22.0	0430	0450	0489	0519	0573	0602	0652	0701	0740	0779	0823	0823	0823	0823	0823	0823
1	23.1	0509	0548	0593	0642	0696	0745	0803	0857	0926	0984	1087	1087	1087	1087	1087	1087
1	24.2	0484	0553	0588	0627	0710	0774	0847	0911	0994	1077	1169	1169	1169	1169	1169	1169
1	25.0	0524	0583	0637	0691	0784	0843	0926	1013	1118	1193	1310	1310	1310	1310	1310	1310
1	26.5	0607	0666	0735	0818	0887	0974	1082	1199	1291	1367	1518	1518	1518	1518	1518	1518
1	27.5	0671	0784	0823	0940	1048	1159	1276	1421	1557	1730	1879	1879	1879	1879	1879	1879
1	28.5	0912	2104	2284	2508	2674	2933	3191	3471	3610	3842	4072	4072	4072	4072	4072	4072
1	29.5	0916	1016	1150	1281	1426	1610	1788	2003	2171	2432	2693	2693	2693	2693	2693	2693
1	30.6	0676	0772	0877	1013	1150	1291	1455	1643	1812	2051	2290	2290	2290	2290	2290	2290
1	31.5	0706	0803	0901	1082	1193	1354	1537	1740	1950	2218	2432	2432	2432	2432	2432	2432
1	33.0	0847	0979	1116	1271	1416	1634	1821	2066	2304	2589	2848	2848	2848	2848	2848	2848
1	34.0	0759	0892	0989	1140	1291	1508	1701	1941	2156	2418	2678	2678	2678	2678	2678	2678
1	35.3	0636	0770	1072	1242	1378	1541	1797	2013	2262	2469	2726	2726	2726	2726	2726	2726
1	36.5	0614	0602	0909	1105	1243	1483	1705	2000	2134	2360	2600	2600	2600	2600	2600	2600
1	37.6	0794	0667	0948	1130	1130	1257	1370	1483	1603	1672	1951	1951	1951	1951	1951	1951
1	38.0	0573	0588	0612	0676	0691	0750	0794	0818	0847	0881	0945	0945	0945	0945	0945	0945
1	39.0	0396	0400	0420	0425	0445	0450	0450	0450	0455	0455	0455	0455	0455	0455	0455	0455
1	42.0	0327	0327	0312	0327	0327	0327	0327	0327	0312	0312	0297	0297	0297	0297	0297	0297

Tabela 6 - MASSA CELULAR EM MG/ML DE BACILLUS MEGATERIUM

[illegible]

UNICAMP
Centro de Ci-

NASSA CELULAR EM MG/ML DE BACILLUS MEGATERIUM

[illegible]

Tabela 6 - MASSA CELULAR EM MG/ML DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

TEMPERATURA	GR. CENT.	0.	15.	30.	45.	60.	75.	90.	105.	120.	135.	150.	165.
20,0	0,102	0,102	0,102	0,102	0,102	0,102	0,102	0,127	0,127	0,130	0,140	0,149	0,155
21,0	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,102	0,102	0,108	0,108	0,127	0,133	0,152	0,171
22,7	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,102	0,102	0,108	0,108	0,149	0,152	0,152	0,213
24,0	0,108	0,108	0,108	0,108	0,108	0,117	0,142	0,142	0,171	0,203	0,226	0,294	0,381
25,0	0,095	0,095	0,095	0,095	0,098	0,102	0,130	0,146	0,165	0,197	0,232	0,291	0,377
26,0	0,139	0,142	0,152	0,152	0,152	0,158	0,161	0,208	0,248	0,281	0,314	0,384	0,467
27,5	0,146	0,146	0,146	0,146	0,146	0,153	0,161	0,167	0,235	0,274	0,369	0,405	0,501
28,5	0,135	0,139	0,152	0,152	0,154	0,154	0,219	0,265	0,332	0,356	0,372	0,475	0,522
29,7	0,122	0,102	0,102	0,102	0,133	0,142	0,167	0,205	0,334	0,356	0,364	0,456	0,522
31,0	0,098	0,102	0,117	0,117	0,161	0,193	0,239	0,341	0,425	0,551	0,747	1,038	1,376
32,5	0,102	0,102	0,127	0,127	0,190	0,216	0,298	0,441	0,551	0,751	1,026	1,376	1,769
33,5	0,114	0,114	0,149	0,149	0,213	0,258	0,371	0,512	0,699	0,982	1,445	1,842	2,520
35,0	0,102	0,114	0,133	0,133	0,193	0,258	0,366	0,519	0,773	1,103	1,480	2,109	2,902
36,1	0,092	0,105	0,123	0,123	0,181	0,255	0,361	0,519	0,773	1,123	1,656	2,198	3,201
37,5	0,108	0,108	0,139	0,139	0,206	0,265	0,405	0,588	0,942	1,274	1,991	2,762	3,810
39,0	0,095	0,114	0,158	0,158	0,222	0,304	0,446	0,659	0,954	1,503	2,135	2,933	3,812
40,0	0,117	0,117	0,133	0,133	0,197	0,271	0,368	0,554	0,818	1,278	1,745	2,368	3,333
41,5	0,106	0,124	0,139	0,139	0,252	0,371	0,453	0,651	0,898	1,292	1,851	2,527	3,214
42,5	0,127	0,135	0,152	0,152	0,235	0,351	0,498	0,691	0,865	1,123	1,440	1,842	2,572
44,5	0,120	0,136	0,168	0,168	0,226	0,342	0,466	0,657	0,841	0,863	0,977	1,055	1,072
46,0	0,124	0,152	0,174	0,174	0,213	0,217	0,279	0,285	0,285	0,288	0,294	0,327	0,331
47,3	0,120	0,145	0,165	0,165	0,171	0,177	0,177	0,184	0,184	0,187	0,181	0,181	0,181
49,0	0,142	0,145	0,145	0,145	0,149	0,155	0,149	0,149	0,149	0,138	0,136	0,133	0,133
51,0	0,085	0,085	0,089	0,089	0,089	0,082	0,089	0,083	0,083	0,077	0,077	0,077	0,077
53,5	0,120	0,120	0,127	0,127	0,127	0,127	0,114	0,111	0,108	0,108	0,108	0,108	0,105

UNICAMP
Centro de Co.

MASSA CELULAR EM MG/ML DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

TEMPERATURA	GR. CENT.	150.	195.	210.
20,0	0,168	0,171	0,181	
21,0	0,177	0,200	0,239	
22,7	0,216	0,288	0,327	
24,0	0,388	0,501	0,505	
25,0	0,391	0,467	0,547	
26,0	0,554	0,626	0,766	
27,5	0,648	0,740	0,911	
28,5	1,462	1,837	2,167	
29,7	1,335	1,627	2,119	
31,0	1,740	2,193	2,877	
32,5	2,279	3,039	3,864	
33,5	3,308	4,293	5,159	
35,0	3,704	4,734	5,476	
36,1	4,210	4,974	5,852	
37,5	4,622	5,852	6,256	
39,0	4,956	5,937	6,441	
40,0	4,412	5,253	5,748	
41,5	4,226	5,272	5,147	
42,5	2,528	3,006	3,610	
44,5	2,633	2,665	2,728	
46,0	2,331	2,331	2,331	
47,3	2,161	2,165	2,165	
49,0	0,127	0,124	0,124	
51,0	0,077	0,072	0,038	
53,5	0,105	0,102	0,098	

TABELA 7- COEFICIENTE DAS RETAS AJUSTADAS PELO COMPUTADOR
PARA AS CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO

ENTEROBACTER AEROGENES

SARCINA LUTEA

TEMPERATURA [GR.CENT.]	C1	C2	TEMPERATURA [GR.CENT.]	C1	C2
10.0	-4.06	0.0009	8.6	-3.13	0.0008
11.4	-3.99	0.0017	10.0	-3.71	0.0001
12.8	-4.23	0.0024	11.4	-3.58	0.0011
14.2	-4.32	0.0047	12.8	-3.44	0.0012
15.5	-4.44	0.0060	14.2	-3.52	0.0015
16.8	-4.19	0.0058	15.5	-3.25	0.0015
18.0	-4.25	0.0075	16.8	-3.72	0.0008
19.2	-4.10	0.0089	18.0	-3.30	0.0018
20.5	-4.31	0.0111	19.0	-3.11	0.0021
21.6	-4.32	0.0124	20.5	-3.28	0.0024
22.8	-4.12	0.0134	21.6	-3.14	0.0024
23.8	-4.23	0.0157	22.8	-3.17	0.0033
25.0	-4.04	0.0162	23.8	-3.38	0.0045
26.0	-4.05	0.0177	25.0	-3.33	0.0049
27.2	-4.18	0.0211	26.0	-3.58	0.0063
28.4	-4.02	0.0205	27.2	-3.54	0.0068
29.5	-4.06	0.0219	28.4	-3.58	0.0076
30.6	-3.94	0.0232	29.5	-3.58	0.0083
31.7	-4.03	0.0240	30.6	-3.58	0.0088
32.9	-3.75	0.0235	31.7	-3.59	0.0095
34.0	-4.11	0.0265	32.9	-3.45	0.0098
35.2	-4.19	0.0267	34.0	-3.62	0.0111
36.5	-4.08	0.0268	35.2	-3.52	0.0108
37.8	-3.28	0.0254	37.8	-4.09	0.0118
39.0	-3.95	0.0266	39.0	-3.20	0.0104
40.5	-3.76	0.0244	40.5	-2.86	0.0097
42.0	-3.76	0.0219	42.0	-2.96	0.0091
43.5	-3.84	0.0143	43.5	-3.16	0.0071
45.0	-3.52	0.0071			

TABELA 7- COEFICIENTE DAS RETAS AJUSTADAS PELO COMPUTADOR
PARA AS CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO

STAPHYLOCOCCUS AUREUS			PSEUDOMONAS AERUGINOSA		
TEMPERATURA [GR.CENT.]	C1	C2	TEMPERATURA [GR.CENT.]	C1	C2
13.0	-3.72	0.0023	20.0	-4.79	0.0039
14.6	-3.93	0.0026	21.0	-4.56	-0.001
16.5	-4.12	0.0035	22.7	-4.58	-0.001
18.0	-4.19	0.0045	24.0	-5.23	0.0111
19.6	-4.26	0.0058	25.0	-5.23	0.0110
21.0	-4.53	0.0085	26.0	-4.86	0.0108
22.5	-4.78	0.0108	27.5	-5.08	0.0127
24.0	-4.98	0.0137	28.5	-4.73	0.0155
25.0	-5.17	0.0163	29.7	-5.35	0.0186
26.4	-5.34	0.0191	31.0	-5.06	0.0183
27.6	-5.11	0.0203	32.5	-4.93	0.0194
29.5	-4.84	0.0204	33.5	-4.84	0.0210
30.2	-4.26	0.0193	35.0	-5.01	0.0231
31.5	-4.10	0.0196	36.1	-5.09	0.0238
32.8	-3.92	0.0202	37.5	-5.03	0.0248
34.8	-3.34	0.0211	39.0	-4.90	0.0244
35.6	-4.27	0.0246	40.0	-5.03	0.0240
37.0	-4.22	0.0257	41.5	-4.78	0.0225
38.5	-4.12	0.0257	42.5	-4.59	0.0176
40.0	-3.87	0.0244	44.5	-4.42	0.0119
41.5	-3.90	0.0256	46.0	-4.32	0.0083
43.0	-3.94	0.0261	47.3	-4.33	0.0048
44.4	-3.74	0.0231	49.0	-4.24	0.0008
46.0	-3.49	0.0190	51.0	-4.75	0.0007
47.8	-3.76	0.0108	53.5	-4.39	-0.001

TABELA 7- COEFICIENTE DAS RETAS AJUSTADAS PELO COMPUTADOR
PARA AS CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO

BACILLUS MEGATERIUM

ESCHERICHIA COLI

TEMPERATURA [GR.CENT.]	C1	C2	TEMPERATURA [GR.CENT.]	C1	C2
15.5	-2.86	0.0017	13.7	-3.81	-0.001
16.5	-2.81	0.0012	15.5	-4.26	0.0058
18.0	-3.16	0.0030	16.5	-4.34	0.0046
19.0	-3.03	0.0034	18.0	-3.79	0.0045
20.5	-3.16	0.0047	19.0	-4.26	0.0074
21.0	-3.28	0.0061	20.0	-3.99	0.0077
22.5	-3.24	0.0075	21.0	-4.09	0.0089
24.0	-3.31	0.0088	22.0	-3.79	0.0102
25.0	-3.33	0.0103	24.0	-4.18	0.0131
26.0	-3.32	0.0116	25.0	-4.06	0.0142
27.5	-3.30	0.0122	26.0	-4.00	0.0155
28.5	-3.26	0.0134	27.5	-3.93	0.0164
29.5	-3.36	0.0142	28.5	-3.89	0.0181
31.0	-3.21	0.0140	29.5	-4.45	0.0243
32.0	-3.22	0.0154	31.0	-3.94	0.0221
33.5	-3.19	0.0156	32.0	-3.87	0.0230
34.8	-3.06	0.0169	33.5	-3.85	0.0245
36.0	-2.85	0.0159	34.8	-3.83	0.0257
37.0	-3.15	0.0165	36.0	-3.71	0.0276
38.5	-3.01	0.0154	37.0	-3.86	0.0293
39.8	-3.10	0.0139	38.5	-3.78	0.0298
41.3	-3.19	0.0094	39.8	-3.75	0.0308
43.0	-2.65	0.0033	41.3	-3.74	0.0314
44.2	-2.65	-0.001	43.0	-3.65	0.0307
45.5	-2.61	-0.001	44.2	-3.66	0.0287
47.5	-2.74	-0.003	46.0	-3.73	0.0254
			48.0	-3.85	0.0091
			50.0	-4.05	-0.001

TABELA 7- COEFICIENTE DAS RETAS AJUSTADAS PELO COMPUTADOR
PARA AS CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO

SACCHAROMYCES CEREVISIAE

TEMPERATURA [GR.CENT.]	C1	C2	TEMPERATURA [GR.CENT.]	C1	C2
11.0	-3.87	-0.003			
12.5	-3.93	-0.001			
14.0	-4.39	0.0034			
15.3	-4.04	-0.001			
16.5	-4.12	0.0030			
17.9	-4.05	0.0039			
19.0	-4.12	0.0038			
20.0	-4.32	0.0051			
21.0	-4.21	0.0052			
22.0	-4.11	0.0052			
23.1	-3.95	0.0054			
24.2	-4.11	0.0062			
25.0	-4.07	0.0063			
26.5	-3.95	0.0063			
27.5	-4.05	0.0076			
28.5	-2.73	0.0060			
29.5	-3.79	0.0077			
30.8	-4.25	0.0086			
31.5	-4.31	0.0094			
33.0	-4.02	0.0086			
34.0	-4.24	0.0092			
35.3	-4.14	0.0092			
36.5	-3.09	0.0071			
37.6	-3.82	0.0071			
39.0	-3.97	0.0060			
40.0	-3.91	0.0051			
42.6	-3.96	0.0038			

TABELA 8 - Coeficientes das retas ajustadas pelo computador a curva de Arrhenius.

MICROORGANISMO	C ₁	C ₂
<u>Bacillus megaterium</u>	6,483	-3261,43
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	10,88	-4760,35
<u>Staphylococcus aureus</u>	4,029	-2406,44
<u>Escherichia coli</u>	7,671	-3485,81
<u>Enterobacter aerogenes</u>	8,729	-3804,41
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	17,07	-6420,72
<u>Sarcina lutea</u>	16,98	-6599,99

TABELA 9 - Comparação do cálculo da temperatura característica (μ) para o método convencional (manualmente) e o método proposto usando o computador.

MICROORGANISMO	μ (kcal/mol ⁰ C) mét. convenc.	método proposto
<u>Escherichia coli</u>	8,11	6,73
<u>Enterobacter aerogenes</u>	6,75	7,34
<u>Staphylococcus aureus</u>	4,44	4,64
<u>Bacillus megaterium</u>	6,95	6,29
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	10,81	12,40
<u>Sarcina lutea</u>	11,19	12,74
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	7,72	9,18

O valor de C₂ foi considerado como k (velocidade de crescimento específico) nos cálculos seguintes feitos pelo computador e foi usado na obtenção da curva de Arrhenius.

C. CURVA DE ARRHENIUS

A representação gráfica de $\ln k$ "versus" $1/T$, sendo que T é a temperatura em graus absolutos ($^{\circ}K$) dá uma curva conforme aparece nas figuras 4, 5 e 6, para os microrganismos estudados. Pode-se notar que mesmo sendo esta curva complexa, existe um intervalo de temperatura onde pode-se aproximar uma reta dos dados experimentais. No método convencional, esta aproximação é feita traçando-se uma reta manualmente sobre esta região.

No método aqui proposto, o computador ajusta uma reta através do método dos quadrados mínimos, desprezando os pontos onde não existe linearidade. A Tabela 8 mostra os coeficientes destas retas ajustadas pelo computador. Nota-se, ainda, que em todas as curvas existe um ponto máximo que coincide com a temperatura ótima de crescimento do microrganismo.

A Tabela 9 dá os valores de μ (temperatura característica) calculados pelo computador e manualmente. O coeficiente de correlação (R) entre os dados calculados manualmente e os obtidos pelo computador é de $R = 0,9445$ significando que existe uma correlação bastante estreita.

D. MÁXIMA BIOMASSA

A Tabela 10 mostra o resultado da D.C. em grama de massa seca por litro de cultura para as temperaturas de incubação estudadas, para um tempo de incubação de aproximadamente 24 horas.

Com isto, obtem-se as curvas mostradas nas figuras 7, 8 e 9 para os microrganismos estudados neste trabalho. Concordando com os dados da literatura, o ponto máximo destas curvas não coincide com o ponto máximo das curvas de Arrhenius. O ponto de máxima velocidade de crescimento está a alguns graus acima da temperatura de máxima biomassa.

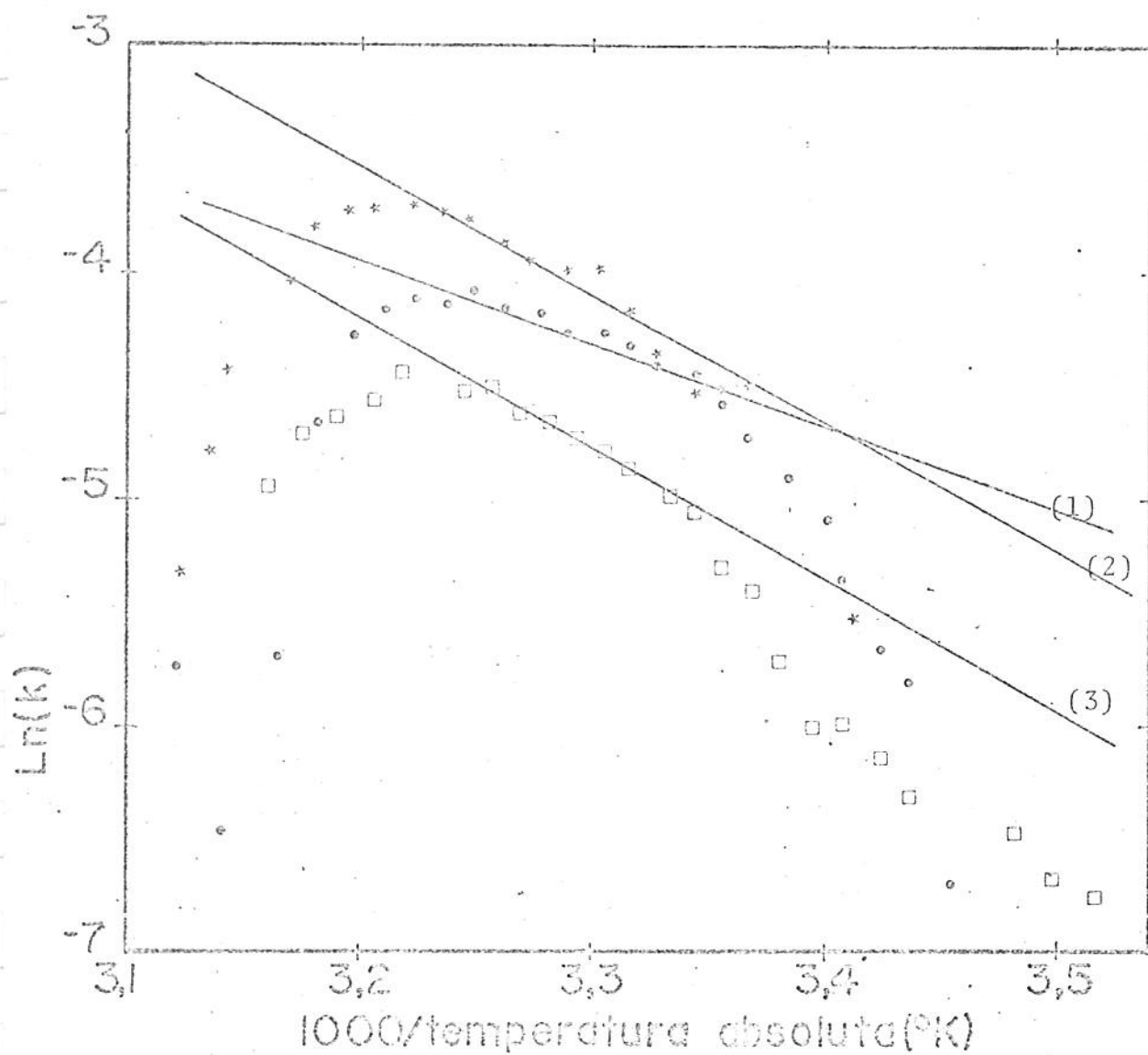


FIGURA 4- Curva de Arrhenius para tres microrganismos diferentes com as respectivas retas ajustadas manualmente (método convencional). 1(•) *Bacillus megaterium*; 2(*) *Pseudomonas aeruginosa*; 3(□) *Sarcina lutea*.

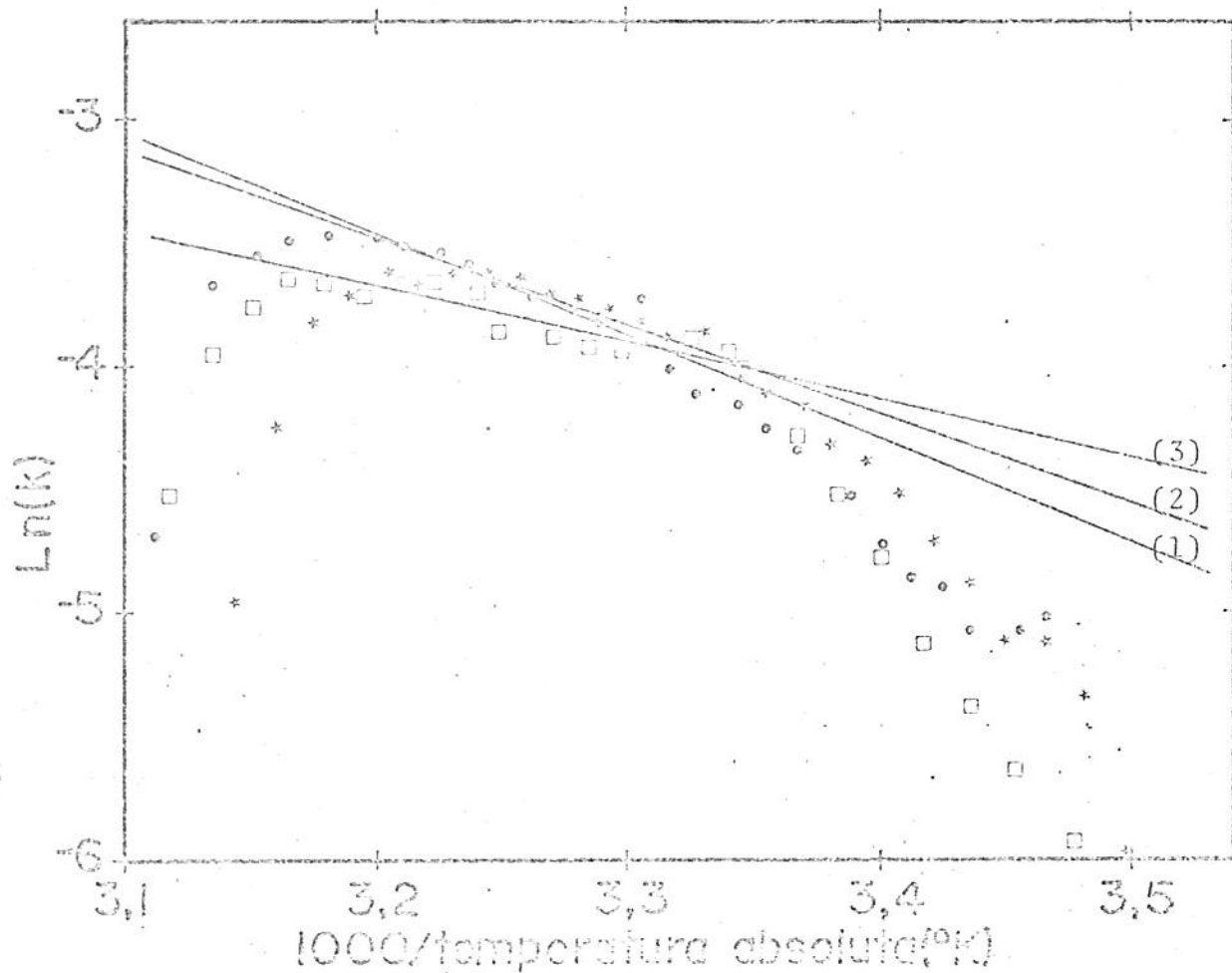


FIGURA 5 - Curva de Arrhenius para tres microrganismos diferentes com as respectivas retas ajustadas manualmente (método convencional). 1 (•) Escherichia coli; 2 (*) Enterobacter aerógenes; 3 (□) Staphylococcus aureus

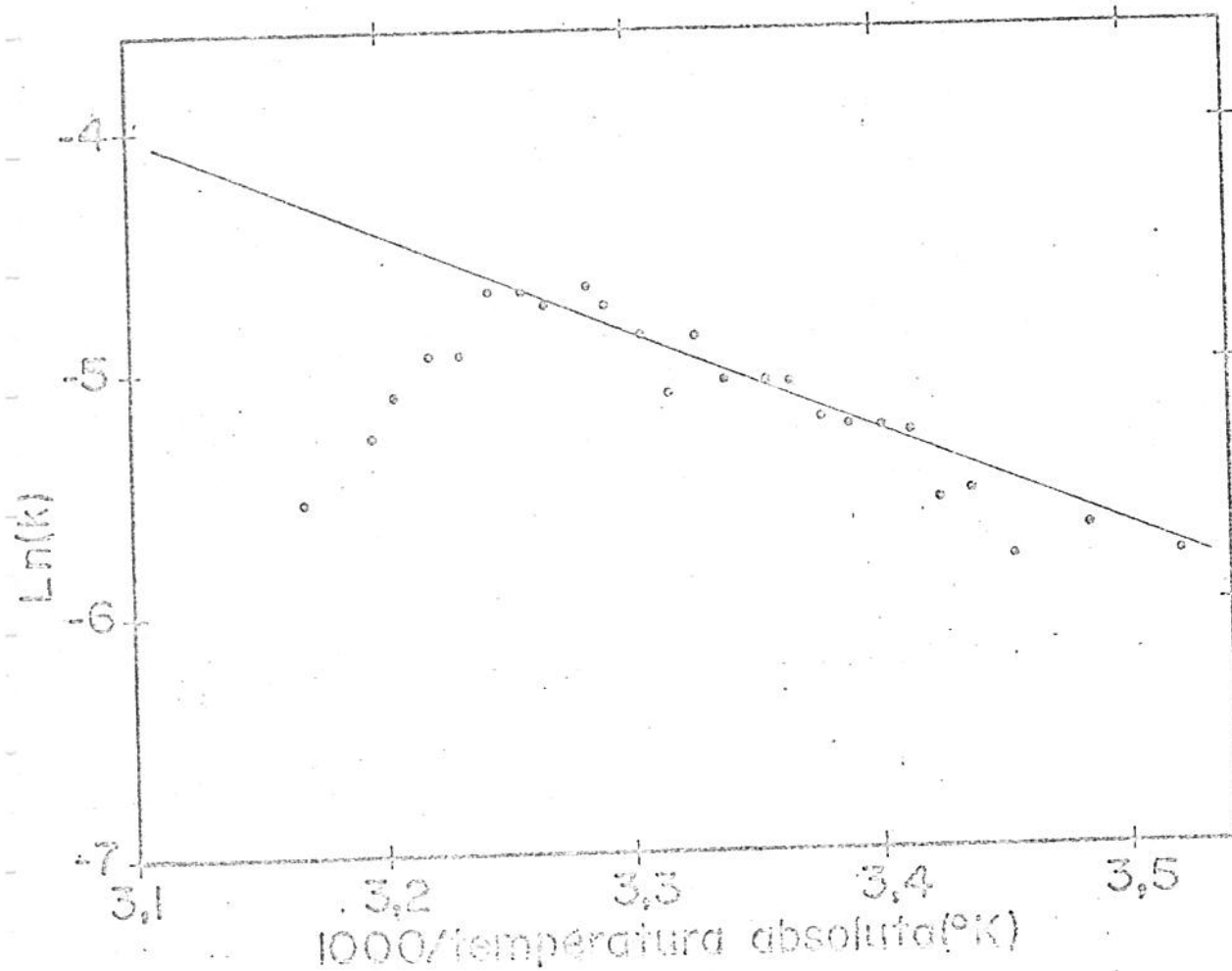


FIGURA 6 - Curva de Arrhenius para Saccharomyces cerevisiae, com a reta ajustada manualmente (método convencional).

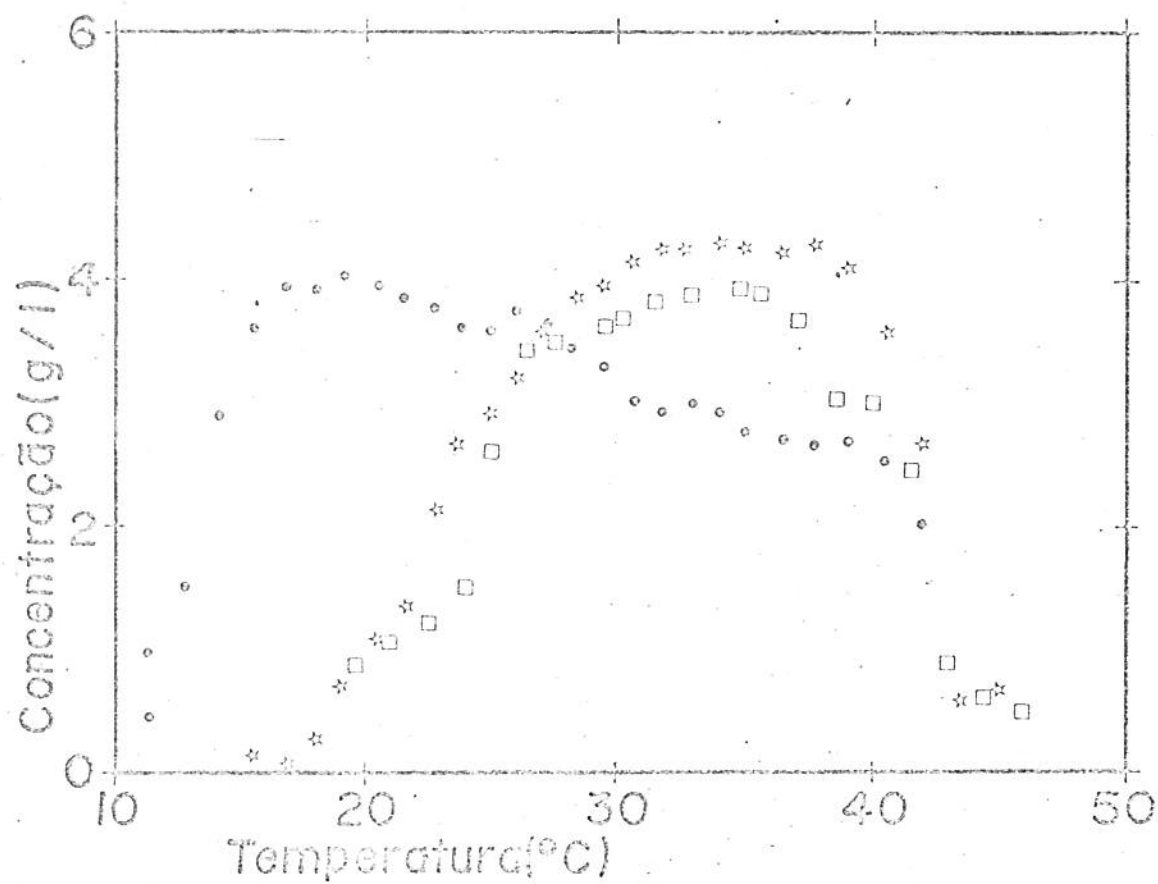


FIGURA 7 - Biomassa máxima para um tempo de incubação de 24 horas em incubador gradiente. 1(•) Enterobacter aerogenes; 2(*) Sarcina lutea; 3(□) Staphylococcus aureus.

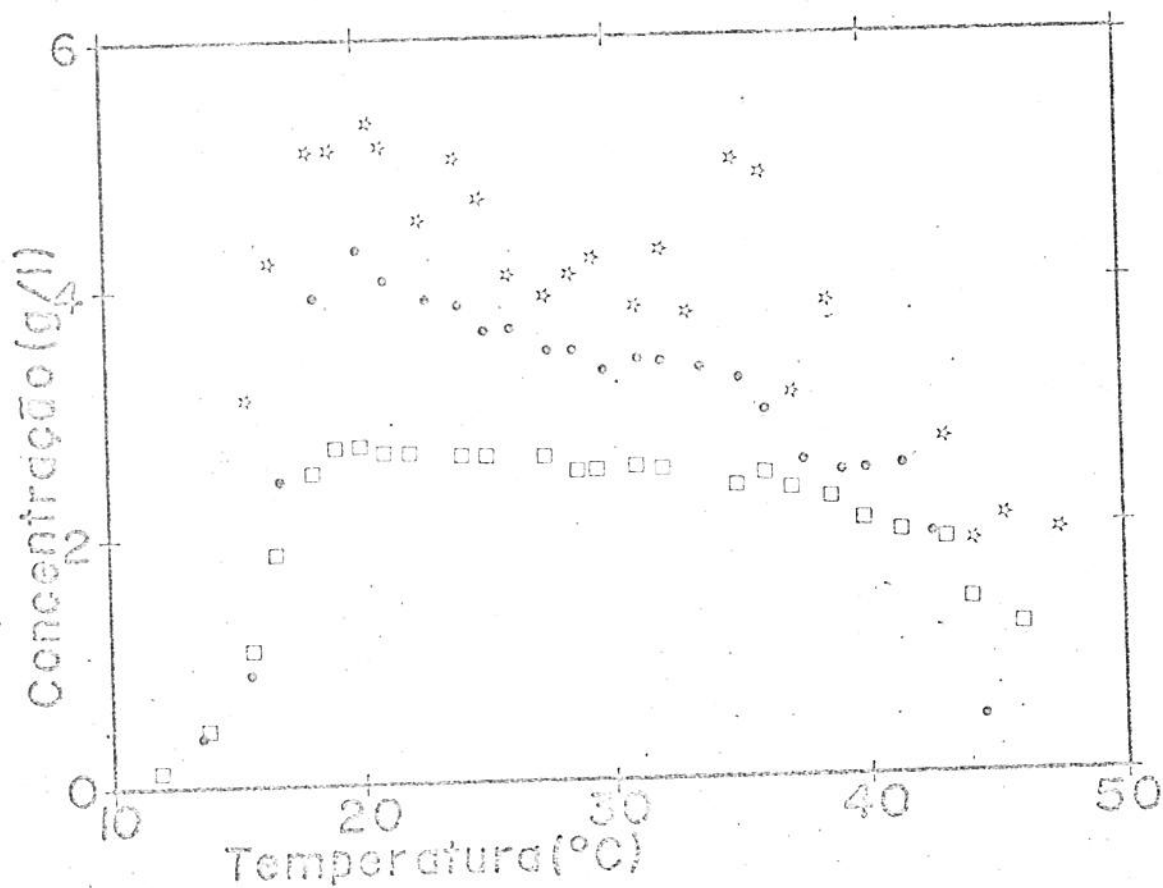


FIGURA 8 - Biomassa máxima para um tempo de incubação de 24 horas em incubador gradiente. 1(•) *Pseudomonas aeruginosa*; 2(*) *Bacillus megaterium*; 3(□) *Escherichia coli*.

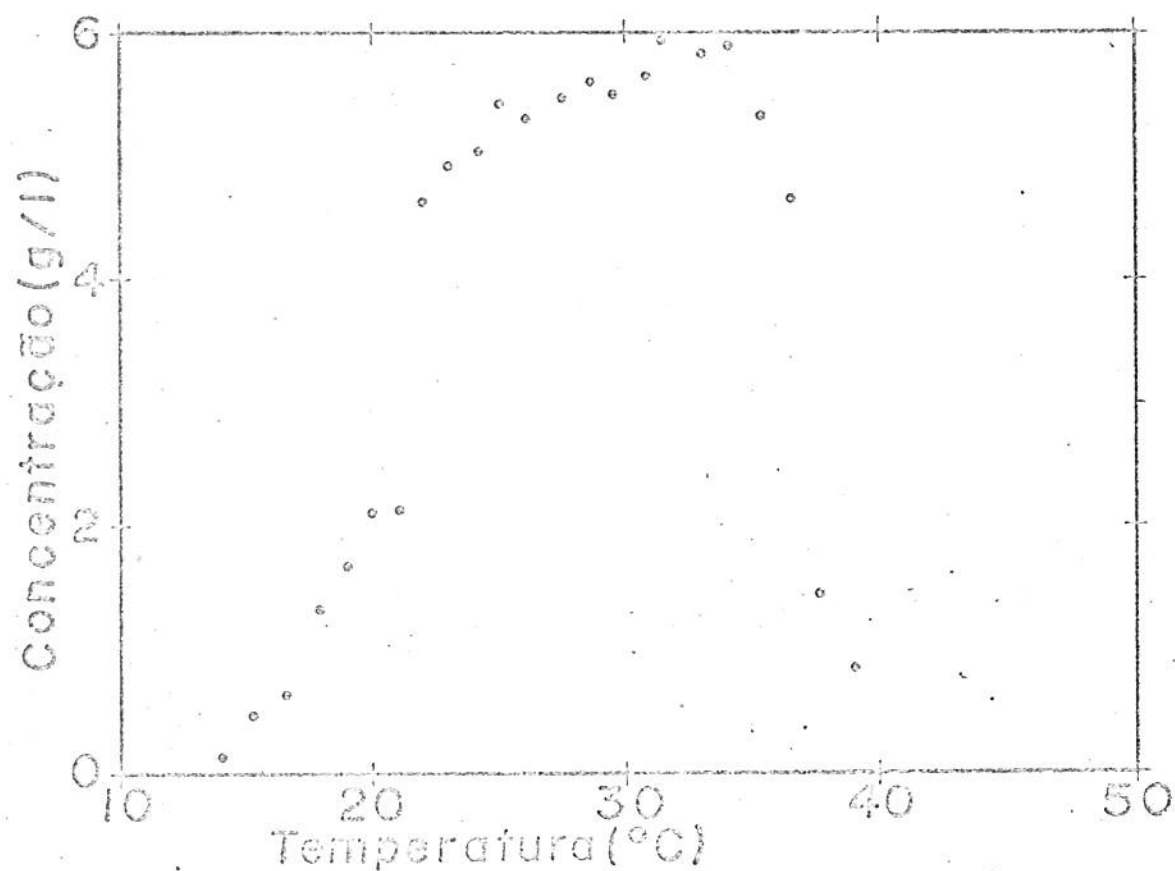


FIGURA 9 - Biomassa máxima para um tempo de incubação de 24 horas em incubador gradiente, para Saccharomyces cerevisiae.

TABELA 10- DENSIDADES MAXIMAS DE CELULA PARA OS MICROORGANISMOS ESTUDADOS E PARA DIFERENTES TEMPERATURAS

ENTEROBACTER AEROGENES		SARCINA LUTEA	
TEMPERATURA [GR.CENT.]	D.C. [G/L]	TEMPERATURA [GR.CENT.]	D.C. [G/L]
11.4	0.49	15.5	0.17
12.8	1.60	16.8	0.13
14.2	2.91	18.0	0.29
15.5	3.66	19.2	0.70
16.8	3.98	20.5	1.09
18.0	3.87	21.6	1.38
19.2	4.02	22.8	2.15
20.5	3.94	23.8	2.68
21.6	3.87	25.0	2.92
22.8	3.79	26.0	3.20
23.8	3.60	27.2	3.60
25.0	3.60	28.4	3.85
26.0	3.68	29.5	3.97
27.2	3.64	30.6	4.14
28.4	3.42	31.7	4.26
29.5	3.25	32.9	4.03
30.6	3.00	34.0	4.32
31.7	2.94	35.2	4.26
32.9	3.07	36.5	4.21
34.0	2.91	37.8	4.32
35.2	8.78	39.0	4.17
36.5	2.71	40.5	3.59
37.8	2.63	42.0	2.68
39.0	2.74	43.5	0.60
40.5	2.58	45.0	0.68
42.0	2.08		
43.5	0.93		

TABELA 10- DENSIDADES MAXIMAS DE CELULA PARA OS MICROORGANISMOS ESTUDADOS E PARA DIFERENTES TEMPERATURAS

STAPHYLOCOCCUS AUREUS		PSEUDOMONAS AERUGINOSA	
TEMPERATURA [GR.CENT.]	D.C. [G/L]	TEMPERATURA [GR.CENT.]	D.C. [G/L]
19.6	0.87	13.5	0.40
21.0	1.06	15.5	0.89
22.5	1.22	16.8	2.44
24.0	1.54	18.2	3.96
25.0	2.61	20.0	4.32
26.4	3.41	21.0	4.05
27.6	3.47	22.7	3.91
29.5	3.61	24.0	3.87
30.2	3.68	25.0	3.66
31.5	3.82	26.0	3.66
32.8	3.89	27.5	3.49
34.8	3.97	28.5	3.44
35.6	3.89	29.7	3.32
37.0	3.68	31.0	3.40
38.5	3.54	32.5	3.39
40.0	3.09	33.5	3.32
41.5	2.47	35.0	3.24
43.0	0.89	36.1	2.95
44.4	0.62	37.5	2.57
46.0	0.58	39.0	2.47
		40.0	2.80
		41.5	2.58
		42.5	1.91
		44.5	0.45

TABELA 10- DENSIDADES MAXIMAS DE CELULA PARA OS MICRORGANISMOS ESTUDADOS E PARA DIFERENTES TEMPERATURAS

BACILLUS MEGATERIUM		ESCHERICHIA COLI	
TEMPERATURA [GR.CENT.]	D.C. [G/L]	TEMPERATURA [GR.CENT.]	D.C. [G/L]
15.5	3.19	11.8	0.16
16.5	4.11	13.7	0.41
18.0	5.11	15.5	1.13
19.0	5.16	16.5	1.87
20.5	5.31	18.0	2.49
21.0	5.11	19.0	2.77
22.5	4.55	20.0	2.77
24.0	5.01	21.0	2.68
25.0	4.73	22.0	2.68
26.0	4.11	24.0	2.65
27.5	3.94	25.0	2.63
28.5	4.11	27.5	2.60
29.5	4.20	28.5	2.57
31.0	3.82	29.5	2.51
32.0	4.28	31.0	2.51
33.5	3.78	32.0	2.49
34.8	5.01	34.8	2.38
36.0	4.92	36.0	2.49
37.0	3.15	37.0	2.35
38.5	3.82	38.5	2.25
39.8	1.49	39.8	2.09
41.3	0.52	41.3	1.99
43.0	2.71	43.0	1.94
44.2	1.92	44.2	1.60
45.5	2.04	46.0	1.26
47.5	1.98		

TABELA 10- DENSIDADES MAXIMAS DE CELULA PARA OS MICROORGANISMOS
ESTUDADOS E PARA DIFERENTES TEMPERATURAS

SACCHAROMYCES CEREVISIAE

TEMPERATURA [GR.CENT.]	D.C. [G/L]
---------------------------	---------------

14.0	0.11
15.2	0.26
16.5	0.61
17.9	1.33
19.0	1.65
20.0	2.11
21.0	2.16
22.0	4.64
23.1	4.86
24.2	5.14
25.0	5.43
26.5	5.31
27.5	5.49
28.6	5.61
29.5	5.49
30.8	5.67
31.5	5.97
33.0	5.85
34.0	5.89
35.3	5.32
36.5	4.04
37.6	1.41
39.0	0.83

CONCLUSÕES

O uso do computador para a obtenção dos parâmetros de crescimento celular microbiano resultou numa série de vantagens a saber:

1. Possibilidade de executar maior número de ensaios, sendo os resultados mais significativos. O tempo de análise dos dados torna-se consideravelmente mais curto.
2. Menor erro na determinação das funções e conversões, uma vez que os métodos aqui apresentados são inteiramente numéricos enquanto que os métodos convencionais acarretam erros devido a aproximação visual pelo gráfico.
3. Estabelecimento de uma função ou um modelo matemático para a curva de relação D.O. x D.C. Tal função não existe ainda na literatura e facilita portanto o manuseio de resultados obtidos em Densidade Óptica que podem ser facilmente convertidos para concentração aplicando uma simples função.
4. A curva de crescimento é sempre locada com valores corrigidos para massa celular versus tempo.
5. Os valores dos parâmetros de crescimento tais como k e μ são obtidos instantaneamente.

APÊNDICE I - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NESTE TRABALHO

BHI - BRAIN HEART INFUSION

Composição para 1 litro de meio:

Infusão de miolo de bezerro	200 g
Infusão de coração de boi	250 g
Peptona proteose	10 g
Glicose	2 g
Cloreto de Sódio	5 g
Fosfato disódico	20 g

TSB - TRIPTIC SOY BROTH

Composição para 1 litro de meio:

Triptona (digestão pancreática da caseína USP)	17 g
Soja peptonada	3 g
Glicose	2,5g
Cloreto de Sódio	5 g
Fosfato dipotássico	25 g

BYMB - BACTO YEAST MEDIUM BROTH

Composição para 1 litro de meio:

Extrato de malte	20 g
Triptona	1,5 g
Peptona proteolítica	1,5 g
Maltose	20 g
Dextrina	5 g
Fosfato monopotássico	1 g
Cloreto de Amonia	1 g

APÊNDICE II - AJUSTE DA CURVA D.O. X DENSIDADE CELULAR

A. Descrição do Programa TESE 1

A análise de regressão foi feita através do programa TESE 1 listado a seguir. Basicamente tal programa consiste das seguintes partes:

Leitura dos Dados

Os dados foram previamente armazenados em arquivos nos discos do computador PDP-10, e foram lidos pelo programa através da subrotina IFILE.

Montagem da Matriz do Polinômio

A matriz das somatórias para o polinômio de grau N é gerada através do subprograma MONT. Vejamos a matriz do sistema de equações (veja item "Desenvolvimento das Equações", equação 10).

Os termos numa mesma diagonal são iguais, portanto, seja $A(I, J)$ uma matriz de I colunas e J linhas. Então tem-se:

$$A(1,1) = N; A(1,2) = A(2,1) = x_i,$$

$$A(1,3) = A(2,2) = A(3,1) = x_i^2, \dots \text{etc} \dots$$

Nota-se que, quando I cresce e J decresce simetricamente, os membros da matriz são iguais. Tal procedimento foi utilizado para o cálculo da parte da diagonal superior da matriz.

A somatória foi feita pela função SOMA, cujos argumentos são M, N_1 , N_2 , onde M é o número de dados a serem somados, N_1 é o expoente das abscissas, N_2 é o expoente das ordenadas.

Para o cálculo da parte inferior da matriz o procedimento é semelhante tendo duas diferenças fundamentais.

a) No caso anterior, um dos membros era calculado e os termos eram igualados desde a coluna 1 até a coluna simétrica. No presente caso, a primeira coluna nem sempre é feita igual a 1 e variará desde 1 até o número total de incógnitas.

b) No caso anterior a última coluna varia, ao passo que no presente caso, ela permanece constante.

A última parte do subprograma MONT consiste em se calcular os termos x e y . Tem-se desta maneira, a matriz das equações lineares da curva polinomial que melhor se ajusta aos dados experimentais em questão.

Cálculo dos coeficientes do polinômio

O cálculo dos coeficientes é feito pelo método da eliminação de Jordan. O subprograma que efetua a eliminação de Jordan é o ELJOR. Os coeficientes encontrados são de sinal invertido, porque no método, todos os coeficientes estão em um mesmo lado da equação e as variáveis dependentes y_i são igualadas a zero.

Comparação dos dados obtidos com os originais

A comparação entre os dados experimentais e os calculados pela função polinomial ajustada aos mesmos é feita pelo programa principal com a ajuda da função DIFY.

Esta função efetua a diferença entre um ponto experimental (x,y) e o mesmo ponto teórico calculado através do polinômio encontrado. A função que calcula o valor do ponto teórico é a função YY. As diferenças ponto teórico a ponto experimental são somadas e vários outros polinômios são ajustados e para cada polinômio a soma de diferenças é guardada.

O polinômio que melhor se ajusta aos dados experimentais é tomado como sendo o que dá menor soma de diferença.

```
SUBROUTINE MONT(M,NP)
COMMON AMA(21,21),IC(20)
```

```
C
C
C  CALCULO DA PARTE SUPERIOR DA MATRIZ
```

```
  N1=0
  DO 10 I=1,NP+1
    SOMAT=SOMA(M,N1,0)
    DO 9 LV=1,I
      KV=I-LV+1
      AMA(LV,KV)=SOMAT
    N1=N1+1
  N1=NP+1
```

```
C
C
C  CALCULO DA PARTE INFERIOR DA MATRIZ
```

```
  DO 15 I=2,NP+1
    SOMAT=SOMA(M,N1,0)
    KV=NP+1
    DO 14 LV=I,NP+1
      AMA(LV,KV)=SOMAT
    KV=KV+1
  N1=N1+1
```

```
C
C  CALCULO DOS TERMOS EM X E Y
```

```
  N1=0
  DO 16 I=1,NP+1
    AMA(NP,I)=SOMA(M,N1,1)
  N1=N1+1
  RETURN
END
```

```

C      ESTA FUNCAO CALCULA A SOMATORIA DE  $X^{N1} * Y^{N2}$ 
C      ONDE X E Y SAO PARES ORDENADOS E N1 E N2 SAO AS POTENCIAS
C      RESPECTIVAS
C
      FUNCTION SOMA(M,N1,N2)
      COMMON /DADOS/X(100),Y(100)
      SOMA=0
      DO 10 I=1,M
10     SOMA=SOMA+X(I)**N1*Y(I)**N2
      RETURN
      END

```

```

FUNCTION YY(NP,K)
COMMON A(21,21),IC(20)
COMMON /DADUS/X(100),Y(100)
YY=0
DO 1 I=1,NP+1
  I1=IC(I)
  YY=YY+A(NP,I1)*X(K)**(IC(I)+1)
RETURN
END

```

1

```
FUNCTION DIFY(M,NP)
COMMON /DADOS/X(100),Y(100)
DIFY=0
DO 1 I=1,M
DIFY=DIFY+ABS(Y(I)+YY(NP,I))
RETURN
END
```

1

```

C      ESTA SUBROUTINA EFETUA A ELIMINACAO DE JORDAN
C
C      SUBROUTINE ELJOR(N)
C      COMMON AMAT(21,41),IC(20)
C      FMATR(IF1,IF2,IV1,IV2)=(AMAT(IF1,IF2)*AMAT(IV1,IV2
*)+AMAT(IV1,IF2)*AMAT(IF1,IV2))/AMAT(IF1,IF2)
C
C      ZERAR A MATRIZ IC
C      DO 101 I=1,N+1
101    IC(I)=0
C      DO 20 I=1,N+1
20    IC(I)=0
C
C      ESCOLHA DO PIVOT
C
C      DO 2 J=1,N+1
C      IF(ABS(AMAT(I,J)).LE.1.E-15)GO TO 2
C      DO 1 M=1,N+1
C      IF(J.EQ.IC(M))GO TO 2
1    CONTINUE
C      IC(I)=J
C      GO TO 3
2    CONTINUE
C      TYPE 100,I
100   FORMAT(/,!      NAO HA SOLUCAO PARA O SISTEMA',I)
C      GO TO 1000
3    ICOL=IC(I)
C
C      CALCULO DOS TERMOS DIFERENTES DE COL E LINHA
C
C      LINHA > COL <
C
C      IF(ICOL.EQ.1)GO TO 8
C      IF(I.EQ.N)GO TO 10
C      DO 7 L=I+1,N
C      DO 7 K=ICOL+1,N+1
7    AMAT(L,K)=FMATR(I,ICOL,L,K)
8    CONTINUE
C
C      LINHA > COL >
C
C      IF(ICOL.EQ.N+1)GO TO 12
C      DO 9 L=I+1,N
C      DO 9 K=ICOL+1,N+1
9    AMAT(L,K)=FMATR(I,ICOL,L,K)
10   CONTINUE
C
C      LINHA < COL >
C
C      IF(I.EQ.1)GO TO 14
C      DO 11 L=I-1,1,-1
C      DO 11 K=ICOL+1,N+1
11   AMAT(L,K)=FMATR(I,ICOL,L,K)
12   CONTINUE
C
C      LINHA < COL <
C      IF(ICOL.EQ.1)GO TO 14
C      DO 13 L=I-1,1,-1
C      DO 13 K=ICOL+1,1,-1
13   AMAT(L,K)=FMATR(I,ICOL,L,K)
14   CONTINUE

```

```

C
C      TROCA DE SINAL DA LINHA /PIVOT
C
      IF(I.EQ.N)GO TO 44
      DO 4 K=I+1,N
4      AMAT(K,ICOL)=+AMAT(K,ICOL)/AMAT(I,ICOL)
41     IF(I.EQ.1)GO TO 55
      DO 5 K=I+1,1,-1
5      AMAT(K,ICOL)=+AMAT(K,ICOL)/AMAT(I,ICOL)
55     CONTINUE
      AUX=AMAT(I,ICOL)
      AMAT(I,ICOL)=1

C
C      DIVISAO DA LINHA PELA PIVOT
C
      DO 6 K=1,N-1
6      AMAT(I,K)=AMAT(I,K)/AUX
20     CONTINUE
1000    RETURN
      END

```

```

C      PROGRAMA PRINCIPAL
C
COMMON /DADOS/X(100),Y(100)
COMMON AM(21,21),IC(20)
DIMENSION      DIFA(21)
TYPE 2
ACCEPT 1,N,EXP
1  FORMAT(1,A5)
2  FORMAT(' ENTRAR COM O NUMERO DE DADOS!')
CALL IFILE(1,EXP)
READ(1,3)(X(I),Y(I),I=1,N)
END FILE (1)
3  FORMAT(2F)
DO 10 I=3,12
CALL MONT(N,I)
CALL ELJOR(I)
10  DIFA(I)=DIFY(N,I)
TYPE 11,(DIFA(I),I=3,12)
11  FORMAT(10X,E)
C
C      CALCULO DA MENOR DIFERENCA
C
M=3
DO 12 I=4,12
IF(DIFA(I).GE.DIFA(M))GO TO 12
IF(DIFA(M).LE.1.E-15)GO TO 12
IF(ABS((DIFA(M)-DIFA(I))/DIFA(M)).LT..8)GO TO 12
IF((DIFA(I-1).LT.1.E-20)GO TO 12
IF(ABS((DIFA(I-1)-DIFA(I))/DIFA(I)).LT..8)GO TO 12
M=I
12  CONTINUE
CALL MONT(N,M)
CALL ELJOR(M)
TYPE 4,(IC(I),AM(M,I),I=1,M-1)
4  FORMAT(/'      C(12,')='E)
CALL EXIT
END

```

APÊNDICE III - CÁLCULO DA CURVA DE ARRHENIUS

O cálculo da curva de Arrhenius é feito pelo programa listado a seguir. As seguintes partes compõem o programa:

Leitura dos dados

A leitura dos dados é feita pelo programa principal. Os dados são armazenados em arquivos cujo nome deve ter no máximo 5 dígitos e extensão DAT.

Deve ser guardado o nome da bactéria em questão, o número de temperaturas em que foram tomadas as leituras e o número de tempos; a temperatura e os D.O. tomados de 15 em 15 minutos e por fim os coeficientes da "reta de calibração".

Modificações nos dados

As D.O. são convertidas em densidade celular através dos coeficientes da reta de calibração. A variável tempo é gerada tendo em vista que a leitura de tempo é feita de 15 em 15 minutos. O logarítmo neperiano da densidade é então calculado.

Cálculo das declividades

Os dados são agrupados de 5 em 5 e é calculado uma declividade para cada grupo de dados. Consegue-se assim um número de retas.

$$nr = nt - 5$$

onde nr é o número de leituras, nt = (tempo do experimento em minutos)/15.

As declividades são achadas pelo método de regressão linear (Spiegel) através do subprograma REGR.

A declividade máxima é achada e são fixados 2 pontos, um superior e outro inferior cujas declividades não ultrapassem a 10% da declividade máxima. É achada a equação da reta que passa pelos pontos experimentais entre o intervalo destes dois pontos estabelecendo-se desta forma a reta.

Determinação da reta de Arrhenius

Para o estabelecimento da curva de Arrhenius os coeficientes das retas achados para cada temperatura, conforme o descrito na secção anterior são guardados em uma variável. As temperaturas já estão guardadas na variável TEMPER.

Modificações nas variáveis

A seguir é achado o logarítmo neperiano de DECL e o inverso da temperatura absoluta correspondente à temperatura TEMPER em °C.

Os resultados são guardados nas mesmas variáveis, isto é,

DECL (I) = ALOG (DECL (I)) e

TEMPER (I) = 1/(TEMPER (I) + 273) para I = 1,2,3,...,nt.

Cálculo das declividades

Como no caso da curva de crescimento os dados são agrupados de 5 em 5, e acha-se as declividades. Quando essas mudam de sinal, obtem-se o ponto superior que se deve considerar. O ponto inferior é estabelecido quando a declividade passa 100% no valor do ponto superior.

O estabelecimento de erro tão grande se deve ao fato de haver uma variação muito grande das declividades no método apresentado para a curva de Arrhenius. Estabelecido o intervalo, acha-se a reta pelo método de regressão linear.

Representação gráfica dos pontos

A curva de Arrhenius e da reta ajustada aos pontos é representada graficamente através do subprograma PLOT, na impressora de linha acoplada ao computador.

```

C      SUBROUTINE PLOT(X,Y,N)
C
C      SUBPROGRAMA QUE FAZ A PLOTAGEM DOS PONTOS
C
COMMON /PAR/C1,C2
DIMENSION X(50),Y(50),SAID(105)
DATA BRANC/' ','VE','V','XIX','X','AST','*','/'
A=C1
B=C2
C
C      DEFINAMOS AS ESCALAS
C
EX=(X(N)-X(1))/57.
MA=1
MI=1
DO 1 I=2,N
IF(Y(I).GT.Y(MA))MA=I
IF(Y(MA).LT.Y(MI))MI=I
EY=(Y(MA)-Y(MI))/105.
COLOCAMOS A ESCALA
C
PRINT 110
110  FORMAT('11')
Y1=Y(MI)
Y2=Y(MI)+35.*EY
Y3=Y(MI)+70.*EY
Y4=Y(MA)
PRINT 111,Y1,Y2,Y3,Y4
111  FORMAT(T16,E9.2,T51,E9.2,T86,E9.2,T112,E9.2)
DO 2 I=1,105
2    SAID(I)=BRANC
SAID(1)=VE
SAID(35)=VE
SAID(70)=VE
SAID(105)=VE
PRINT 112,SAID
112  FORMAT(' ',15X,105A1)
II=1
DO 6 I=1,57
DO 3 J=1,105
3    SAID(J)=BRANC
XPT=X(1)+(I-1)*EX
AA=A+B*XPT
JJ=ABS(AA-Y(MI))/EY+1
IF((JJ.GT.105).OR.(JJ.LT.1))GO TO 4
SAID(JJ)=AST
4    IF((X(II).LT.XPT).OR.(X(II).GE.(XPT+EX)))GO TO 5
J=(Y(III)-Y(MI))/EY+1
SAID(J)=XIX
II=II+1
GO TO 4
5    PRI=1/XPT*273.
6    PRINT 113,PRI,SAID
113  FORMAT(' ',E9.2,6X,105A1)
PRINT 114
114  FORMAT(' ',2X,'LEGENDA:  * = FUNCAO AJUSTADA ; X=PONTOS EX
1PERIMENTAIS')
RETURN
END
SUBROUTINE ORD(X,Y,NV)

```

```

C      ESTE SUBPROGRAMA ORDENA AS ABSISSAS
      DIMENSION X(100),Y(100)
      DO 2 II=NV,2,-1
      MA=1
      DO 1 I=2,II
1      IF(X(I).GT.X(MA))MA=I
      A1=X(II)
      A2=Y(II)
      X(II)=X(MA)
      Y(II)=Y(MA)
      X(MA)=A1
2      Y(MA)=A2
      RETURN
      END
      FUNCTION INF(X,II,FAT)
      DIMENSION X(50)
      I=0
      IF(II.EQ.1)GO TO 2
      DO 1 I=II-1,1,-1
1      IF(ABS((X(I)+X(II))/X(II)).GT.FAT)GO TO 2
      I=0
2      INF=I+1
      RETURN
      END
      FUNCTION ISUP(X,II,NT,FAT)
      DIMENSION X(50)
      I=INT+1
      IF(II.EQ.NT)GO TO 2
      DO 1 I=II,NT
1      IF(ABS((X(I)+X(II))/X(II)).GT.FAT)GO TO 2
      I=NT+1
2      ISUP=I-1
      RETURN
      END
      SUBROUTINE REGRES(II,IF)
      COMMON /RESUL/X(50),Y(50)
      COMMON /PAR/C1,C2
      SX=0
      SY=0
      SX2=0
      SXY=0
      NUT=IF*II+1
      DO 2 I=II,IF
      SX=SX+X(I)
      SY=SY+Y(I)
      SXY=SXY+X(I)*Y(I)
      SX2=SX2+X(I)*X(I)
2      DENO=NUT*SX2-SX*SX
      C1=(SY*SX2-SX*SXY)/DENO
      C2=(NUT*SXY-SX*SY)/DENO
      RETURN
      END
      SUBROUTINE REGR(II,IF,NJ)
      COMMON /PAR/C1,C2
      COMMON /DADOS/Y(100,50),X(100)
      SX=0
      SY=0
      SX2=0
      SXY=0
      NUT=IF-II+1

```

```

DO 2 I=II,IF
SX=SX+X(I)
SY=SY+Y(I,NJ)
2 SX2=SX2+X(I)*X(I)
DENO=NUT*SX2-SX*SX
C1=(SY*SX2-SX*SXY)/DENO
C2=(NUT*SXY-SX*SY)/DENO
RETURN
END

```

PROGRAMA PRINCIPAL

```

COMMON /RESUL/TEMPER(50),DECL(50)
COMMON /DADOS/X(100,50),Y(100)/PAR/C1,C2
DIMENSION XI(50),D(100),TITUL(30)
CONC(A)=A/(C11*A+C22)
INT=5
HT=15

```

LEITURA DOS DADOS

```

TYPE 7
ACCEPT 3,FIL2
CALL IFILE(1,FIL2)
READ(1,6)(TITUL(I),I=1,30)
READ(1,1)NTPOS,NTPER
DO 10 J=1,NTPER
10 READ(1,2)TEMPER(J),XI(J),(X(I,J),I=1,NTPOS)
READ(1,2)C11,C22
END FILE 1

```

GERACAO DA VARIAVEL Y(TEMPO)

```

Y(1)=0
DO 11 I=2,NTPOS
11 Y(I)=Y(I-1)+HT

```

MODIFICACOES EM X

```

DO 4 I=1,NTPOS
DO 4 J=1,NTPER
4 X(I,J)=CONC((X(I,J)+XI(J))/1000.)
II=1
53 IF=II+11
PRINT 5
IF(NTPOS.LT.IF)IF=NTPOS

```

FORMATO DO TITULO DO GRAFICO PARA A MASSA CELULAR

```

PRINT 55,(TITUL(K),K=1,30)

```

FORMATO 56 DO INICIO DO QUADRO

```

PRINT 56

```

FORMATO 57 DOS TEMPOS

```

PRINT 57,(Y(K),K=II,IF)

```

FORMATO 50 DA LINHA DE SEPARACAO

```

PRINT 58
DO 50 J=1,NTPER
50 PRINT 59,TEMPER(J),(X(I,J),I=11,IF)
PRINT 60
II=IF+1
IF(NTPOS.GT.IF)GO TO 53
PRINT 5
PRINT 8,(TITUL(L),L=1,30)
DO 12 I=1,NTPOS
DO 12 J=1,NTPER
12 X(I,J)=ALOG(X(I,J))
C
C
C CALCULO DAS DECLIVIDADES
C
DO 20 J=1,NTPER
DO 13 I=1,NTPOS=INT
IF(D(I).LE.0.)GO TO 301
30 IF(D(I).GT.D(MIN))MIN=I
301 CONTINUE
C
C
C VER ATE QUE PONTO PARA BAIXO SE DEVE CONSIDERAR(I1)
C
I1=INF(D,MIN,.1)
C
C
C VER ATE QUE PONTO PARA CIMA SE DEVE CONSIDERAR (I2)
C
I2=ISUP(D,MIN,NTPOS=INT,.1)+INT
CALL REGR(I1,I2,J)
PRINT 9 ,TEMPER(J),C1,C2
20 DECL(J)=C2
C
C
C MODIFICACOES NA DECLIVIDADE
C
DO 500 I=1,NTPER
DECL(I)=ALOG(ABS(DECL(I)))
500 TEMPER(I)=1/(TEMPER(I)+273)
C
C
C CALCULO DAS RETAS
C
CALL ORD(TEMPER,DECL,NTPER)
DO 520 J=1,NTPER=INT
CALL REGRES(J,J+1,NT)
520 D(J)=C2
C
C
C QUE PONTO A DECLIVIDADE MUDA DE SINAL
C
DO 530 J=1,NTPER=INT
530 IF(D(J).LT.0)GO TO 540
540 IPT=J+2
C
C
C PONTO SUPERIOR
C
I1=IPT
C
C
C PONTO INFERIOR
C
I2=ISUP(D,IPT,NTPER=INT,1.2)+INT
IF(I2.NE.NTPER)I2=I2-1
CALL REGRES(I1,I2)
ENER=-C2*1.9872

```

```

PRINT 555,C1,C2,ENER
CALL PLOT(TEMPER,DECL,NTPER)
555  FORMAT(' ',/?//,'EQUACAO DA RETA',
1'DE ARRHENIUS Y=','E',' + ','E',' *X',///
2,' ',5X,' ENERGIA DE ATIVACAO= ',E)
1  FORMAT(2I)
2  FORMAT(30F)
3  FORMAT(A6)
5  FORMAT('')
6  FORMAT(3A0A1)
7  FORMAT(' ARQUIVO EM QUE ESTAO GUARDADOS AS D.O.=?')
8  FORMAT(' ',20X'RESULTADOS PARA ',30A1,/)
9  FORMAT(' TEMPERATURA=','F6.1,4X,'C1=','F10.6,4X,'C2=','F10
*8)
55  FORMAT(' ',/,37X,'MASSA CELULAR EM G/L DE ',30A1,/)
56  FORMAT(' ',120(' '),/, ' I',2X,'TEMPE=','2X,' I',107X,' I',/
/, ' I',2X,'RATURA',2X,' I',46X,'TEMPO(MINUTOS)',47X,' I',/
* ' I',10X,' I',107X,' I',/, ' I',4X,, 'GR.',3X,' I',107X(' '), ' I')
57  FORMAT(' I',3X,'CENT.',2X,' I',12(2X,F4.0, ' I'))
58  FORMAT(' I',10(' '), ' I',12(8(' '), ' I'))
59  FORMAT(' I',F8.1, ' I',12(' ',F6.4, ' I'))
60  FORMAT(' ',120(' '))
CALL EXIT
END

```

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CANHOS, V.P. 1975 Estudo das características de espécies de Acetobacter. Tese apresentada para obtenção do título Mestre em Ciências de Alimentos, FTA - Unicamp - Campinas SP.
2. CONSTANTINIDES, A. 1970 The Application of Optimization Methods to mathematical models of fermentation processes. Tese apresentada para obtenção de grau de Doutor em Engenharia na Columbia University.
3. DEC - SYSTEM-10, 1972 Users Handbook - Digital Equipment Corporation; Maynard, Massachusetts.
4. DEC - SYSTEM-10, 1972 Mathematical Languages Handbook - Digital Equipment Corporation, Maynard, Massachusetts.
5. HANUS, F.J. e MORITA, R.Y. 1968 Significance of the temperature characteristic of growth. J. Bacteriol. 95;736-737.
6. INGRAHAM, J.L. 1958 Growth of psychophilic bacteria. J. Bacteriol. 76;75-80.
7. KUROKAWA, M.; HATANO, M.; KASHIWAGI, N.; SAITO, I.; ISHIDA, S. e HOMMA, R. 1962 A new method for the turbidimetric measurement of bacterial density. J. Bacteriol. 83;14-19.
8. LAMANNA, C. and MALLETT, M.F. 1965 Basic Bacteriology its biological and chemical background. The Williams Co. Baltimore, Md.
9. McCRACHEN, D. e DORN, W. 1966 Numerical Methods and Fortran Programing. A Willey International Edition - London.

10. MONOD, J. 1949 The growth of bacterial cultures. Ann. Rev. Mi
crobiol. 3;371-394.
11. NOWOSAD, P. 1974 Notas do curso de Programação Linear - Pós
Graduação FEA - Unicamp, Campinas, SP.
12. PACITTI, T. 1972 Fortran Monitor - Princípios. Ao Livro Técnico
S.A. Rio de Janeiro.
13. PERRY, J.H. 1963 Chemical Engineers' Handbook - Sec 1-25 Mc.
Graw-Hill, Kogakusha - London - Tokyo.
14. SHAW, M.K. 1967 Effect of Abrupt temperature shift on the
growth of mesophilic and psychophilic yeast. J. Bacteri-
ology 93;1332-1336.
15. SPIEGEL, M.R. 1968 Estatística - Ao Livro Técnico S.A. Rio de
Janeiro.
16. YOKOYA, F. 1974 Efeito da concentração salina sobre o cresci-
mento de Staphylococcus aureus. Trabalho apresentado ao
VI Congresso Latino-Americano de Microbiologia, Caracas, Venezuela.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Fumio Yokoya, pela orientação e dedicação durante a realização deste trabalho.

À Direção da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pelas possibilidades oferecidas para o desenvolvimento desta tese.

Ao Centro de Computação da Universidade Estadual de Campinas, pelo uso dos sistemas de computador.