

RECUPERAÇÃO DE CEPAS DE *Vibrio parahaemolyticus* INOCULADAS NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*, SUBMETIDO ÀS TEMPERATURAS DE RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO

Recovery of *Vibrio parahaemolyticus* strains inoculated on the shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to cooling and freezing temperatures

Danielle Batista Rolim Sousa¹, Antonio Aduato Fonteles-Filho², Camila Magalhães Silva³, Oscarina Viana de Sousa², Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira²

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo recuperar *Vibrio parahaemolyticus*, inoculado em homogenato de camarão *Litopenaeus vannamei* livre de vibrios, submetido a diferentes temperaturas de refrigeração (caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer) por dez dias, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias. Foram realizadas seis repetições do experimento, no período de outubro de 2005 a março de 2006. O camarão foi adquirido na feira de pescado da Praia do Mucuripe, Fortaleza-Ceará. Em laboratório, 1.500 g de camarão eram lavados com água destilada e imersos em água fervente por cinco minutos para eliminar qualquer *Vibrio* presente na amostra. A contaminação do camarão era feita mediante o contacto dos animais com a cultura de *V. parahaemolyticus*, por cinco minutos. A amostra era dividida em 40 frações de 25 g sendo uma delas usada para contagem no tempo zero e as restantes divididas em três lotes sendo estocadas em três temperaturas: caixa isotérmica com gelo (-1 a 13°C), geladeira (11°C) e congelador (-21°C). Por 10 dias seguidos, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias, *V. parahaemolyticus* eram quantificados nos camarões através do Método de Contagem Padrão em Placas, em meios de TCBS e PCA. Todas as três temperaturas foram eficientes no controle da viabilidade de *V. parahaemolyticus*. A ação do frio gerado por gelo, geladeira e freezer inibe o crescimento dessa bactéria em camarões, sendo a temperatura do freezer, a mais eficiente na redução dessa espécie bacteriana no camarão *L. vannamei*.

Palavras-chaves: *Vibrio parahaemolyticus*, cepas, inoculação, camarão, *Litopenaeus vannamei*, efeito da temperatura.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures of refrigeration (refrigerator, freezer and isothermic box with ice) during ten days and on the 15th, 20th and 25th days. The experiment was repeated six times from October, 2005 to March, 2006. Shrimps were obtained on a fish market located at Praia do Mucuripe, Fortaleza, Ceará. In the laboratory, the shrimps were washed with distilled water and immersed in boiling water for five minutes in order to eliminate any other *Vibrio* species in the sample. The inoculation happened with the contact between the shrimps and the *V. parahaemolyticus* culture for five minutes. Then, the sample was divided in forty 25-g portions, one of which was used as initial time. The other 39 portions were separated in three batches maintained on freezer (-21°C), refrigerator (11°C) and isothermic box with ice (-1°C to 13°C). The number of *V. parahaemolyticus* was monitored for 10 days and on 15th, 20th and 25th days by the plate count method on TCBS and PCA media. All temperatures were efficient to control the viable cells of *V. parahaemolyticus*. The action of cold produced by ice, refrigerator and freezer inhibit the bacterial growth on shrimps. The freezer was the most efficient treatment in reducing the action of *V. parahaemolyticus* on the shrimp *L. vannamei*.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, strains, inoculation, shrimp, *Litopenaeus vannamei*, temperature effect.

¹ Estudante do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará.

² Professor e pesquisador do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará.

³ Estudante do Programa de Ciências Marinhas Tropicais, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará.

INTRODUÇÃO

Por ser um alimento rico em nutrientes, principalmente proteínas, o pescado é bastante suscetível ao ataque e/ou ao desenvolvimento microbiano, além de sofrer alterações físico-químicas que irão refletir em sua cor, consistência, odor e sabor, podendo ocasionar riscos à saúde dos consumidores (Sousa, 2003).

A temperatura de estocagem de pescados é um dos parâmetros mais importantes para regulação da atividade dos microrganismos nos sistemas alimentares. Devido ao impacto desse parâmetro em todas as reações da célula, a adaptação dos microrganismos a variações de temperatura é, possivelmente, o tipo de reação mais pesquisado (Palumbo, 1986; Gounot, 1991; Berry; Foegeding, 1997). Contudo, a sensibilidade das células ao estresse causado pelo frio é dependente de vários fatores, incluindo temperatura, taxa de resfriamento/congelamento, meio de cultura, cepa microbiana que infecta o pescado e duração de estocagem.

Diferentes tratamentos de choque no pescado após o congelamento ou resfriamento podem resultar em diferenças na sobrevivência e crescimento microbianos. Um bom entendimento do mecanismo de adaptação ao resfriamento pode oferecer uma melhor compreensão sobre os métodos para controle de crescimento de microrganismos psicrófilos em alimentos resfriados ou congelados (Beales, 2004). Assim, o objetivo dessa pesquisa foi testar a recuperação de cepas de *V. parahaemolyticus* inoculadas em camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, livre de *Vibrio* e incubado em ambientes sob diferentes temperaturas de refrigeração: caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer.

MATERIAL E MÉTODOS

A matéria-prima utilizada como substrato para inoculação de cepa de *V. parahaemolyticus* foi o camarão marinho *L. vannamei* obtido na feira de pescado da Praia do Mucuripe, Fortaleza-Ceará, e transportado até o laboratório de microbiologia do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) em caixas isotérmicas, para então se proceder ao experimento.

No período de outubro de 2005 a março de 2006 foram realizadas seis repetições dos experimentos, utilizando-se sempre camarão marinho com carapaça e cabeça, em lotes de 1.500 g.

A cepa de *V. parahaemolyticus* sorotipo K 15 foi cedida pela FIOCRUZ, Rio de Janeiro, e havia sido isolada de um surto de gastroenterite acontecido em Cascavel (CE) em 1975 (Hofer, 1983). A cepa foi con-

servada em Ágar-Tripticase-Soja (TSA-DIFCO) 3% de NaCl e estocada em estufa B.O.D.

Com o intuito de se inocular um grande número de células, a cepa de *V. parahaemolyticus*, mantida em TSA 3% de NaCl, foi renovada a cada 24 horas. Desse crescimento tirava-se um inóculo, repicava-se em 150 mL de Caldo Tripton-Soja - TSB 3% e incubava-se por 24 horas a 37°C, após o que os 150 mL do meio eram transferidos para Erlenmeyers contendo 1.350 mL de TSB 3% de NaCl para que o inóculo fosse aumentado.

Experimento-piloto

Foi realizado um experimento-piloto para se testar a temperatura e o tempo ideal para se eliminar qualquer vibrio que estivesse presente na amostra de camarão, uma vez que no experimento seriam inoculados camarões totalmente livres de víbrios. Para tanto, foi usado um caldo de TSB 3% NaCl inoculado com cepas puras de *V. parahaemolyticus*.

A cultura de *V. parahaemolyticus* (em 150 ml TSB 3%) foi diluída em um béquer de 2.500 mL contendo 1.350 mL de TSB 3%. O camarão (1.500 g), previamente limpo, ficava em contato por cinco minutos com a diluição de TSB 3%. Depois de se retirar uma alíquota de 25 g em T=0, o restante foi colocado em contato com água fervente sendo recolhidos 25 g do camarão a cada cinco minutos, até os 20 minutos, para homogeneização em salina 3% estéril e diluídos até 10⁻⁶, e plaqueados em Ágar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS - DIFCO). Essa operação foi repetida até que se soubesse qual o tempo ideal para que não fosse mais recuperada nenhuma célula de *V. parahaemolyticus*, para se infectar novamente os camarões na certeza de que nenhuma destas (naturais da microbiota do camarão) interferisse nos resultados. Foram estriadas placas de TCBS antes (controle positivo) e depois da eliminação dos víbrios pelo calor, sob temperatura previamente testada.

Tratamento dos camarões

As amostras de 1.500 g de camarão foram separadas de contaminantes macroscópicos e lavadas por duas vezes com água destilada, para a remoção de sujidades. Objetivando eliminar as bactérias da sua microbiota de origem, o camarão era imerso em água fervente por cinco minutos, tempo já confirmado como ideal para eliminar a microbiota contaminante.

Para se confirmar a eliminação da microbiota, uma alíquota de 25 g foi homogeneizada em 225 mL de solução salina 3% de NaCl estéril e feitas diluições até 10⁻⁶. Procedia-se ao plaqueamento nos meios de TCBS

usando-se técnicas de espalhamento para se testar a presença de bactérias sacarose negativa em paralelo ao experimento. As placas foram incubadas por 24 horas, a 35°C em estufa e, em seguida, observado se havia crescimento de alguma colônia nas placas.

A cultura de *V. parahaemolyticus* em 150 ml TSB 3% foi diluída em béquer de 2.500 mL contendo 1.350 mL de TSB 3%.

O camarão, já livre de microrganismos, foi artificialmente contaminado por contato durante cinco minutos com essa cultura. Em seguida, foram feitas diluições do caldo TSB 3% contaminado e, destas 0,1 mL foi inoculado em placas de TCBS para quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *V. parahaemolyticus* usadas na contaminação do camarão. Esta era a contagem do inóculo, sendo sua quantificação feita através do método de Contagem Padrão em Placas (CPP).

Ao final da contaminação, a amostra de camarão foi dividida em 40 frações de 25 g, uma das quais foi também homogeneizada para contagem dos vibrios no tempo inicial, T=0. As outras 39 frações foram acondicionadas em placas de Petri esterilizadas, envolvidas com papel filme, divididas em três lotes de 13 amostras e estocados nos seguintes ambientes: (a) caixa isotérmica com gelo, em temperaturas entre -1°C e 13°C, onde as placas eram suspensas em estantes para evitar a entrada de gelo derretido (o gelo era repostado a cada 24 horas); (b) geladeira, a 11°C; (c) freezer, a -21°C.

Diariamente uma amostra de cada lote foi retirada para ser analisada, após homogeneização em 225 ml de solução salina 3% de NaCl por um minuto. A partir das diluições de 10⁻⁷ e 10⁻¹⁰, alíquotas de 0,2 mL foram inoculadas em meio de TCBS e alíquotas de 1,0 mL, em meio Plate Count Agar (PCA), com plaqueamento em duplicata. As placas foram incubadas por 18 - 24 horas a 35°C, sendo selecionadas aquelas que com número de colônias entre 25 e 250. Todas as contagens eram acompanhadas por uma placa-controle plaqueada com *V. parahaemolyticus*, tanto em meio de PCA, como em de TCBS, incubadas por 24 e 18h, respectivamente, a 35° C.

Análise Estatística

A análise estatística da influência da refrigeração produzida por caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer (definidos como tratamentos) sobre os valores da UFC/g de *V. parahaemolyticus*, nas condições de TCBS e PCA, foi realizada com três objetivos: (1) comparar a eficiência dos tratamentos na redução da UFC/g, através dos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn; (2) comparar a taxa relativa de redução da UFC/g em função do tempo de atuação dos tratamentos, através do teste t aplicado à comparação do coeficiente angular das respectivas equações de regressão; (3) estimar o valor do intervalo de tempo necessário para anular a contaminação por *V. parahaemolyticus*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Previamente, foi possível constatar, através de plaqueamento em meio Ágar TCBS, que nenhuma célula de *Vibrio* permaneceu viável após a exposição do camarão à água fervente, por cinco minutos. A partir daí, este passou a ser o tempo de exposição das células de *V. parahaemolyticus* utilizado no experimento-problema.

Os resultados das contagens em TCBS e em PCA, de *Vibrio parahaemolyticus* dos homogenatos de camarão estocados sob as diferentes temperaturas dos três tratamentos - em caixa isotérmica com gelo (-1 a 13°C), em geladeira (11°C) e em freezer (-21°C), por um período contínuo de 10 dias, e nos 15°, 20° e 25° dias (Tabelas I e II; Figuras 1 e 2).

As oscilações observadas nas contagens das UFC de *V. parahaemolyticus* na incubação dos ca-

Tabela I - Valores logaritizados, em seis repetições (R), das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* (UFC/g) em ágar tiossulfato citrato-bile sacarose (TCBS), inoculado no camarão *Litopenaeus vannamei* sob as temperaturas do gelo (-1 a 13°C), geladeira (11°C) e freezer (-21°C).

Tempo (dia)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (UFC/g)																	
	Caixa Isotérmica com gelo						Geladeira						Freezer					
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R1	R2	R3	R4	R5	R6
0	5,5	6,7	4,7	4,7	7,7	7,8	5,5	6,7	4,7	4,8	7,8	7,8	5,5	6,7	4,7	4,8	7,8	7,8
1	7,8	9,0	7,6	9,2	9,6	8,7	4,9	7,8	5,8	5,3	7,4	6,9	4,7	5,2	3,7	4,4	5,2	7,1
2	7,7	9,0	9,2	9,7	9,8	8,0	5,1	5,8	5,9	6,1	9,3	6,0	4,1	3,7	4,5	3,7	5,2	5,7
3	7,5	9,3	9,0	10,0	10,6	8,3	6,0	7,1	6,5	7,4	8,8	5,1	3,7	3,5	3,8	2,7	3,7	4,2
4	7,6	9,1	9,8	9,1	10,2	9,1	5,7	5,6	4,8	6,4	8,1	4,7	3,5	3,5	2,7	0	4,7	4,6
5	7,1	7,0	8,9	7,7	8,6	7,4	5,4	7,1	6,0	5,4	7,0	3,8	2,7	4,0	2,7		4,3	3,7
6	6,7	7,9	7,8	8,0	9,5	7,6	4,3	6,2	6,5	4,3	7,2	4,2	3,0	2,7	0		4,2	4,4
7	7,9	7,2	7,5	8,0	8,5	7,6	4,3	5,4	5,9	5,6	6,4	5,4	2,7	2,7			3,5	4,2
8	7,0	4,7	9,2	8,5	9,6	9,3	4,2	6,9	7,2	3,8	7,4	4,7	0	0			0	3,4
9	5,0	5,8	7,4	7,9	8,8	7,4	4,5	6,4	6,9	0	7,4	3,7						0
10	4,7	5,5	7,5	6,8	7,2	5,0	3,7	5,4	5,3		4,7	3,9						
15	0	5,2	6,4	0	6,0	0	3,4	4,4	4,7		4,5	3,5						
20		0	0		0		2,7	0	4,2		4,1	0						
25							0		0		0							

marões em gelo podem ser atribuídas às variações na temperatura do sistema, com o decorrer das horas, pelo derretimento do gelo (Tabela I; Figura 1), pois a cada 24 horas, a caixa era aberta para que se retirasse a amostra e se completasse o gelo, o que aumentava a temperatura ambiental e a multiplicação das células que por acaso ainda estivessem viáveis. O mesmo raciocínio pode ser usado para estocagem dos camarões em geladeira mas, nesse caso, os experimentos 2, 3 e 4 tiveram um ligeiro aumento em relação ao inóculo.

O fato das bactérias adaptadas ao frio se desenvolverem em temperaturas de refrigeração com crescimento equivalente ou muito menor que o de mesófilas significa que elas devem conter proteínas (enzimas) adaptadas para funcionar em baixas temperaturas (Russell, 2002). Esta observação é corroborada por Gooch *et al.* (2002), ao verificarem um elevado aumento de células em ostras após 24 horas de refrigeração, com uma diminuição após 14 dias de armazenagem. Segundo Panoff *et al.* (1994), quando culturas são transferidas de 30°C para 10°C, a taxa de crescimento é reduzida, mas alcança o máximo de densidade óptica após 25 horas, que é quando a sobrevivência é maior.

Somente as incubações do homogenato em freezer, nos seis experimentos, tiveram seu inóculo reduzido desde o Tempo Zero até, no máximo, nove dias, quando contados em TCBS. Observa-se que o experimento 4, na estocagem de freezer, teve já no 3º dia, uma redução de 99,16%. Por outro lado, foram necessários sete dias para que ocorresse uma redução de 99,99% no experimento 5 e oito dias no experimento 6. Este fato pode ser atribuído às diferenças no tamanho de inóculos uma vez que, apesar de ter-se usado sempre a mesma cepa e o mesmo diâmetro de alça de níquel cromo, quando medidos por CPP em meio de TCBS, esses inóculos variaram nas suas contagens (Tabela I). Segundo Vieira (2004), o método da Contagem Padrão em Placas (CPP) estima o número de células viáveis contido num alimento qualquer, mas este é passível de erros, pois células estressadas podem não se desenvolver no meio mesmo estando presentes no alimento.

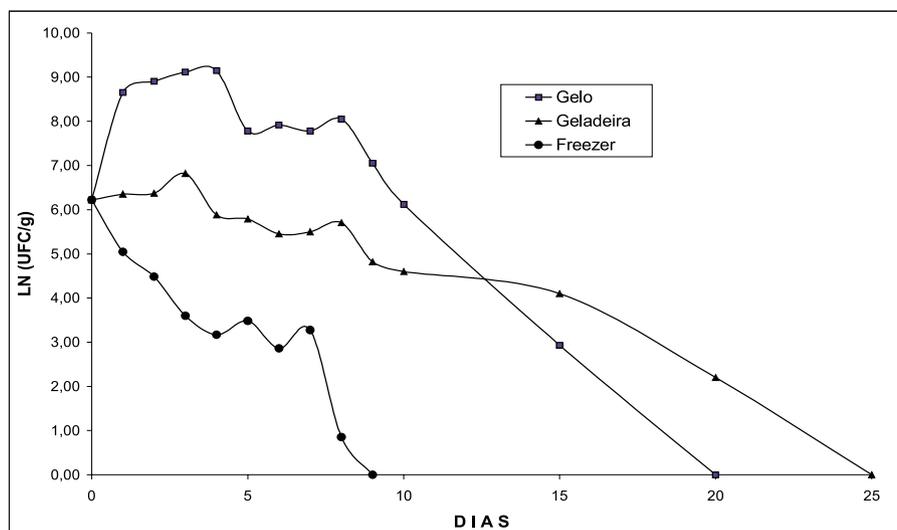


Figura 1 - Contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em agar tiossulfato citrato-bile sacarose, a partir do homogenato preparado com o camarão *Litopenaeus vannamei*, sob as temperaturas do gelo (-1 a 13°C), geladeira (11°C) e freezer (-21°C).

Segundo Russell (2002), a estocagem a baixas temperaturas de alimento processados reduz as taxas metabólicas dos microrganismos infectantes desse alimento e, conseqüentemente, a sua habilidade de sobrevivência e multiplicação. Cowell & Hug (1994), Ravel *et al.* (1995) e Kell *et al.* (1998), estudando a resposta e tolerância do *V. cholerae* O1 a baixa temperatura, verificaram que algumas células em cultura podem ser recuperadas do estado de latência com grande decréscimo da atividade metabólica celular a fim de competir na temperatura de 5°C, significativamente abaixo do ótimo de crescimento (35°) para este patógeno. *V. parahaemolyticus* também tem um ótimo de temperatura entre 35 e 37°C (Beuchat, 1982) e tal raciocínio também pode ser aplicado nesse caso.

Burnham (2006) mostrou que várias cepas de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*, desenvolvidas em TSB, possuem diferenças significativas no crescimento e sobrevivência quando estocadas a 5°C, 8°C ou 10°C, por 10 dias. Cepas de *V. vulnificus* estariam em estado viável mas não cultivável quando transferidas de 37 para 5 ou 8°C, enquanto que a maioria podia crescer a 10°C. Cepas de *V. parahaemolyticus* cresceram durante o armazenamento em 8-10°C, e sobreviveram mas não cresceram quando transferidas de 37°C a 5°C.

A redução nas UFC de *V. parahaemolyticus* das placas de TCBS, em freezer, é mais rápida do que em PCA. Levanta-se a hipótese de que o meio ágar PCA, sendo não-seletivo, favoreceria o crescimento de algumas outras bactérias presentes no camarão *L. vannamei* e que teriam resistido à fervura. É importante frisar que o TCBS é seletivo para víbrios, enquanto o ágar PCA é favorável ao crescimento de

todas as bactérias, razão por que os números de UFC/g em placas de PCA são bem mais elevados do que aqueles encontrados em contagens de TCBS.

É possível se verificar também que houve, no geral, pequenos aumentos nas contagens de UFC/g de *V. parahaemolyticus* no meio em TCBS e pequenas quedas em PCA durante alguns dias, nas temperaturas de incubação em caixa isotérmica com gelo e em geladeira, o mesmo não acontecendo nas temperaturas de freezer. Mesmo em PCA, as contagens do camarão estocados em freezer tenderam sempre a diminuir, o que atesta o efeito deletério do frio a células bacterianas. A única diferença apresentada pelos diferentes experimentos foi quão mais rápido o inóculo inicial foi zerado (Tabelas I e II; Figuras 1 e 2). Lamprecht (1980), trabalhando com caudas de lagosta inoculadas com *V. parahaemolyticus* e esto-

cadadas em -16°C , constatou que a bactéria resistia de uma semana a três meses dependendo do inóculo inicial, se leve ou pesado.

Na estocagem em caixa isotérmica com gelo, todos os inóculos iniciais aumentaram para ambas as contagens, em TCBS e PCA. É válido o mesmo raciocínio empregado anteriormente para as contagens de *V. parahaemolyticus* em TCBS: provavelmente o inóculo estaria na fase logarítmica de crescimento e/ou havia condições de temperatura para as células viáveis crescerem. As células mesófilas, que não os vibrios, se houvessem resistido ao calor, provavelmente poderiam ter-se multiplicado, fato que explica o decréscimo do número de células de *V. parahaemolyticus* até zero quando ainda havia crescimento de colônias no PCA (Tabela II; Figura 2).

Tabela II - Valores logaritimizados, em seis repetições (R), das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* (UFC/g) em plate count agar (PCA) inoculado no camarão *Litopenaeus vannamei*, sob as temperaturas do gelo (-1 a 13°C), geladeira (11°C) e freezer (-21°C).

Tempo (dias)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (UFC/g)																	
	Caixa Isotérmica com gelo						Geladeira						Freezer					
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R1	R2	R3	R4	R5	R6
0	6,6	7,31	4,7	5,5	7,8	8,0	6,6	7,3	4,7	5,5	7,8	8,0	6,6	7,3	4,7	5,5	7,8	8,0
1	8,8	10,0	8,4	9,0	9,6	9,8	6,3	8,9	6,6	9,0	9,3	7,0	4,8	5,9	4,5	3,7	5,3	6,1
2	7,6	10,4	9,7	9,1	9,2	7,9	5,8	9,6	7,4	9,1	8,9	6,4	4,7	5,9	4,0	2,6	4,7	6,4
3	8,3	11,2	9,7	8,0	10,0	8,3	5,0	9,7	6,9	8,0	8,7	6,1	4,3	6,9	3,1	3,1	4,3	4,7
4	8,6	11,2	10,7	9,1	9,8	9,7	6,7	8,7	7,8	9,1	8,1	7,7	5,2	6,9	3,0	2,9	4,7	4,8
5	9,9	10,9	10,7	7,1	7,7	8,4	8,2	10,7	7,9	7,1	6,8	7,3	4,8	5,6	2,7	-	4,7	4,8
6	10,7	11,7	11,7	9,1	8,9	8,6	7,2	10,4	8,7	8,6	7,1	8,1	4,0	5,0	2,3	-	4,4	4,3
7	10,2	12,0	9,0	9,7	8,4	9,7	9,1	11,6	9,7	9,7	7,9	7,4	3,4	4,6	-	-	3,7	3,9
8	10,3	12,7	9,7	8,7	9,5	10,1	8,5	10,7	9,0	8,7	9,4	8,7	2,7	3,7	-	-	3,4	3,3
9	9,0	12,5	10,7	8,9	9,2	11,7	9,2	11,7	9,3	8,7	9,2	9,7	-	-	-	-	-	2,9
10	9,8	11,9	10,7	9,7	10,7	12,6	9,1	11,5	9,4	-	10,7	9,3	-	-	-	-	-	-
15	10,1	12,9	9,1	10,1	11,7	11,7	9,4	10,8	8,4	-	11,5	10,1	-	-	-	-	-	-
20	-	11,1	9,0	-	11,7	-	10,0	10,4	8,2	-	11,7	9,7	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	9,3	-	7,6	-	11,6	-	-	-	-	-	-	-

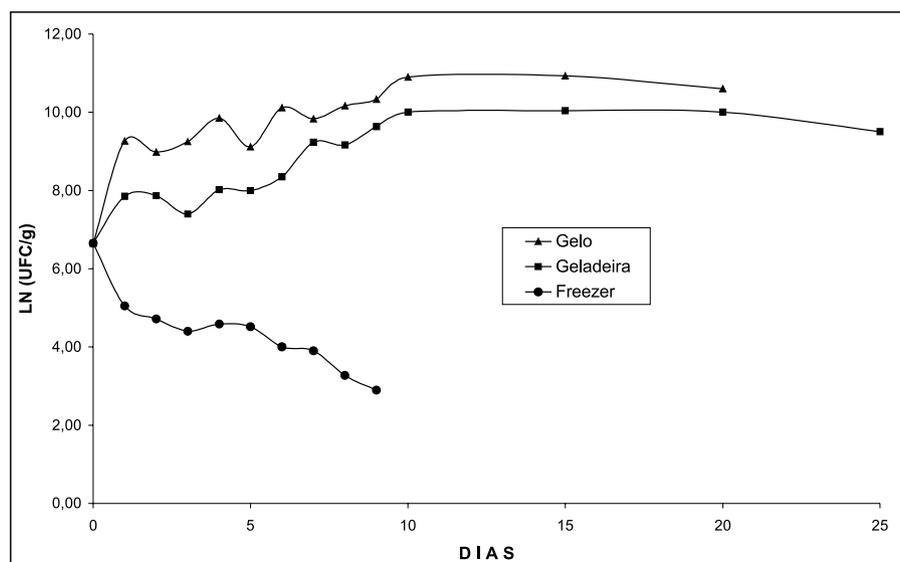


Figura 2 - Contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em plate count agar, a partir do homogenato preparado com o camarão *Litopenaeus vannamei*, sob as temperaturas do gelo (-1 a 13°C), geladeira (11°C) e freezer (-21°C).

Quando os camarões foram estocados em geladeira e o homogenato foi contado em PCA, os valores das contagens de *V. parahaemolyticus* em UFC/g aumentaram na segunda contagem e depois decresceram com algumas oscilações entre o quinto e o vigésimo dia. Mesmo as repetições 1 e 6, que não tiveram um aumento no segundo dia (correspondente ao dia 1), mais tarde, quase no final dos repetições também apresentaram este fato, provavelmente porque alguma célula mesófila de outra bactéria que houvesse resistido à fervura do camarão, teria se adaptado ao frio do ambiente e proliferado. Ratificando essa idéia, Campbell e Williams (1952) relataram que a contagem bacteriana de camarões da Costa do Golfo (México), estocados em gelo, caiu nos quatro primeiros dias devido ao declínio de bactérias mesófilas em temperaturas frias, aumentando gradualmente até o fim da estocagem.

A maior redução nos valores das células viáveis, tanto em meio de TCBS quanto em PCA, ocorreu durante a estocagem em freezer (-21°C). Na Figura II-c observa-se que o inóculo em PCA não chegou a zero, pois o objetivo era zerar a recuperação de *V. parahaemolyticus*, o que foi feito em meio TCBS, em tempos diferentes. Tão logo esse fato aconteceu, a repetição foi encerrada. Células diferentes de *Vibrio* podem ter permanecido viáveis além de nove dias, o tempo mais demorado para a inviabilidade das células de *V. parahaemolyticus* em meio TCBS.

Os resultados obtidos com o teste de Dunn para as comparações da eficiência, duas a duas, dos tratamentos "caixa isotérmica com gelo", "geladeira" e "freezer", na eliminação do *V. parahaemolyticus* (Tabela III), estão descritos a seguir:

Tabela III - Resultados obtidos com o teste de Dunn, para as comparações da eficiência, duas a duas, entre as temperaturas do gelo, geladeira e freezer na eliminação do *Vibrio parahaemolyticus* de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*.

Tratamento	Postos	\bar{R}	SE	$\bar{R}_i - \bar{R}_j$	Valor de Q
TCBS					
Gelo	9.453,5	137,0	6,880	56,292	8,182**
Geladeira	5.811,5	80,7			
Gelo	9.453,5	137,0	6,306	96,193	15,253**
Freezer	1.755,0	40,8			
Geladeira	5.811,5	80,7	6,423	39,901	6,212*
Freezer	1.755,0	40,8			
PCA					
Gelo	10.514,5	140,2	7,165	32,572	4,546*
Geladeira	8.394,5	107,6			
Gelo	10.514,5	140,2	6,599	111,306	16,867**
Freezer	1.415,5	28,9			
Geladeira	8.394,5	107,6	6,707	78,734	11,739**
Freezer	1.415,5	28,9			

Observação: * = significante ao nível $\alpha = 0,05$; ** = significante ao nível $\alpha = 0,01$.

Condição de crescimento da bactéria em meio TCBS - (a) caixa isotérmica com gelo x geladeira: $\bar{R} = 137,0$; $R_j = 80,7$; $Q = 8,182$ ($P < 0,01$); (b) caixa isotérmica com gelo x freezer: $R_i = 137,0$; $R_j = 40,8$; $Q = 15,253$ ($P < 0,01$); (c) geladeira x freezer: $R_i = 80,7$; $R_j = 40,8$; $Q = 6,212$ ($P < 0,01$).

Condição de crescimento da bactéria em meio PCA - (a) caixa isotérmica com gelo x geladeira: $\bar{R}_i = 140,2$; $R_j = 107,6$; $Q = 4,546$ ($P < 0,05$); (b) caixa isotérmica com gelo x freezer: $R_i = 140,2$; $R_j = 28,9$; $Q = 16,867$ ($P < 0,01$); (c) geladeira x freezer: $R_i = 107,6$; $R_j = 28,9$; $Q = 11,739$ ($P < 0,01$).

Portanto, o poder de eliminação da bactéria pelos tratamentos se apresentou com a seguinte ordem decrescente: freezer > geladeira > caixa isotérmica com gelo.

Na Tabela IV pode-se verificar os dados relativos aos resultados obtidos com o teste t, para as comparações, duas a duas, da taxa de decréscimo (b) da UFC/g de *V. parahaemolyticus* em função do tempo, entre os tratamentos "caixa isotérmica com gelo", "geladeira" e "freezer", para a condição de crescimento da bactéria em meio TCBS.

Tabela IV - Resultados obtidos com o teste t, para as comparações, duas a duas, da taxa de decréscimo (b) da UFC/g de *Vibrio parahaemolyticus* inoculado no camarão *Litopenaeus vannamei*, entre os tratamentos com gelo, geladeira e freezer, para a condição de crescimento da bactéria em meio ágar tiossulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS).

Tratamento	S_{xx}	$(s^2)_{yx}$	$S_{(b_1-b_2)}$	(b_1-b_2)	Valor de t
Gelo	164,5				
Geladeira	335,0	1,7441	0,1257	0,2174	1,729 ns
Gelo	164,5				
Freezer	42,0	1,6283	0,2206	0,0245	0,112 ns
Geladeira	335,0				
Freezer	42,0	1,1620	0,1764	0,2419	1,375 ns

Observação: ns = não-significante ao nível $\alpha = 0,05$.

A taxa relativa de redução da UFC/g, comparada duas a duas através do coeficiente angular das respectivas equações de regressões, para os três tratamentos, nas condições de TCBS e PCA, apresentou os seguintes resultados: Condição de crescimento da bactéria em meio TCBS - (a) caixa isotérmica com gelo x geladeira: $t = 1,729$; $P > 0,05$; (b) caixa isotérmica com gelo x freezer: $t = 0,112$; $P > 0,05$; (c) geladeira x freezer: $t = 1,375$; $P > 0,05$.

Condição de crescimento da bactéria em meio de PCA - (a) gelo x geladeira: $t = 1,010$; $P > 0,05$; (b) gelo x freezer: $t = 0,708$; $P > 0,05$; (c) geladeira x freezer: $t = 1,484$; $P > 0,05$.

Tendo em vista que a hipótese de nulidade foi aceita em todas as comparações, conclui-se que a UFC/g de *V. parahaemolyticus* apresentou tendência

de decréscimo em função do tempo de exposição aos tratamentos, mas apenas para a condição de crescimento da bactéria em meio TCBS.

Os valores do intervalo de tempo (média das seis repetições) necessários para anular (em termos de contagem de colônias cultiváveis) a contaminação por *V. parahaemolyticus* foram os seguintes, para as células crescidas em TCBS: (a) geladeira = 14,5 dias; (b) caixa isotérmica com gelo = 11,4 dias; (c) freezer = 7,0 dias. Esses dados mostram que a eficiência dos métodos de conservação do camarão varia de acordo a forma de estocagem, na seguinte ordem decrescente: freezer, caixa isotérmica com gelo e geladeira.

A Conferência Interestadual de Sanitização de Moluscos, realizada em Washington, D.C. (EUA), adotou um plano de controle que requer refrigeração a $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$ de ostras na Costa do Golfo com, no máximo, 10-14 horas após a colheita (NNSP, 1997). Esta estratégia foi recomendada tendo por base de estudos a restrição no crescimento de *Vibrio vulnificus* quando exposto a temperaturas abaixo de $7,2^{\circ}\text{C}$ (Oliver, 1995; Baker *et al.*, 1997).

Na presente pesquisa, a redução de temperatura na estocagem se mostrou eficiente para diminuir a carga bacteriana e até eliminar *V. parahaemolyticus* contaminantes de camarões marinhos.

CONCLUSÃO

As três temperaturas foram eficientes na redução de células viáveis de *Vibrio parahaemolyticus*. A ação do frio gerado por gelo, geladeira e freezer inibe o crescimento dessa bactéria em camarões, sendo a temperatura do freezer, a mais eficiente na redução dessa espécie bacteriana em crustáceos. Recomenda-se que os camarões comercializados sejam congelados, uma vez que esta é a metodologia mais eficiente no combate ao *Vibrio parahaemolyticus*, bactéria comum em pescados de águas marinhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker, C. *et al.* The lethal effect of cold shock on *Vibrio vulnificus*. 97th, Miami Beach: *American Society for Microbiology*, p. 324, 1997.
- Beales, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Chicago, v.3, n.1, p.1-20, 2004.
- Beuchat, I. R. *Vibrio parahaemolyticus* public health significance. *Food Technol.*, Chicago, v. 36, n. 3, p.80-83, 1982.
- Berry, E. D. & Foegeding, P. M. Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *Journal Food Protection*, Des Moines, v. 60, n. 10, p. 1256-1258, out. 1997.
- Burnham, V. E. Strain to strain differences in the growth, survival and adaptation of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in broth. 2006. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Louisiana State University, 2006.
- Campbell, L. L.; Williams, O. B.; The bacteriology of gulf cost shrimp. IV Bacteriological, chemical and organoleptic changes with ice storage. *Food Technology*, Chicago, v. 6, p. 125-126, 1952.
- Cowell, R. R.; Hug, A. Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. In: Wachsmuth I.K.; Blake, P. A. (eds). *Vibrio cholerae: molecular and global perspectives*. Washington: *American Society for Microbiology*, 1994.
- Gooch, J. A. *et al.* Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in Postharvest American oysters. *Journal of Food Protection*, Des. Moines, v. 65, n.6, p. 970-974, 2002.
- Gounot, A. M. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 71, p. 386-397, 1991.
- Hofer, E. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil, de infecção gastrointestinal humana. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 14, p. 174-175, 1983.
- Kell, D. B. *et al.* Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, Dordrecht, v. 73, n.2, p. 169-187, 1998.
- Lamprecht, E. C. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* during freezing. *Journal Science Food Agricultural*, South Africa, v. 31, p. 1309-1312, 1980.
- National Shellfish Sanitation Program. Manual of operations: sanitation of the harvesting, processing and distribution of shellfish. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 1997.
- Oliver, J. D. Formation of viable but nonculturable cells. In: Kjellberg, S. (ed.) *Starvation in bacteria*. New York: Plenum Press, 1995.
- Palumbo, S.A. Is refrigeration enough to restrain food-borne pathogens? *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 49, n. 12, p. 1003-1009, 1986.

Panoff, J. M. et al. Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IL1403. *Cryobiology*, San Diego, v. 32 n. 6, p. 516-520, dez. 1994.

Ravel, J. et al. Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but non-culturable state: growth or resuscitation? *Microbiology*, London, v. 141, p. 377-383, 1995.

Russell, N.J. Bacterial membranes the effects of chill storage and food processing-an overview. *Internation-*

tional Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 79, n. 1/2, p. 27-34, 2002.

Sousa, D. B. R. *Sobrevivência de Vibrio parahaemolyticus em camarão sete-barbas Xiphopenaeus kroyeri estocado em temperaturas de resfriamento e congelamento*. Monografia de Graduação, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, 58 p, Fortaleza, 2003.

Vieira, R. H. S. F. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado*. Livraria Varela, 299 p., São Paulo, 2004.