

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Julio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DA FAMÍLIA
Enterobacteriaceae E *Clostridium estertheticum* COM A
DETERIORAÇÃO “BLOWN PACK” EM CORTES
CÁRNEOS EMBALADOS A VÁCUO**

Lívia Mara Felipe

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2008

F315a Felipe, Lívia Mara
Associação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Clostridium estertheticum* com a deterioração “blown pack” em cortes cárneos embalados a vácuo / Lívia Mara Felipe – – Jaboticabal, 2008
xii, 86f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Oswaldo Durival Rossi Júnior
Banca examinadora: Luiz Augusto do Amaral, Ana Maria Centola
Vidal Martins
Bibliografia

1. carne embalada vácuo 2. clostrídios psicrófilos 3. deterioração
“blown pack” 4. enterobactérias. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.31:637.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lívia Mara Felipe – nascida em Ribeirão Preto, São Paulo, em 08 de Abril de 1983, é Médica Veterinária, formada em dezembro de 2005, pela Universidade Estadual Paulista, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, SP. Durante toda a graduação realizou estágios na área de Medicina Veterinária Preventiva em diferentes instituições, foi bolsista de iniciação científica e participou de projetos de extensão e grupos de pesquisa na mesma área. Em março de 2006 ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, onde desenvolveu o projeto da dissertação, como bolsista do CNPq, além de outros trabalhos paralelos na mesma área.

EPÍGRAFE

**“Certos atalhos nos levam de
encontro a certos compromissos que
não cumpriríamos, caso insistíssemos
na trajetória retilínea”**

Carlos A. Baccelli /Irmão José

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais Marinez José Vitório Felipe e José Olavo Felipe que sempre apoiaram meus estudos e abdicaram dos caprichos da vida para formar suas três filhas com muito esforço, amor e dedicação.

Ao meu orientador Prof.Dr.Oswaldo Durival Rossi pela orientação, por depositar sua confiança em mim, por sua compreensão e paciência em ensinar

Às minhas irmãs Ludimila Felipe e Letícia Felipe por existirem e por compartilharem comigo os melhores e piores momentos sempre me fortalecendo.

A minha avó e segunda mãe Herta José Vitório por ser um exemplo de fortaleza e amor e por transmitir sempre a esperança de que tudo dará certo.

Aos meus cunhados Eduardo e Erick pela força e positivismo.

À Prof^a.Dr^a. Iolanda Nunes, da Universidade Federal de Goiás, por compartilhar seu conhecimento e sabedoria com os alunos da pós-graduação.

Ao Prof.Dr. Albenones José de Mesquita por ter me recebido com muito carinho no Centro de Pesquisa em Alimentos da Universidade Federal de Goiás, cedendo seus laboratórios e toda a abertura para a realização deste experimento.

À Ms.Ursula Rauecker Nunes, Ms.Flávia Isabel, Alessandra César, Thiago, Leonardo,Thaís, Giselle, Marcele pelas pessoas maravilhosas que são, pela amizade, bom humor sempre, força e conhecimento me ajudando em tudo o que precisei para realizar este experimento com tranqüilidade.

Aos amigos e funcionários do CPA que sempre me apoiaram e me ajudaram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, Wilson Ricardo, Euzinha, Neuza, Rosângela, Sandra, Profa.Cíntia.

Às minhas companheiras de república e amigas Letycia Goulart, Luciana Pacheco, Denyse Goulart, Iana Marinho, Tana Rosa, Daniela Guerra, Maria, Carol, Dani e Ryla pelo espírito da amizade, por substituírem minha família nas horas de saudade, de alegria, de tristeza, agradeço-as pela companhia, pela atenção, paciência, por serem

tantas vezes minha família, por serem tantas vezes irmãs e amigas, pelos banquetes servidos na Casa Verde e por existirem, Graças a Deus!

Aos meus amigos Renato Maluta e Najara Silva pela sinceridade e por serem além de amigos, cúmplices de um tempo muito bom.

Agradeço a minha amiga Cárta pela amizade fiel e pelo apoio que nunca deixou faltar durante toda a caminhada.

Ao Prof.Dr. João Ademir pelo auxílio estatístico.

Ao CNPq pela bolsa.

A todos aqueles que me ajudaram de alguma forma para a concretização deste trabalho e a Deus que nunca me abandonou em nenhum momento.

SUMÁRIO

Assunto	Página
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Quadros.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Deterioração da carne bovina fresca embalada a vácuo.....	2
2.1.1 Deterioração “blown pack”.....	7
2.2 Enterobactérias.....	10
2.2.1 Principais gêneros da família <i>Enterobacteriaceae</i>	12
2.3 Bactérias ácido-láticas.....	16
2.4 Clostrídios psicrófilos.....	20
3.OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Amostragem.....	24
4.1.1 Colheita das amostras.....	25
4.2 Preparo das diluições das amostras para as contagens de enterobactérias e bactérias ácido-láticas.....	25

4.3 Contagem e caracterização da família <i>Enterobacteriaceae</i>	26
4.3.1 Provas confirmatórias.....	26
4.3.2 Identificação dos membros da família <i>Enterobacteriaceae</i>	27
4.4 Contagem de bactérias ácido-láticas.....	30
4.5 Pesquisa de <i>Clostridium estertheticum</i> e <i>Clostridium gasigenes</i> ..	30
4.5.1 Preparo das amostras e extração do DNA genômico.....	30
4.5.2 Avaliação da qualidade e quantificação do DNA extraído.....	31
4.5.3 Primers, mistura da reação e condições de amplificação.....	32
4.5.4 Confirmação da identidade molecular dos produtos de PCR.....	34
4.6 Análise estatística dos resultados.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Contagem de enterobactérias.....	35
5.2 Caracterização dos microrganismos da família <i>Enterobacteriaceae</i>	36
5.3 Contagem de bactérias ácido-láticas.....	41
5.4 Detecção de <i>Clostridium estertheticum</i> e <i>Clostridium gasigenes</i> ..	43
5.5. Confirmação da identidade dos produtos da amplificação.....	46
6. CONCLUSÕES.....	50
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
8. REFERÊNCIAS.....	51
Anexos.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Carne bovina resfriada embalada a vácuo apresentando a deterioração “blown pack” com grande produção de gás e exsudação.....	9
2. Representação em gel de agarose (1%) contendo produtos de PCR para detecção do <i>C. estertheticum</i> (RFP/RRP) e <i>C. gasigenes</i> em cortes cárneos bovinos resfriados e embalados á vácuo, amplicons de 641 pb e 935 pb respectivamente.....	45
3. Representação em gel de agarose (2%) da concentração de amplicons	47
4. Alinhamento e comparação da seqüência de nucleotídeos resultantes do seqüenciamento (Query) e a seqüência de referencia (Sbjct) do programa BLAST (Genbank [®]) para <i>C. estertheticum</i> (n° de acesso S46734) onde obteve-se 100% de homologia entre as seqüências.....	48
5. Alinhamento e comparação da seqüência de nucleotídeos resultantes do seqüenciamento (Query) e a seqüência de referencia (Sbjct) do programa BLAST (Genbank [®]) <i>C. gasigenes</i> (n° de acesso AF092549) onde obteve-se 99% de homologia entre as seqüências.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
<p>1. Populações de enterobactérias (UFC/mL do exsudato cárneo) em amostras de carne sem a deterioração “blown pack” (não deterioradas) e carnes com a deterioração “blown pack” (carnes deterioradas) e sua distribuição em populações de até 10^5 UFC/mL do exsudato, populações entre 10^5 e 10^7 UFC/mL e populações maiores que 10^7 UFC/mL.....</p>	36
<p>2. Resultado da identificação de 270 colônias de enterobactérias isoladas de carne bovina embaladas a vácuo e mantidas sob refrigeração que apresentavam a deterioração “blown pack”.....</p>	39
<p>3. Resultado da identificação de 270 colônias de enterobactérias isoladas de carne bovina embaladas a vácuo e mantidas sob refrigeração sem a deterioração “blown pack”.....</p>	40
<p>4. Populações de bactérias ácido-láticas (UFC/mL do exsudato cárneo) em amostras de carne sem a deterioração “blown pack” (não deterioradas) e carnes com a deterioração “blown pack” (carnes deterioradas) e sua distribuição em populações de até 10^5 UFC/mL do exsudato, populações entre 10^5 e 10^7 UFC/mL e populações maiores que 10^7 UFC/mL.....</p>	41
<p>5. Número de amostras de carne refrigeradas embaladas a vácuo positivas e negativas para a presença de <i>Clostridium estertheticum</i> a partir do exsudato cárneo de amostras de carne sem a deterioração “blown pack” (não deterioradas) e carnes com a deterioração “blown pack” (carnes deterioradas).....</p>	46
<p>6. Número de amostras de carne refrigeradas embaladas a vácuo positivas e negativas para a presença de <i>Clostridium gasigenes</i> a partir do exsudato cárneo de amostras de carne sem a deterioração “blown pack” (não deterioradas) e carnes com a deterioração “blown pack” (carnes deterioradas).....</p>	46

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1. Perfil bioquímico das espécies e gêneros de enterobactérias pesquisados segundo estabelecido no “Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology”	29
2. Composição das reações de PCR e concentrações finais dos reagentes, segundo os pares de primers utilizados, para detecção do <i>Clostridium estertheticum</i> e <i>Clostridium gasigenes</i>	33
3. Características dos programas de amplificação para o <i>Clostridium estertheticum</i> (RFP/RRP) e para o <i>Clostridium gasigenes</i> (16DBF/16DBR).....	33

ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DA FAMÍLIA *Enterobacteriaceae* E *Clostridium estertheticum* COM A DETERIORAÇÃO “BLOWN PACK” EM CORTES CÂRNEOS EMBALADOS A VÁCUO

RESUMO- A deterioração “blown pack” é caracterizada por abundante produção de gás, induzindo a completa distensão da embalagem durante o processo de estocagem sob refrigeração. Quando a embalagem é aberta, há um odor desagradável, levemente fecal. O gás presente na embalagem é composto por dióxido de carbono e hidrogênio e por vários tipos butíricos do metabolismo fermentativo. O objetivo deste experimento foi determinar possíveis causadores deste tipo de deterioração, quantificando as populações de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, e caracterizando-as nos principais gêneros e espécies encontradas, o número de bactérias ácido-lácticas, a frequência de *Clostridium estertheticum* e do *Clostridium gasigenes*, em carnes próprias para o consumo e em carnes que apresentaram a deterioração “blown pack”. Para contagem e identificação dos membros da família *Enterobacteriaceae* e contagem de bactérias ácido-lácticas utilizou-se de técnicas microbiológicas clássicas. Já para pesquisa do *C. estertheticum* e *C. gasigenes* fez-se uso de técnicas de biologia molecular. Os microrganismos da família *Enterobacteriaceae* e bactérias ácido-lácticas estavam presentes em populações elevadas e em maior número nas carnes com deterioração “blown pack”. A espécie mais frequentemente encontrada foi a *Hafnia alvei*. As amostras com deterioração “blown pack” apresentaram maior positividade para o *C. estertheticum* que amostras não deterioradas. Não houve diferença estatística de positividade para a presença do *C. gasigenes* entre amostras com deterioração “blown pack” e carnes não deterioradas. A principal forma de controle desta deterioração é a prevenção da contaminação da carne por material fecal.

Palavras-Chaves: carne embalada vácuo, clostrídios psicofílicos, deterioração “blown pack”, enterobactérias

**ASSOCIATION OF BACTERIA OF THE FAMILY *Enterobacteriaceae* AND
Clostridium estertheticum WITH " BLOWN PACK " SPOILAGE IN VACUUM-
PACKED CUTS OF MEATS.**

ABSTRACT- The "blown pack" spoilage is characterised by abundant gas production, leading to complete gross distention pack during refrigerated storage. When the packaging is opened, there is an unpleasant smell, lightly fecal. The gas present in the package is composed of carbon dioxide and hydrogen and also of several butyric types of metabolism fermentation. The purpose of this experiment was to determine possible causes of this spoilage type, quantifying the populations of bacteria of the family *Enterobacteriaceae*, and characterizing them in the major genera and species found, the number of lactic acid bacteria, the frequency of *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* in meat proper for consumption and meat which showed the "blown pack" spoilage. In order to enumerate and identify the members of the *Enterobacteriaceae* family, and to enumerate the lactic acid bacteria the procedure was classical microbiological techniques. However to search the *C. estertheticum* and *C. gasigenes* the procedure was molecular biology techniques. The microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* and lactic acid bacteria were present in large populations and in greater numbers in meat with "blown pack" spoilage. The species which were found more often was the *Hafnia alvei*. Samples of "blown pack" spoilage had greater positive features for *C. estertheticum* than samples not damaged. There was no statistical difference of positive features for the presence of *C. gasigenes* between samples of "blown pack" spoilage and not damaged meat. The main way to control this spoilage is the prevention of contamination of meat by fecal material.

Key words: vacuum packed meat, psychrophilic clostridial, "blown pack" spoilage, enteric bacteria.

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira conta com um rebanho aproximado de 170,2 milhões de cabeças de gado e destes, 46,9 milhões (27,6% do rebanho) são abatidos anualmente, só perdendo para a China com 49,9 milhões (35,9% do rebanho) abatidos/ano (ANUALPEC, 2005).

Em 2004 o Brasil exportou 1.202.170 toneladas equivalente-carcaça* de carne bovina “in natura” resfriada para países como o Chile, Alemanha, Itália, Suécia, países do Reino Unido e Países Baixos, Rússia, Egito, Espanha, Arábia Saudita e outros, o equivalente a 1.963,0 milhões de dólares. As expectativas são que as exportações aumentem para os próximos anos. Também em 2004, o Brasil não somente se tornou o maior exportador mundial de carnes (aves, suínos e bovinos) como abriu uma vantagem de mais de um milhão de toneladas sobre os Estados Unidos, historicamente o líder nesse comércio. A competitividade do segmento de carnes no Brasil está solidamente estabelecida no tripé disponibilidade de matérias-primas (competitividade em custos) X estrutura produtiva X ambiente (ANUALPEC, 2005).

O Brasil de fato conquista com méritos o destaque no mercado de proteínas animais do mundo, mas manter-se na posição não é tarefa fácil, uma maior expansão neste segmento de mercado tem sido dificultada pela redução da vida útil decorrente de alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas dos produtos de origem animal (BORGES & FREITAS, 2002).

Muitos são os problemas enfrentados pelas indústrias frigoríficas para manter estes mercados, logo as perdas devido à deterioração microbiana dos alimentos devem ser consideradas. A exata configuração das perdas econômicas totais com a deterioração dos alimentos é desconhecida, mas as raras figurações avaliadas indicam que constitui em uma enorme perda financeira. Estima-se que um quarto da oferta de alimento do mundo é perdido somente por atividade microbiana (ANONYMOUS, 1985).

A deterioração dos alimentos é um problema econômico em todo o mundo, e ainda não está controlada a despeito das modernas tecnologias e amplas técnicas de preservação disponíveis, como as embalagens a vácuo.

*Equivalente carcaça= Carne sem osso x 1,3 + Carne com osso
Fonte : Instituto FNP/SECEX/DECEX

Muitos microrganismos deteriorantes são também patogênicos para o ser humano, ou indicam a presença destes, como no caso de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, deixando de ser apenas um problema de caráter econômico e tornando-se também um problema de saúde pública. Patógenos de importância, como *Salmonella*, *Escherichia coli* O157H7 e *Shigella*, pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Alguns gêneros considerados não patogênicos podem eventualmente atuar como patógenos oportunistas como *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia* entre outros. Grande parte destes microrganismos, patogênicos ou não, causam deterioração em carnes refrigeradas embaladas a vácuo, por serem mesófilos com características psicrotólicas e anaeróbios facultativos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Deterioração da carne bovina fresca embalada a vácuo

A deterioração dos alimentos pode ser considerada como a mudança que gera um produto inaceitável para o consumo humano (HAYES, 1985; GRAM et al., 2002). A deterioração pode ser evidente, por exemplo, um dano físico, desenvolvimento visível de microrganismos, com formação de limosidade ou danos causados por insetos. Da mesma forma a deterioração pode ocorrer devido a mudanças na textura ou desenvolvimento de odores indesejáveis causados por reações bioquímicas ou ações microbianas (HUIS IN'T VELD, 1996; JACKSON et al., 2001; HILARIO et al., 2004). Podem ocorrer alterações da cor, odor e aumento da exsudação, embora muitas vezes imperceptíveis aos consumidores (GILL, 2000).

As provas microbiológicas clássicas, especialmente para alimentos perecíveis, têm valor limitado quando trata-se da obtenção de resultados rápidos que garantam a qualidade dos produtos, pois estes alimentos acabam sendo vendidos ou até consumidos antes dos resultados serem avaliados. Novos métodos microbiológicos altamente sensíveis e específicos baseados em técnicas imunológicas e moleculares já

foram desenvolvidos para a detecção de microrganismos patogênicos (van der VOSSSEN & HOFSTRA, 1996; HUIS IN'T VELD et al., 1994; FUNG, 1994).

Essas técnicas também podem ser aplicadas para a fácil detecção de organismos deteriorantes específicos. Entretanto, devem-se conhecer a fundo as populações predominantes e sua atuação em cada tipo específico de deterioração antes que estas técnicas possam ser usadas (HUIS IN'T VELD et al., 1996).

A microbiota que coloniza cada alimento em particular depende das características do produto e de como este é processado e estocado. Os parâmetros que afetam a proliferação dos microrganismos nos alimentos podem ser categorizados em quatro grupos: (1) parâmetros intrínsecos; (2) parâmetros extrínsecos; (3) modo de processamento e preservação, e (4) parâmetros implícitos. A combinação de todos os efeitos dos parâmetros geralmente é maior que o efeito percebido de cada parâmetro individual (MOSSEL et al., 1995).

Os parâmetros intrínsecos são físicos, químicos e propriedades estruturais inerentes ao próprio alimento. Os mais importantes são atividade de água, acidez, potencial de oxi-redução, disponibilidade de nutrientes e a presença de substâncias antimicrobianas naturais. Já os parâmetros extrínsecos são fatores ambientais inerentes aos locais onde os alimentos são estocados, notavelmente temperatura, umidade e composição atmosférica. Quanto ao modo de processamento e estocagem consideram-se o uso de tratamentos químicos e físicos que geralmente resultam em mudanças nas características dos produtos, além de determinar a microbiota associada a ele (HUIS IN'T VELD et al., 1996).

Já os parâmetros implícitos são resultantes do desenvolvimento de microrganismos, que podem ter efeito sinérgico, por exemplo, produção ou disponibilidade de nutrientes essenciais para o desenvolvimento de certos grupos de microrganismos, ou antagônico, como mudanças de pH, potencial de oxi-redução e atividade de água que podem inabilitar o desenvolvimento de organismos menos tolerantes a esses fatores inibitórios (STILES & HASTINGS, 1991; KIM, 1993; MOSSEL et al., 1995; HUIS IN'T VELD, 1996; ABEE et al., 1996).

A deterioração é mais rápida e evidente em alimentos proteínicos como a carne bovina, de frango, peixe, frutos do mar, leite e alguns produtos de laticínio. Estes alimentos são altamente nutritivos, possuem pH neutro ou levemente ácido e uma elevada umidade que permite o desenvolvimento de uma ampla gama de microrganismos (HUIS IN'T VELD, 1996; CARVALHO, 2001; BORGES & FREITAS, 2002).

Após o abate e evisceração, muitas carcaças continuam com suas características microbiológicas inalteradas (ANDERSEN, 1995). É esperado que um animal saudável tenha a parte interna do músculo livre de contaminação. Para, NOTTINGHAM, 1982, bem como, DICKSON & ANDERSON (1992), o tecido muscular bovino, logo depois do abate, é praticamente estéril. Entretanto os microrganismos podem migrar da superfície da carcaça para os músculos internos como o perimísio (GUERRERO & TAYLOR, 1994).

GILL & NEWTON (1978), verificaram que a maior parte da microbiota da carne *in natura* encontra-se na superfície da carcaça. Muitos autores afirmam que a contaminação da carne ocorre, inevitavelmente, durante os processos que conduzem à sua obtenção e este é o principal determinante da deterioração (DAINTY & MACKEY, 1992; HOLLEY & GILL, 2005; ERCOLINE et al., 2006).

TOMPKIN et al. (2001), relatam que a microbiota superficial de carcaças recém abatidas encontra-se entre 10^2 a 10^3 bactéria/cm², sendo encontrada preferencialmente, bactérias mesófilas, originárias do trato gastrointestinal e da superfície externa (pele) dos animais.

Segundo FLISS et al. (1991), muitas enfermidades de origem alimentar são atribuídas ao consumo de carne contaminada por microrganismos patogênicos. A microbiota da carne crua é muito heterogênea, originária do próprio animal, solo, água, manipuladores e equipamentos durante o processamento.

Muitos são os microrganismos que podem ser encontrados na carne bovina como a *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Achromobacter* spp., entre outros (NORTJÉ & NAUDÉ, 1981; PARDI et al., 2001).

Muitos membros da família *Enterobacteriaceae*, como o gênero *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Proteus* e *Hafnia*, frequentemente contribuem para a deterioração da carne (BORCH et al., 1996; LABADIE, 1999; NYCHAS et al., 1999; GRAM et al., 2002; JAY et al., 2003).

Por conveniência, os microrganismos deteriorantes podem ser divididos dentro das seguintes categorias: bactérias Gram positivas formadoras de esporos (*Clostridium* spp), bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp.), outras bactérias Gram-positivas (*Brochotrix thermosphacta*), bactérias em forma de bacilos Gram-negativos (*Pseudomonas*, enterobactérias), bolores e leveduras (HUIS IN'T VELD, 1996; PARDI et al., 2001).

Inicialmente, os microrganismos deteriorantes estão presentes em pequenas quantidades e constituem somente a menor parte da microbiota natural. Durante a estocagem, os microrganismos deteriorantes geralmente se multiplicam mais rapidamente que a microbiota remanescente e produzem os metabólitos responsáveis por odores, limo e finalmente a rejeição sensorial (DALGAARD, 1993). Mudanças nas condições extrínsecas (ex. refrigeração, embalagem com atmosfera modificada) somente retardam a deterioração. Por esta razão, baixas temperaturas de estocagem não prevenirão a deterioração, mas predisporão a deterioração causada por microrganismos psicrotóxicos (LEE & YOON, 2001). Da mesma forma quando restringe-se o oxigênio da carne por meio da embalagem a vácuo, o desenvolvimento microbiano é alterado dando lugar para a proliferação de novos gêneros mais aptos àquele ambiente (JONES, 2004).

A vida de prateleira e a qualidade do produto podem ser estendidas por modificação da atmosfera gasosa que envolve a carne. A embalagem a vácuo e embalagem com atmosfera modificada (MAP) são dois métodos usados comercialmente para modificar o gás da atmosfera que envolve a carne (HOOD & MEAD, 1993). A carne bovina embalada a vácuo normalmente apresenta vida de prateleira em torno de 9 a 12 semanas, quando em temperaturas menores que 1,5°C (HOLLEY & GILL, 2005).

Atualmente na América do Norte cerca de 85% de carnes frescas e a maioria das carnes processadas são embaladas sob vácuo ou distribuídas embaladas utilizando embalagens de atmosfera modificada contendo um ou mais gases (JAY et al., 2005).

A embalagem a vácuo é o método de escolha para estocar e distribuir grandes pedaços de carne resfriada ou cortes comerciais. Nas embalagens a vácuo, o oxigênio residual é rapidamente consumido (a níveis abaixo de 1%) pelo tecido ou respiração microbiana, e aumenta a taxa de CO₂ para até 20%. Condições completamente anaeróbicas são raras de se conseguir, todos os filmes comercialmente utilizados apresentam uma taxa de permeabilidade. A proporção relativa de dióxido de carbono e hidrogênio varia de acordo com sua produção ou como resultado da difusão do hidrogênio através do filme da embalagem e absorção de dióxido de carbono da carne. Durante a estocagem, bactérias aeróbicas Gram negativas são substituídas por bactérias Gram positivas de multiplicação lenta (DAINTY et al., 1983; DAINTY & MACKEY, 1992).

O exemplo disto são as bactérias ácido-láticas, que têm sido identificadas como microrganismos deteriorantes de carne bovina e de frango embalados a vácuo, tendo sido frequentemente isoladas destes tipos de produto por serem tolerantes ao CO₂ e a baixas temperaturas (DAINTY et al., 1983; BORCH et al., 1996).

A microbiota típica da carne bovina embalada a vácuo consiste em bactérias ácido-láticas e enterobactérias em níveis de 10⁸ e 10⁶ UFC/g, respectivamente (BEEBE et al., 1976; NEWTON et al., 1978; SCHILLINGER et al., 1987; SUTHERLAND et al., 1975; YOST & NATTRESS, 2002). Segundo NOTTINGHAM (1982) nos Estados Unidos da América os supermercados têm particular importância na deterioração da carne por ação microbiana, devido à aplicação adequada da cadeia do frio.

A deterioração caracterizada por formação de gás no interior da embalagem e alteração no odor que se torna azedo e levemente pútrido, normalmente é detectada quando estão presentes microrganismos deteriorantes em níveis de 10⁸UFC a 10⁹UFC/g do alimento (BORCH et al., 1996).

Várias espécies de enterobactérias, lactobacilos e estreptococos demonstraram capacidade em descarboxilar aminoácidos produzindo aminas biogênicas como, histamina, tyramina, putrescina e cadaverina (STRATTON et al., 1991).

Durante o tempo de vida de prateleira dos produtos cárneos embalados a vácuo pode ocorrer o acúmulo de aminas biogênicas produzidas tanto por microrganismos patogênicos como por deteriorantes (SMITH et al., 1993).

MCCABE (1986), SULLIVAN & SHULMAN (1984) verificaram que a excessiva ingestão de histamina e tyramina são responsáveis por causar distúrbios fisiológicos em humanos, mais notadamente dores de cabeça, vermelhidão e hipertensão aguda.

Indivíduos com problemas respiratórios, coronarianos e estomacais, hipertensos ou com deficiência de vitamina B12 são particularmente pessoas de risco, por serem sensíveis a doses bem menores de aminas biogênicas (BARDÓCZ, 1995).

SMITH et al. (1993) e DAINTY et al. (1986) mostraram que a produção das aminas biogênicas inicia-se quando a população bacteriana atinge níveis de $6 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$ e que enterobactérias e principalmente *Hafnia alvei* e *Serratia liquefaciens* são as bactérias que mais acumulam diaminas em carne embalada a vácuo refrigeradas.

2.1.1 Deterioração “blown pack”

A deterioração por tufamento da embalagem de carnes refrigeradas embaladas a vácuo, mais conhecida como deterioração “blown pack”, é caracterizada por abundante produção de gás, induzindo a completa distensão da embalagem durante o processo de estocagem sob refrigeração como mostra a figura 1. Quando a embalagem é aberta, há um odor desagradável de queijo/queijaria com ou sem coloração sulfurosa aparente. O gás presente na embalagem é composto por dióxido de carbono e hidrogênio e por vários tipos butíricos do metabolismo fermentativo (JONES & WOODS, 1986).

A presença de ésteres butíricos, ácido butírico e butanol na composição gasosa de todas as amostras é o que caracteriza o odor de queijo neste tipo de deterioração (DAINTY et al., 1989). Entretanto, um outro odor encontrado em embalagens tufadas examinadas por DAINTY et al. (1989) foi um odor “levemente fecal”.

Desde 1989, quando a relação entre deterioração por tufamento de embalagens a vácuo e clostrídios psicofílicos foi primeiramente estabelecida (DAINTY et al., 1989; KALCHAYANAND et al., 1989), vêm sendo realizadas pesquisas no sentido de reduzir a deterioração causada por membros do gênero *Clostridium* apontados como os principais agentes causadores deste tipo de deterioração (GILL, 1979; ROBERTS & MEAD, 1986; BRODA et al., 1996; KALINOWSKI & TOMPKIN, 1999; LAWSON et al., 1994). Entretanto, trabalhos realizados na tentativa de estabelecer a prevalência destes clostrídios tolerantes ao frio em carnes refrigeradas, sugeriram a possibilidade de o agente causal ser um microrganismo da família *Enterobacteriaceae*, já que estes foram observados em todas as amostras que apresentavam este tipo de deterioração, tanto em amostras positivas para clostrídios tolerantes ao frio como para as negativas (BRODA et al., 1997).

Em um trabalho realizado por HANNA et al. (1979) inoculou-se experimentalmente em carnes embaladas a vácuo culturas de *Lactobacillus* spp. e *Hafnia alvei* e comparou-se os resultados com carnes que iriam para o comércio, e em ambas constatou-se a predominância de *Lactobacillus* quando estocadas por 3 semanas a temperatura de 1-3°C. Houve produção de gás nas carnes inoculadas com *Lactobacillus* spp. heterofermentativos (mais fracamente) e com *Hafnia alvei* (mais fortemente). O gás produzido era composto basicamente da mistura de CO₂ gerado por *Lactobacillus* heterofermentativos e H₂S gerado por *H. alvei*.

A população de enterobactérias na carne embalada a vácuo pode chegar entre 10⁵ e 10⁷ UFC/g, entretanto, sua contribuição para o processo de deterioração parece ser especulativa (BORCH et al., 1996; RIDDEL & KORKEALA, 1997). BOEREMA et al. (2002) isolaram de carnes com a deterioração “blown pack” microrganismos da família *Enterobacteriaceae* como *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter aerogenes* e *Hafnia alvei*.

Na indústria de carne a poeira, a água e as fezes de animais que ficam aderidas à pele são consideradas fontes de contaminação primária da contaminação direta das carcaças tanto por microrganismos do grupo dos clostrídios como do grupo das enterobactérias (BELL, 1997; MCEVOY et al, 2000).



Figura 1. Carne bovina resfriada embalada a vácuo apresentando a deterioração "blown pack" com grande produção de gás e exsudação.

2.2 Enterobactérias

São características dos membros da família *Enterobacteriaceae* se apresentarem em forma de bacilos Gram-negativos, medindo em geral 0,3-1,8µm. Estes microrganismos podem ser imóveis ou móveis. Deste último são por meio de flagelos peritríquios, ou são imóveis. São anaeróbios facultativos e quimioorganotróficos, tendo tanto o metabolismo aeróbico como o fermentativo. A maioria das espécies se desenvolve bem a temperatura de 37°C, entretanto algumas têm temperatura ótima entre 25 e 30°C e são frequentemente mais ativas metabolicamente a estas temperaturas. Existem gêneros psicrotróficos frequentemente encontrados no solo, água e trato gastrointestinal dos seres humanos e animais (ICMSF, 2000; HOLT et al. 1994).

As enterobactérias catabolizam D-glicose e outros carboidratos com produção de ácido, muitas espécies com produção de gás também. São oxidase negativo e catalase positivo, exceto *Shigella dysenteriae* O Grupo 1 e espécies de *Xenorhabdus*. São amplamente distribuídas podendo também ser encontradas no solo, água, frutas, vegetais, animais e nos seres humanos. Há uma grande heterogeneidade na ecologia e hospedeiros, sendo potencialmente patogênicas para os seres humanos, animais e insetos. Inúmeras espécies causam doenças diarréicas incluindo febre tifóide e disenteria bacilar. Muitas espécies que não estão associadas com doenças diarréicas são frequentemente referenciadas como patógenos oportunistas. Muitas destas espécies assim como as que causam doenças diarréicas podem causar uma variedade de infecções extraintestinais incluindo bacteremia, meningite, feridas e infecções do trato respiratório e urinário. As enterobactérias são responsáveis por 50% de infecções nosocomiais, mais frequentemente causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* e *Serratia*. (HOLT et al. 1994).

A definição individual de cada gênero da família *Enterobacteriaceae* é quase que impossível. Para o diagnóstico laboratorial de identificação em espécie desta família, faz-se uso de algumas baterias de provas bioquímicas para cada um dos mais de 115 nomes de espécies e subespécies já identificadas. Se um organismo não é identificado

com certeza, testes adicionais são disponíveis para diferenciar estas espécies, subespécies ou gêneros (HOLT et al., 1994).

Escherichia coli biotipo I é a mais predominante enterobactéria encontrada na carne (COX & MERCURI, 1978; NG & STILES, 1978). A contaminação por esta bactéria normalmente advém da pele do animal durante o processamento (HESS, 1973) e possivelmente representa uma contaminação fecal (NEWTON et al., 1977).

A fonte de enterobactérias na carne freqüentemente esta associada com a manipulação da carne e superfícies de trabalho. Um total de 2.343 cepas de *Enterobacteriaceae* foram isoladas e identificadas em amostras de carne e superfícies de trabalho com facilidade. *E. coli* biotipo I e *Serratia liquefaciens* foram isoladas de todos os estágios de manipulação da carne, indicando que elas podem estar presentes na carne e em toda parte do sistema de manipulação. *Enterobacter agglomerans* e *S. liquefaciens* foram as enterobactérias predominantes. *Klebsiella pneumoniae* também foi isolada com freqüência (STILES & NG, 1981).

Microrganismos deteriorantes da família *Enterobacteriaceae* podem multiplicar-se em proporções significativas na carne embalada a vácuo ou em atmosfera modificada quando estocada em temperaturas maiores que 10°C (PENNEY et al., 1993).

Certas espécies de enterobactérias psicrotólicas comumente ocorrem na carne refrigerada. Estes microrganismos, que são capazes de se multiplicar aerobicamente no tecido adiposo e tecido muscular com pH maior que 6.0 aparecem mais prevalentemente na carne de suíno e ovino (GRAU, 1981; DAINY & MACKAY, 1992). Seu desenvolvimento é favorecido em temperaturas maiores ou igual a 4°C (BLICKSTAD & MOLIN, 1983).

Em temperaturas acima de 5° C, enterobactérias geralmente predominam sobre as *Pseudomonas* spp. e são responsáveis pela deterioração. Os principais gêneros da família *Enterobacteriaceae* apontados como deteriorantes de carne e produtos cárneos são *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Providência*, *Serratia*, *Escherichia* e *Yersinia* (BRENNER, 1992). Três espécies da família *Enterobacteriaceae* - *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter aerogenes* e *Hafnia alvei*,

foram identificadas como deteriorantes de carnes refrigeradas embaladas a vácuo com a deterioração “blown pack” (HANNA et al., 1979).

A presença de enterobactérias é frequentemente usada como indicador para possível contaminação fecal decorrente de inadequado processamento ou contaminação pós-processamento (TORNADIJO et al., 2001).

Muitos microrganismos desta família são de importância para a saúde pública. Dentre estes, destaca-se os tipicamente enteropatogênicos ao homem (*Salmonella* e *Shigella*) e outros que apresentam apenas alguns sorotipos enteropatogênicos como é o caso do gênero *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Yersinia* (HOLT et al., 1994).

LEE & YOON (2001) estudando carne embalada a vácuo observaram que a população de enterobactérias aumentou de 4,62 Log₁₀ UFC/cm² para 5,62 Log₁₀ UFC/cm² após 14 dias de estocagem sob refrigeração. Após 38 dias a população estabilizou-se. A multiplicação de enterobactérias foi inibida quando a população de bactérias ácido-láticas excedeu 6 Log₁₀ UFC/cm². Resultado semelhante ocorreu com a curva de pseudomonas. As populações de enterobactérias e *Pseudomonas* não excederam 6 Log₁₀ UFC/cm² mesmo após 76 dias de estocagem sob refrigeração. Isto indica que a multiplicação de enterobactérias e *Pseudomonas* foi inibida pelas baixas concentrações de oxigênio e/ou altas concentrações de dióxido de carbono formado na embalagem a vácuo, além do ácido e substâncias antimicrobianas produzidas pelas bactérias ácido-láticas (BAL) (FU et al., 1992; NEWTON & GILL, 1978).

2.2.1 Principais gêneros da família *Enterobacteriaceae*

***Citrobacter* spp.**

Ocorrem nas fezes de humanos e animais, provavelmente como habitantes anormais. Frequentemente isolado de espécimes clínicas como patógenos oportunistas. *Citrobacter diversus* pode causar meningite neonatal. Também encontrado no solo, água, esgoto e alimentos (HOLT et al., 1994).

***Edwardsiella* spp.**

São bastonetes pequenos, medindo em média 1µm de diâmetro x 2-6 µm e são Gram-negativos. Geralmente são móveis por flagelos peritríquios (*E. ictaluri* é móvel a 25°C, mas não a 37°C). Apresentam temperatura ótima de crescimento de 37°C, exceto *E. ictaluri* que tem preferência por temperaturas mais baixas. Ocorrem mais freqüentemente no intestino de animais de sangue frio como peixes e répteis e no ambiente destes, particularmente em águas doces, mas também ocorre em animais de sangue quente e seres humanos. Patogênico para enguias, catfish e outros animais, raramente é patógeno para seres humanos (HOLT et al.,1994).

Edwardsiella tarda é considerada como bactéria emergente para enfermidades transmitidas através de alimentos (DOYLE, 1994).

***Enterobacter* spp.**

São espécies amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em água doce, solo, esgoto, plantas, vegetais, animais e fezes de seres humanos. Várias espécies, mais notavelmente *E. cloacae*, *E. sakazakii*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans* e *E. gergoviae* são patógenos oportunistas de queimaduras e feridas, causam também infecções do trato urinário e ocasionalmente septicemias e meningite (HOLT et al.,1994).

***Escherichia* spp.**

São bacilos Gram-negativos, apresentam de 1,1- 1,5 µm x 2,0-6,0 µm podendo ocorrer em formas isoladas ou aos pares. Muitas cepas possuem cápsulas ou microcapsulas. Geralmente são móveis por flagelos peritríquios ou então, são imóveis. São anaeróbicos facultativos. Ocorrem na microbiota normal de animais de sangue quente, e no caso de *E. blattae*, no intestino de baratas (HOLT et al.,1994).

As cepas de *Escherichia coli* que produzem enterotoxinas e outros fatores de virulência, incluindo as invasivas e fatores de colonização, causam doenças diarréicas. *E. coli* é também a maior causa de infecções urinárias e nosocomiais incluindo septicemia e meningite. Outras espécies, exceto *E. blattae*, são raramente identificadas

como patógenos oportunistas, usualmente associados com infecções de feridas (HOLT et al., 1994).

***Hafnia* spp.**

Ocorrem nas fezes de humanos e animais incluindo pássaros, água de esgoto, solo, água e produtos de origem animal (FARMER, 2003). São patógenos oportunistas para o homem, usualmente no sangue, urina ou feridas infeccionadas em pacientes com estado de saúde debilitado ou imunodeprimidos (HOLT et al., 1994; JANDA & ABBOTT, 2006).

Os produtos alimentares comumente encontrados contaminados por este gênero incluem recortes de carne, carne bovina embalada a vácuo e produtos de suínos. Estudos mostram que 50% dos isolados entéricos de carne refrigerada são da espécie *Hafnia alvei* (LINDBERG et al., 1998; RIDELL & KORKEALA, 1997). Um estudo subsequente identificou esta espécie em 34% de amostras de carne, 14% de amostras de leite e produtos do creme e 12% de peixes de água doce (GAMAGE et al., 1998). As populações de *Hafnia alvei* nestas amostras foram maiores que $7,5 \times 10^{10}$ UFC/g (LINDBERG et al., 1998).

***Klebsiella* spp.**

Ocorrem nas fezes de seres humanos e espécimes clínicas, solo, água, grãos, frutas e vegetais. *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e ocasionalmente outras espécies são patógenos oportunistas que podem causar bacteremia, pneumonia, infecções do trato urinário e outras infecções ao homem. Frequentemente causam infecções nosocomiais urológicas, neonatais, em pacientes geriátricos ou em tratamento intensivo (HOLT et al., 1994).

***Proteus* spp.**

Ocorrem no intestino dos seres humanos e em um grande número de animais, em dejetos, solo e águas poluídas. Há relatos do isolamento de *P. myxofaciens* em larvas de insetos. Patógenos de humanos causam infecções no trato urinário, invasões

secundárias, lesões septicêmicas, freqüentemente em queimaduras de pacientes (HOLT et al., 1994).

Providencia spp.

Isolados de casos de diarreias em seres humanos, infecções do trato urinário, feridas, queimaduras e bacteremias e também foram isolados de pingüins. São patogênicos para os seres humanos (HOLT et al., 1994).

Salmonella spp.

As espécies de *Salmonella* spp. são agentes freqüentes de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos. Por serem microrganismos entéricos, podem estar presentes no intestino de animais de sangue quente e, mais raramente, também nos de sangue frio (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Resistem bem às temperaturas de refrigeração, no entanto, o congelamento provoca uma redução significativa da população, mas nunca a destruição completa (GLEDEL, 1994; SILVA, 2000).

Em função de sua capacidade de disseminação no meio ambiente, podem ser isoladas de locais variados e diferentes (águas doces superficiais, costa marítima, carnes de animais, pescados, verduras, ovos, etc.) e, conseqüentemente, de diversas matérias primas alimentares. Podem ainda ser veiculadas pelo próprio ser humano, neste caso na condição de portador assintomático (JAKABI et al., 1999).

Salmonelas são causa de febre tifóide, infecções entéricas, gastroenterites e septicemias (HOLT et al., 1994).

Serratia spp.

Ocorrem em espécimes clínicas do ser humano, solo, água, superfícies de plantas e outros ambientes, trato digestivo de ratos e insetos. *S. marcescens* é um proeminente patógeno oportunista hospitalar, causa septicemia e doenças do trato urinário. Várias outras espécies podem estar envolvidas em bacteremias e podem ser

isoladas de escarros sem significado clínico. Causam mastite em vacas e outras infecções animais (HOLT et al., 1994).

***Shigella* spp.**

Patógeno intestinal do homem e de outros primatas, causa de disenteria bacilar (HOLT et al., 1994).

***Yersinia* spp.**

A espécie *Yersinia pseudotuberculosis* é patogênica para muitos animais, causando adenite mesentérica, diarreia crônica e septicemias. A *Y. enterocolitica* causa infecções similares aos animais e ao homem. Outras espécies são patógenos oportunistas ou não causam patologias ao homem (HOLT et al., 1994).

A *Y. enterocolitica* tem sua importância em alimentos por tratar-se de um microrganismo patogênico e que tem sua presença associada a alimentos e água contaminados. A capacidade deste microrganismo de multiplicação a temperaturas de refrigeração (4-7°C) faz com que sua presença em alimentos represente risco potencial para a saúde pública. (BHADURI et al., 1995).

A manifestação clínica da infecção é distinta nas diferentes faixas etárias, predominando a enterocolite com diarreia (MURRAY et al., 1994). Segundo JAY (1992), os sorotipos de *Y. enterocolitica* que se apresentam mais frequentemente nas infecções humanas são: O:3, O:5,27, O:8 e O:9.

2.3 Bactérias ácido-láticas

As BAL pertencem ao grupo das bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, estritamente fermentativas produzindo ácido láctico como principal produto final. Elas são destituídas de citocromo e são anaeróbicas naturais, mas toleram o oxigênio, chamadas de microaerófilas. BAL são catalase negativas, embora amostras catalase positivas possam ser encontradas em muitos casos. Filogeneticamente, elas são um grupo muito variado de microrganismos (LYHS, 2002).

MOGENSEN et al. (2003) estabeleceram que o grupo das bactérias ácido-láticas (BAL) é constituído por 11 gêneros sendo estes: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*

As BAL estão amplamente distribuídas na natureza, particularmente no leite. Elas são também habitantes dos tratos digestivo, respiratório superior e urogenital inferior dos animais (HOVE et al., 1999).

Bactérias lácticas são amplamente utilizadas na indústria de alimentos fermentados, mas ocasionalmente elas têm impacto negativo em produtos como a cerveja e produtos cárneos (SIMPSON & FERNANDEZ, 1992; BORCH et al., 1996; KORKEALA & BJORKROTH, 1997; SAMELIS & GEORGIADOU, 2000; SAKAMOTO et al., 2001).

Algumas bactérias deteriorantes produzem como deterioração típica, gás, limosidade e/ou líquido esbranquiçado (BJÖRKROTH et al., 1998).

O grupo de BAL inclui bastonetes e cocos não esporulados, aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos. A maioria das BAL são inativadas a temperaturas superiores a 70°C. Baseados nas características fermentativas, os lactobacilos podem ser divididos em três grupos: homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos obrigatórios e facultativamente heterofermentativos. Os homofermentativos obrigatórios são aqueles que têm como produto final resultante da glicólise (ciclo de Embden-Meyer) exclusivamente ácido láctico, mas não fermentam pentose ou gluconato. Ambos os heterofermentativos utilizam a via 6-phosphogluconato/phosphoketolase. Os heterofermentativos obrigatórios são lactobacilos que degradam hexoses para formação de ácido láctico e outros produtos adicionais como ácido acético, etanol e CO₂ e pentoses para ácido láctico e acético. Os heterofermentativos facultativos são lactobacilos que fermentam hexoses para produção de ácido láctico e podem produzir CO₂ a partir do gluconato, mas não a partir da glicose. Eles também fermentam pentoses para produção de ácido láctico e acético (LYHS, 2002).

As BAL de importância como deteriorantes de alimentos são do gênero *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (AXELSON, 1993; LEISNER et al., 2000; JONES, 2004). Dentre esses gêneros, *Carnobacterium*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* são importantes deteriorantes da carne crua refrigerada (LABADIE, 1999). São considerados importantes competidores de outros microrganismos deteriorantes sob determinadas condições (BORCH et al., 1996; GILL, 1996).

Estudando a dinâmica populacional de bactérias ácido-láticas em carne bovina embalada a vácuo JONES (2004) observou que durante a estocagem das carnes em temperaturas de até -1,5°C por até quatro semanas, ocorria uma mudança da população dominante de BAL. Conseqüentemente, uma população pode substituir outra sem que haja um declínio no número de BAL, como observado por JONES & PHILLIPS (1997) em que houve um aumento na população de BAL com o armazenamento.

Segundo BORCH et al. (1996) uma ampla variedade de microrganismos Gram negativos pode ser isolada da carne fresca, porém estes são incapazes de competir com as bactérias ácido-láticas no vácuo e em embalagens com atmosfera modificada, quando estocados sob refrigeração. Em produtos cárneos embalados a vácuo acredita-se que a deterioração eleva-se quando há interação metabiótica entre bactérias ácido-láticas e enterobactérias.

Muitos conservantes químicos objetivam estender o tempo de vida de prateleira da carne controlando o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes, mas muitas vezes tornam o produto inaceitável para muitos consumidores (HUGAS, 1998).

O uso de BAL é uma alternativa como bioprotetores da carne porque elas estão aptas a proliferar em substratos da carne e controlar o desenvolvimento de patógenos como *Escherichia coli* (DIXON et al., 1991), *Campylobacter jejuni* (CUDJOE & KAPPERUD, 1991), *Clostridium botulinum* (MAAS et al., 1989), *Listeria monocytogenes* (YOUNG & FOEGEDING, 1993) e *Salmonella* spp. (DIXON et al., 1991), além de microrganismos deteriorantes. Seu modo de ação inclui a competição por nutrientes, adesão ao substrato e produção de compostos antibacterianos como ácidos orgânicos,

diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (STILES, 1996; AYMERIC & HUGAS, 1998).

As BAL heterofermentativas metabolizam a glicose e produzem com isso ácido láctico, isobutanóico, isopentóico, ácido acético, entre outros. Estes, além de acidificarem a carne, podem também provocar mudanças no sabor e no odor. Os produtos da fermentação de BAL geralmente não causam nenhum tipo de modificação detectável na carne embalada a vácuo, no entanto se suas populações estiverem em níveis muito altos podem acumular os produtos da fermentação a níveis organolépticos detectáveis e indesejáveis (BAILEY et al., 1992). As BAL que produzem etanol, sulfetos e ácidos orgânicos não butíricos de cadeia curta, como o lactato e o acetato, podem ser usados como exemplo, já que esses produtos hora são benéficos por inibirem o desenvolvimento de outros organismos, como *Brochothrix thermosphacta* e *Enterobacter* (NEWTON & GILL, 1978), outrora são prejudiciais quando presentes em altas concentrações (DAINTY, 1996; LEISNER et al., 1996).

No entanto, algumas BAL mesmo em populações menores têm como produto final compostos mais prejudiciais, como o caso das BAL produtoras de ácido butírico, que rancificam a gordura causando odores e sabores desagradáveis (KOCHHAR, 1996) estando mais aptas a deteriorar a carne do que cepas que não produzem o ácido butírico.

TSIGARIDA & NYCHAS (2001) demonstraram que o tipo de filme utilizados nas embalagens influencia no desenvolvimento de diferentes grupos microbianos, além de influenciar nos tipos de metabólitos produzidos e suas concentrações.

Durante toda a estocagem em embalagem com atmosfera modificada (MAP), as mudanças na composição da mistura gasosa é determinada pela respiração da carne, atividade microbiológica e taxa de transmissão do oxigênio através do filme da embalagem, variando assim de filme para filme (BORCH et al., 1996; GILL, 1996).

Cada mudança será refletida nas diferentes taxas de deterioração (EGAN & SHAY, 1982) ou diferentes taxas de desenvolvimento de bactérias deteriorantes (TSIGARIDA et al., 2000).

EUSTACE (1989) comprovou que a taxa de transmissão do oxigênio a 0°C pode ser até 10% menor que a 25°C. Por tanto, mesmo em filmes de baixa permeabilidade o abuso de temperatura pode rapidamente modificar a composição inicial de gases injetada em embalagens com atmosfera modificada, da mesma forma sob baixas temperaturas essa composição pode ser mantida por maiores períodos. Populações semelhantes de anaeróbios facultativos, como os *Lactobacillus* e as enterobactérias, podem ser encontradas em filmes de permeabilidade diferentes quando associadas a diferentes temperaturas. É fato que a transmissão de oxigênio aumenta com o aumento da temperatura (ZAGORY, 1995).

TSIGARIDA & NYCHAS (2001) constataram que as populações finais de *Pseudomonas* spp. aumentaram significativamente em amostras que apresentavam altas taxas de permeabilidade do filme, mas que não teve efeito significativo para o desenvolvimento de *Lactobacillus* spp.. Semelhantes observações foram relatadas em carnes embaladas a vácuo sob temperaturas de refrigeração por KOTZEKIDOU & BLOUKAS (1996).

Todos os materiais disponíveis para uso em embalagens permitem uma penetração do oxigênio; a taxa de penetração do oxigênio deveria ser considerada como um fator extrínseco importante, entre outros. É fato que, a mudança ambiental (grau de aeração, pH, disponibilidade de nutrientes) pode causar um desequilíbrio entre o metabolismo de homofermentativas e heterofermentativas, aumentando o potencial de deterioração devido a produção de outros produtos finais que não o ácido láctico (NYCHAS, 1998).

2.4 Clostrídios psicrófilicos

Historicamente acreditava-se que as espécies de clostrídios tinham um papel menor na deterioração da carne (GILL, 1979; ROBERTS & MEAD, 1986). Autores como ROSS (1965) relatou a participação de clostrídios mesofílicos e *Clostridium putrefaciens* como os agentes causais de deterioração em tecidos profundos, “bone taint”, de carnes e presuntos curados. A deterioração causada por estes microrganismos foi solucionada

com o advento de modernas tecnologias de embalagens associadas a temperaturas de refrigeração (ROBERTS & MEAD, 1986). Entretanto, mais recentemente, as espécies de *Clostridium* psicrotolerantes (psicrofílicos) têm sido relatadas como causadoras de deterioração “blown pack” em carnes embaladas a vácuo (DAINTY et al., 1989; KALCHAYANAND et al., 1989; BRODA et al., 1996; LAWSON et al., 1994).

Quatro importantes espécies de clostrídios psicrotolerantes foram descritas: *Clostridium estertheticum* (COLLINS et al., 1992), *Clostridium laramiense* (KALCHAYANAND et al., 1993; TRÜPER & DE' CLARI, 1997), *Clostridium algidicarnis* (LAWSON et al., 1994) e *Clostridium gasigenes* (BRODA et al., 2000).

Os clostrídios psicrofílicos são bastonetes geralmente móveis, Gram-positivos, formadores de esporos, e possuem o metabolismo anaeróbico. Possuem esporos elípticos, terminais ou subterminais (*Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense*); subterminais ou centrais como na espécie *C. estertheticum* subsp. *estertheticum*. Geralmente estão envolvidos com a deterioração da carne bovina fresca refrigerada embalada a vácuo (KALCHAYANAND et al., 1989). Em ágar sangue de carneiro 5% podem ser beta-hemolíticos ou não hemolíticos. Estes clostrídios psicrofílicos são sacarolíticos, capazes de fermentar frutose, glicose, sucrose, xylose e inulina, produzindo em grandes quantidades ácido butírico, 1-butanol, ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico e etanol (SPRING et al., 2003).

Durante o processo de deterioração “blown pack” o gás que se forma no interior da embalagem é constituído principalmente por dióxido de carbono, nitrogênio e hidrogênio e por compostos butíricos resultantes do metabolismo fermentativo, além da descarboxilação de aminoácidos que geram como produtos finais compostos sulfurados voláteis, amônia e diaminas caracterizando o odor desagradável das carnes com deterioração “blown pack” (BRODA et al., 1997; BRODA et al., 2000).

Os clostrídios podem ser encontrados no solo, tubo digestivo de animais e fezes (HELPS et al., 1999). Seus esporos são bastante resistentes à dessecação, desinfetantes e calor, mantendo-se no ambiente por muito tempo (CORRÊA & CORRÊA, 1992). A pesquisa de clostrídios psicrofílicos em abatedouros incluem a presença destes em material fecal, pele, tonsilas, embalagens e em vários pontos da

planta como ralo da sala de abate, paredes, rolete da esola e outros (BRODA et al., 1996). Em um trabalho realizado no Brasil, RAUECKER (2007) mostrou que as fontes de detecção com maiores índices de positividade para o *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foram fezes bovina, boxe de atordoamento, carcaças antes da esola, meias carcaças refrigeradas e cortes cárneos deteriorados.

Trabalhos realizados por DAINY et al.(1989), KALCHAYANAND et al. (1989), COLLINS et al. (1992) e BRODA et al.(2000) identificaram clostrídios psicofílicos como *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* como agentes causadores de deterioração em cortes primários de carnes resfriadas embaladas a vácuo, causando tufamento durante a estocagem sob temperaturas entre -1,5 e 2° C . BRODA et al. (2000) identificou a presença de *C. gasigenes* em carnes de carneiro embaladas a vácuo com intensa produção de gás.

Estudos têm demonstrado que a principal fonte de contaminação por clostrídios psicofílicos na carne são os próprios animais abatidos, partículas do solo e/ou material fecal aderido à pele do animal (BRODA et al., 2002; BOEREMA et al., 2003).

Os microrganismos psicofílicos e anaeróbios obrigatórios presentes em animais de sangue quente comumente espalham-se no ambiente sob a forma de esporos. Nenhum agente físico ou químico havia sido efetivo na destruição de esporos de clostrídios causadores de “blown pack” (NOVAK & YUAN, 2004). Porém, em 2007, BRODA realizou um trabalho para testar a destruição in vitro de esporos do *Clostridium estertheticum* e concluiu que o sanitizante ácido peracético usado com ou sem calor é capaz de inativar até 10⁴ UFC/mL de esporos deste microrganismo. O ácido peracético tem sido o método de escolha das indústrias frigoríficas para controlar a deterioração “blown pack” nos últimos anos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a presença e o número de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, deteriorantes e/ou patogênicas aos seres humanos, o número de bactérias ácido-láticas, a frequência de *Clostridium estertheticum* e do *Clostridium gasigenes* em carnes próprias para o consumo e carnes que apresentaram a deterioração “blown pack”.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Determinar se há diferença entre amostras de carne refrigeradas embaladas a vácuo que apresentaram a deterioração “blown pack” e amostras não deterioradas quanto aos seguintes parâmetros microbiológicos:

- População de enterobactérias (UFC/mL do exsudato cárneo);
- População de bactérias ácido-láticas (BAL) (UFC/mL do exsudato cárneo);
- Presença ou ausência do *Clostridium estertheticum*;
- Presença ou ausência do *Clostridium gasigenes*.

2) Determinar por meio de provas bioquímicas quais gêneros da família *Enterobacteriaceae* predominam nas carnes com a deterioração “blown pack” e quais predominam em carnes não deterioradas embaladas a vácuo e mantidas sob refrigeração.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

O material utilizado para a realização deste experimento constou de 54 peças de carne embaladas a vácuo, submetidas a um controle sanitário por meio do Serviço de Inspeção Federal. Vinte e sete delas foram cedidas por indústrias frigoríficas e utilizadas como objeto principal do estudo, as chamadas carnes com deterioração “blown pack”, e as outras vinte e sete foram obtidas no comércio varejista, escolhidas aleatoriamente desde que apresentassem perfeito estado de conservação, caracteres físicos e sensoriais típicos para que representassem o grupo sem a deterioração estudada.

Cada amostra foi representada por uma peça do produto, de acordo com sua apresentação para a venda e procediam de indústrias pertencentes a diferentes estados brasileiros, como os estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Pará e Paraná.

Quanto aos tipos de corte utilizados para o estudo das carnes deterioradas e não deterioradas variavam entre: patinho, contra-filé, filé-mignon, maminha, picanha, alcatra, lagarto, filé de costela, fraldinha, coxão mole, paleta, miolo da alcatra, bananinha e rabo.

As amostras com a deterioração “blown pack” apresentavam visível distensão da embalagem, devido ao acúmulo de gás no interior da mesma, além de alterações físicas e sensoriais como coloração muitas vezes esverdeada, odor acre e sulfídrico, carne inconsistente devido a grande atividade proteolítica e exsudação excessiva, que tornam o produto inaceitável para o consumo. Já as amostras não deterioradas apresentavam o aspecto uniforme, sem manchas escuras ou claras variando do vermelho rosado ao vermelho pardo, ausência de limo na superfície, aparência marmórea e brilhante, consistência firme, compacta, elástica e ligeiramente úmida, odor suave, agradável e característico de carnes próprias para o consumo.

Todas as peças de carne estudadas estavam dentro do prazo de validade indicado na embalagem e com períodos de conservação que variavam de 4 a 120 dias. Aproximadamente 81,49% (22 amostras) das amostras deterioradas eram resfriadas e tinham prazo de validade de 60 dias, outros 18,51%(5 amostras) eram amostras congeladas, mas que chegavam ao laboratório descongeladas, com prazo de validade de até 6 meses.

Todas as amostras não deterioradas eram apenas resfriadas e tinham prazo de validade de 60 dias.

4.1.1 Colheita das amostras

Tanto na indústria frigorífica como nos estabelecimentos varejistas as peças de carne foram acondicionadas em caixas de material isotérmico, contendo gelo reciclável em igual proporção com as carnes para que fossem transportadas até o Laboratório de Análise de Alimentos de Origem Animal e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal - UNESP e também ao Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás - UFG Campus Goiânia, para posterior análise.

4.2 Preparo das diluições das amostras para as contagens de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e bactérias ácido-lácticas

Ao chegar ao laboratório a embalagem externa da carne foi higienizada com álcool 70% e levada ao fluxo laminar previamente esterilizado em lâmpada UV. A embalagem então foi aberta com o auxílio de uma alça de níquel-cromo aquecida para dar acesso ao exsudato cárneo. Este foi retirado com uma pipeta Pasteur e transferido para tubos de eppendorff esterilizados.

Um mililitro do exsudato foi adicionado a 09 mL de água peptonada a 0,1% esterilizada (APHA, 2001), obtendo-se assim uma diluição inicial de 10^{-1} . Á partir desta,

as demais diluições foram preparadas sucessivamente empregando-se o mesmo diluente até a diluição 10^{-7} .

4.3 Contagem e caracterização da família *Enterobacteriaceae* (ICMSF, 2000)

Para a contagem em placas, 1mL das diluições de 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} foram depositados no fundo de placas de Petri esterilizadas. Em seguida foi adicionado de 10 a 15mL do ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBA) fundido e resfriado a temperatura em torno de 45°C. A composição do meio evidencia a capacidade dos microrganismos fermentarem a glicose com produção de ácido, reação indicada pela viragem do indicador a vermelho e a precipitação de sais biliares ao redor das colônias. A seletividade é exercida pela presença de bile e cristal violeta no meio que inibe bactérias Gram positivas.

Após homogeneização do meio com a alíquota diluída e sua solidificação acrescentou-se em cada placa aproximadamente 10mL do mesmo meio, para a formação de uma segunda camada. A incubação foi realizada a 35-37° C por 24 horas. Após a incubação foram contadas as colônias de cor púrpura em placas que apresentavam entre 30 e 300 unidades formadoras de colônia. O número de unidades formadoras de colônia de enterobactérias por mililitro do exsudato foi obtido multiplicando-se o número contado na placa escolhida pelo fator de diluição correspondente. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro do exsudato (UFC/mL) e distribuídos em populações de até 10^5 UFC/mL do exsudato, populações entre 10^5 e 10^7 UFC/mL e populações maiores que 10^7 UFC/mL.

4.3.1 Provas confirmatórias

De cada amostra isolaram-se dez colônias típicas que foram submetidas à, no mínimo, duas passagens de purificação. Primeiramente foram semeadas por estriamento novamente em ágar seletivo VRBG, incubadas por 24 horas a 37°C. Após

a incubação as colônias puras foram repassadas para o ágar nutriente e incubadas da mesma forma. Para a confirmação das culturas puras realizaram-se esfregaços corados pelo método de Gram e a prova da oxidase (MACFADIN, 1976).

Foram considerados como pertencentes à família *Enterobacteriaceae* as culturas que se apresentavam em forma de bacilos Gram-negativos não esporulados e oxidase negativa.

4.3.2 Identificação de membros da família *Enterobacteriaceae*

Uma vez confirmadas como pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, as culturas em ágar inclinado passaram por uma bateria de provas bioquímicas para a caracterização dos principais gêneros presentes.

Para facilitar a classificação dos principais gêneros e espécies neste experimento foi necessário organizar as provas bioquímicas enquadrando-as em quatro esquemas classificatórios a partir da prova do triplo açúcar e ferro (TSI). Esta prova determina a capacidade de um microrganismo utilizar um determinado carboidrato (glicose e/ou lactose e/ou sacarose) como fonte de energia para seu desenvolvimento, com ou sem produção de gás, podendo ainda produzir sulfeto de hidrogênio (H₂S). De acordo com os resultados obtidos pelo TSI classificou-se os principais gêneros ou espécies de enterobactérias em quatro diferentes grupos:

Grupo I → Superfície alcalina e fundo ácido com H₂S (SKFA com H₂S):

Proteus mirabilis, *Salmonella* spp., *Edwardsiella tarda*

Grupo II → Superfície alcalina e fundo ácido sem H₂S (SKFA sem H₂S):

Escherichia vulneris, *Escherichia blattae*, *Escherichia coli* inactive, *Shigella sonnei*, *Shigella* spp., *Edwardsiella ictaluri*, *Providencia*, *Hafnia alvei*

Grupo III → Superfície ácida e fundo ácido com H₂S (SAFA com H₂S):

Proteus vulgaris, *Proteus penneri*, *Citrobacter freundii*

Grupo IV → Superfície ácida e fundo ácido sem H₂S (SAFA sem H₂S):

Proteus myxofaciens, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella* spp. *Klebsiella pneumoniae* Subsp. *rhinoscleromatis*, *Enterobacter* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Serratia liquefaciens*, *Cedeceae* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*.

Foram realizadas outras provas bioquímicas necessárias para a caracterização dos membros dentro de cada um dos quatro grupos formados como mostram os Anexos 1, 2, 3 e 4.

Os outros testes bioquímicos que não estão nos esquemas também foram realizados, porém apenas com o intuito confirmatório. Para tal foram utilizadas provas para identificação segundo estabelecido no “Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology” (HOLT et al., 1994) como mostra a Quadro 1.

Quadro 1. Perfil bioquímico das espécies e gêneros de enterobactérias pesquisados segundo estabelecido no "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (HOLT et al., 1994).

Espécies	TSI	H ₂ S	I	VM	VP	C	U	F	L	M
<i>Cedeceae</i> spp.	SAFA	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>Citrobacter diversus</i>	SAFA	-	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	SAFA	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	SKFA	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	SKFA	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	SAFA	-	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>Enterobacter</i> spp.	SAFA	-	-	+/-	+	+	+/-	-	-	+
<i>Escherichia blattae</i>	SKFA	-	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	SAFA	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>Escherichia coli inactive</i>	SKFA	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>Escherichia vulneris</i>	SKFA	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	SKFA	-	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	SAFA	-	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SAFA	-	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	+
<i>Klebsiella</i> spp.	SAFA	-	-	+/-	+/-	+	+/-	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	SKFA	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>Proteus myxofaciens</i>	SAFA	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>Proteus Penneri</i>	SAFA	+	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	SAFA	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Providencia</i> spp.	SKFA	-	+	+	-	+/-	-	+	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	SKFA	+	-	+	-	+	-	-	+	+/-
<i>Serratia liquefaciens</i>	SAFA	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Shigella sonnei</i>	SKFA	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella</i> spp.	SKFA	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	SAFA	-	+	+	-	-	+	-	-	-

Legenda: TSI→ triplo açúcar e ferro; H₂S→ produção de sulfeto de hidrogênio no TSI; I→Teste do Indol; VM→teste vermelho de metila; VP→teste Voges-Proskauer; C→ teste do Citrato de Simmons; U→Teste da urease; F→ teste da fenilalanina desaminase; L→ teste da lisina descarboxilase; M→teste do malonato; + → resultado positivo para a maioria das cepas; - →resultado negativo para a maioria das cepas; +/- → espécies positivas e espécies negativas num mesmo gênero ou subespécies positivas e negativas numa mesma espécie.

4.4 Contagem de bactérias ácido-láticas (ICMSF, 2000)

Para contagem de bactérias ácido-láticas as diluições de 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} foram plaqueadas também em profundidade por sobrecamada em Ágar para Lactobacillus Man, Rogosa & Sharpe (MRS) fundido e resfriado a temperatura em torno de 45°C e incubadas em jarra de anaerobiose a 30° C por 72 horas. Após a incubação realizou-se a contagem das colônias com formato arredondado, cor branca e aspecto cremoso, com diâmetro aproximado de dois a três milímetros, bordas delimitadas e localizadas sempre na região interna da dupla camada de MRS-ágar. Da mesma forma que a realizada para as enterobactérias, multiplicou-se o número contado na placa escolhida pelo fator de diluição correspondente. Desta forma obteve-se o número total de unidades formadoras de colônia de bactérias ácido-láticas por mililitro do exsudato cárneo (UFC/mL) e distribuídos conforme já apresentado no item 4.3.

4.5. Pesquisa do *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*

4.5.1 Preparo das amostras e extração do DNA genômico

De cada amostra foram retirados, assepticamente, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, 2 mL do exsudato os quais foram imediatamente transferidos para um tubo de ensaio contendo 20mL de caldo infusão cérebro e coração (BHI, Difco), em duplicata.

Os tubos com BHI foram acondicionados em jarras de anaerobiose (Gas Pack™, BD), incubados por 10 dias, sob temperatura de refrigeração (10°C). Após este período as amostras foram processadas para posterior extração do DNA.

A extração do DNA genômico foi realizada segundo a metodologia proposta por van SOOLINGEM et al. (1991) com modificações. Uma alíquota de 4mL do material incubado foi transferida para tubos de eppendorf e centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos. Uma vez centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em solução de tampão Tris-EDTA (TE) pH 8. Em seguida adicionou-se

lisozima (10mg/mL) (Gibco Corporation, USA) e incubou-se a 37°C durante 24 horas em banho-maria. A lise foi finalizada com a adição do reagente Dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS, Invitrogen®).

A purificação foi feita com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 25:24:1 (HPLC, JT Baker). Após a purificação, com o intuito de precipitar o DNA, adicionou-se etanol absoluto e incubaram-se as amostras em freezer a temperatura de -10°C por 18 horas. Após este período o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 1 hora e novamente ressuspendido em etanol absoluto e incubado por mais 18 horas a -10°C. A solução foi então centrifugada, o álcool descartado, restando no fundo do eppendorf o DNA extraído e purificado. O material foi posto para secar a temperatura ambiente. Após todo o álcool ter evaporado a amostra foi ressuspendida em 100µL de tampão TE (pH8) e estocado a 4°C. Desta solução retirou-se 2 µL para a avaliação da qualidade e quantificação do DNA extraído.

4.5.2 Avaliação da qualidade e quantificação do DNA extraído

A quantificação do DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE (Tris, ácido bórico e EDTA, pH 8,3), a 90volts (V) por 40 minutos. Os fragmentos de DNA foram corados em solução de brometo de etídeo (0,6µg/mL) e as bandas de DNA observadas em transiluminador de luz ultravioleta.

Estimou-se a concentração comparando-se visualmente com diluições conhecidas de λ DNA (Invitrogen®). De acordo com a quantidade de DNA obtida fez-se as diluições necessárias para atingir a concentração de 100ng/5µL, concentração esta considerada ideal para a amplificação.

A integridade do DNA foi avaliada partindo-se do princípio de que bandas muito difusas no gel estariam com seus fragmentos de DNA degradados. Amostras com estas características foram descartadas e uma nova extração realizada. Já as bandas visualizadas como faixas compactas e únicas na porção superior do gel foram dadas como amostras de boa qualidade e utilizadas para amplificação.

4.5.3 Primers, mistura da reação e condições de amplificação

O par de iniciadores, ou seja, o primer utilizado para a detecção do *Clostridium estertheticum* foi delineado por HELPS et al. (1999) e é composto pelos primers forward RFP (5´TGA TCG CAT GAT CTT AAC ATC AAA G-3´) e reverse RRP (5´TCG ACC CCC GAC ACC TAG TAT T-3´) que se encontram nas posições 173-197 e 813-792, respectivamente, da subunidade 16S do RNAr de *C. estertheticum* (nº acesso no GenBank® S46734). Esse par amplifica o fragmento de 641 pares de base (pb) do DNA do *Clostridium estertheticum*.

Para detecção do *Clostridium gasigenes*, utilizou-se o par de primers proposto por BRODA et al. (2003), composto pelos primers 16SDBF (5´GAG AGG AGT TCT TCG GAA CGA-3´) e 16SDBR (5´AAG CSA CTT CCC CAA TTA C-3´). Estes primers encontram-se localizados na região 61-81 e 995-997, respectivamente, na seqüência de referência do microrganismo (GenBank®, nº de acesso AFO92548 e AF143692), amplificando fragmentos de 935pb.

As concentrações finais das soluções que fazem parte da mistura das reações e as condições do PCR encontram-se descritas no Quadro 2.

Os programas utilizados para amplificação das amostras foram determinados de acordo com a temperatura de anelamento de cada par de primer e estão descritos no Quadro 3.

Quadro 2. Composição das reações de PCR e concentrações finais dos reagentes, segundo os pares de primers utilizados, para detecção do *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*.

REAGENTES	PARES DE PRIMERS	
	RFP/RRP	16DBF/16DBR
Amplicon	641 pb	935 pb
DNA	100 ng	100 ng
Primer reverse	0,3 mM	0,5 mM
Primer forward	0,3 mM	0,5 mM
dNTP	0,2 mM	0,2 mM
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
Taq DNA polimerase	2U	2,5 U
Tampão 10X tris-HCl pH8.3	100mM	100mM
KCl	500mM	500mM
Volume total	50µL	50µL

Quadro 3. Características dos programas de amplificação para o *Clostridium estertheticum* (RFP/RRP) e para o *Clostridium gasigenes* (16DBF/16DBR).

Características da amplificação	PARES DE PRIMERS	
	RFP/RRP	16DBF/16DBR
Amplicon	641 pb	935 pb
N° de ciclos	40	30
Desnaturação inicial	95°C/5 min.	93°C/3 min.
Desnaturação	94°C/1 min.	92°C/1 min.
Anelamento	60°C/1 min.	55°C/1 min.
Extensão	72°C/1 min.	72°C/2 min.
Extensão final	72°C/10 min.	72°C/3 min.

Após as amplificações, os amplicons, ou seja, produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, com alinhamento inicial de 115V/15 minutos e corrida a 100V/40 minutos. Utilizou-se um marcador padrão de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®). Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,6µg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e a documentação fotográfica realizada com sistema digital (BIO RAD®).

4.5.4 Confirmação da identidade molecular dos produtos de PCR

Para confirmar a identidade dos produtos de PCR obtidos com a amplificação foram enviadas 2 amostras positivas para o *Clostridium estertheticum* (RFP/RRP) e 2 para o *Clostridium gasigenes* (16DBF/16DBR) ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UNB) para que fosse feito o seqüenciamento.

Primeiramente fez-se a purificação dos produtos da amplificação utilizando-se o kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) em seguida foram quantificados estimando-se visualmente a intensidade de luz das bandas e comparando-as com o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®) em gel de agarose a 2% com brometo de etídeo (0,6µg/mL), em tampão TBE 0,5X (pH8.0), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Uma vez determinada a concentração dos amplicons as amostras foram analisadas em seqüenciador automático (Megabace 1000, Amersham Biotech®).

Para analisar as seqüências obtidas utilizou-se as ferramentas de bioinformática Phred, Phrap e CAP3 e foram comparadas com as seqüências de referências registradas no Genbank® (n° de acesso S46734 para o *Clostridium estertheticum* e n° de acesso AFO92548 e AF143692 para o *Clostridium gasigenes*).

4.6 Análise estatística dos resultados

As variáveis número de enterobactérias e de bactérias ácido-láticas, foram analisadas pelo procedimento GLM (General Linear Model) do SAS utilizando um modelo matemático que inclui os efeitos dos tratamentos (amostras deterioradas e não deterioradas) e a interação entre eles. Havendo diferença estatística entre os grupos de amostras a comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Já o efeito dos tratamentos sobre as variáveis presença e ausência de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foi analisado pelo teste de Qui-quadrado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem de enterobactérias

O estudo das populações de enterobactérias nas amostras com deterioração “blown pack” (deterioradas) e sem deterioração “blown pack” (não deterioradas) revelou diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os grupos. Ou seja, a média de $1,7 \times 10^6$ UFC/mL para amostras deterioradas foi estatisticamente superior à de $5,5 \times 10^3$ UFC/mL encontrada nas amostras não deterioradas. Do total de 27 amostras deterioradas, 21 (77,77%) apresentaram populações de enterobactérias maiores que 10^6 UFC/mL do exsudato. Dentre as não deterioradas, 18 (66,66%) apresentaram populações inferiores a 10^5 UFC/mL do exsudato. Estes dados são concordantes com os obtidos por BORCH et al. (1996), RIDDEL & KORKEALA (1997) e YOST et al. (2002) quando avaliaram a microbiota de carnes embaladas a vácuo não alteradas.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, das 27 amostras deterioradas 44,45% tiveram populações entre 10^5 e 10^7 UFC/mL do exsudato e 33,33% tiveram populações maiores que 10^7 UFC/mL do exsudato. Esses resultados reafirmam os obtidos em estudos anteriores realizados por BORCH et al. (1996), com carnes embaladas a vácuo com a mesma deterioração onde foram encontrados níveis de 10^8 UFC a 10^9 UFC/g do alimento.

Embora as carnes não deterioradas tenham apresentado populações inferiores de enterobactérias em relação às carnes deterioradas, 9 das 27 amostras não deterioradas, ou seja, 33,34%, provavelmente não estariam dentro dos padrões aceitáveis para carne *in natura* não maturada embalada a vácuo que tolera até 10^4 UFC/g de coliformes termotolerantes segundo a RDC n. 12 da Anvisa (BRASIL, 2001). Podendo estas carnes não deterioradas posteriormente sofrer a deterioração “blown pack”.

Tabela 1. Populações de enterobactérias (UFC/mL do exsudato cárneo) em amostras de carne sem a deterioração “blown pack” (não deterioradas) e carnes com a deterioração “blown pack” (carnes deterioradas) e sua distribuição em populações de até 10^5 UFC/mL do exsudato, populações entre 10^5 e 10^7 UFC/mL e populações maiores que 10^7 UFC/mL.

Tipo de amostra	Populações de enterobactérias (UFC/mL do exsudato)			Total (n°(%))
	< 10^5 (n°(%))	entre 10^5 - 10^7 (n°(%))	> 10^7 (n°(%))	
Não deteriorada	18/27 (66,66%)	5/27 (18,52%)	4/27 (14,82%)	27 (100%)
Deteriorada	6/27 (22,22%)	12 /27(44,45%)	9/27(33,33%)	27 (100%)
Total	24/54 (44,45%)	17/54 (31,48%)	13/54 (24,07%)	54 (100%)

5.2 Caracterização dos microrganismos da família *Enterobacteriaceae*

Os resultados obtidos a partir das provas bioquímicas realizadas em 270 colônias isoladas de amostras deterioradas mostraram que houve uma maior ocorrência de *Hafnia alvei* (18,5%), seguido de *Proteus vulgaris* (16,7%), *Klebsiella* spp. (8,5%), *Enterobacter aerogenes* (8,5%), *Serratia liquefaciens* (8,1%) e *Edwardsiella ictaluri* (7,7%) como mostra a Tabela 2. Estes resultados estão em acordo com aqueles encontrados por HANNA et al., (1979) e BOEREMA et al. (2002) que identificaram três espécies da família *Enterobacteriaceae* - *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter aerogenes* e *Hafnia alvei*, como possíveis deteriorantes de carnes refrigeradas embaladas a vácuo com a deterioração “blown pack”.

As demais 39,7% das colônias isoladas de amostras deterioradas foram caracterizadas como, *Escherichia vulneris*, *Escherichia blattae*, *Escherichia coli inactive*, *Shigella sonnei*, *Shigella* spp., *Providencia* spp., *Citrobacter freundii*, *Proteus myxofaciens*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri* e *Edwardsiella tarda* .

Salmonella spp. e *Cedeceae* spp. não foram isoladas de amostras deterioradas.

Já, o estudo de 270 colônias isoladas de amostras não deterioradas mostrou uma maior ocorrência dos seguintes microrganismos *Hafnia alvei* (38,9%) seguido de

Edwardsiella ictaluri (11,5%), *Serratia liquefaciens* (10,3%) e *Enterobacter* spp. (8,6%) como mostra a Tabela 3.

Os outros 30,7% das colônias isoladas de amostras não deterioradas foram classificadas como: *Salmonella* spp., *Escherichia vulneris*, *Escherichia blattae*, *Escherichia coli* inactive, *Shigella sonnei*, *Shigella* spp., *Providencia*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Proteus myxofaciens*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella* spp., *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*.

Cedeceae spp., *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri* e *Edwardsiella tarda* não foram isolados de amostras não deterioradas.

A espécie predominante tanto nas amostras não deterioradas como nas amostras deterioradas foi a *Hafnia alvei* identificada em 155 (28,70%) das 540 culturas estudadas.

HANNA et al. (1979) ao inocularem experimentalmente em carnes embaladas à vácuo culturas de *Lactobacillus* spp. e *Hafnia alvei* notaram que a presença de gás no interior da embalagem era mais abundante nas inoculadas com *H. alvei* que nas inoculadas com *Lactobacillus* spp. heterofermentativos. O gás produzido era composto basicamente da mistura de CO₂ gerado por *Lactobacillus* heterofermentativos e H₂S gerado por *H. alvei*.

Segundo LINDBERG et al., (1998) e RIDELL & KORKEALA (1997), 50% dos isolados entéricos de carne refrigerada são da espécie *Hafnia alvei*. Este dado justifica sua ampla distribuição nas amostras estudadas.

BRENNER (1992) apontou os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providência*, *Serratia*, *Escherichia* e *Yersinia* como deteriorantes de carne e produtos cárneos, porém, neste experimento, todos estes gêneros foram isolados tanto de carnes deterioradas como de carnes não deterioradas. Isso significa que os mesmos podem ser isolados de carne embalada a vácuo esteja ela deteriorada ou não e o que determinará o processo de deterioração será o número em que elas se encontram e as condições que possibilitem seu desenvolvimento já que as amostras

deterioradas tiveram populações de enterobactérias bem acima das amostras não deterioradas.

Os resultados obtidos são um tanto preocupantes já que, mesmo que em menor número, foram isoladas espécies potencialmente patogênicas de interesse em saúde pública como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Klebsiella* spp. entre outras. De acordo com HOLT et al. (1994) as enterobactérias são responsáveis por 50% de infecções nosocomiais, mais frequentemente causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* e *Serratia* também isoladas a partir das carnes estudadas.

Segundo SMITH et al. (1993) e DAINTY et al. (1986) as principais espécies isoladas em carnes refrigeradas embaladas a vácuo responsáveis pela potencial produção de amins biogênicas são *Hafnia alvei* e *Serratia liquefaciens*, encontradas neste trabalho com maior frequência em amostras que não sofreram deterioração, ou seja, poderiam ser ingeridas normalmente sem que o consumidor notasse qualquer alteração sensorial, podendo causar conseqüentes problemas à saúde.

Tabela 2. Resultado da identificação de 270 colônias de enterobactérias isoladas de carne bovina embaladas a vácuo e mantidas sob refrigeração que apresentavam a deterioração "blown pack".

Espécies	Culturas identificadas	
	nº	%
<i>Hafnia alvei</i>	50	18,5%
<i>Proteus vulgaris</i>	45	16,7%
<i>Klebsiella</i> spp.	23	8,5%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	23	8,5%
<i>Serratia liquefaciens</i>	22	8,1%
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	21	7,7%
<i>Escherichia coli</i>	12	4,4%
<i>Shigella sonnei</i>	10	3,7%
<i>Providencia</i> spp.	9	3,4%
<i>Escherichia blattae</i>	8	2,9%
<i>Citrobacter freundii</i>	7	2,6%
<i>Escherichia vulneris</i>	6	2,3%
<i>Enterobacter</i> spp.	5	1,8%
<i>Proteus myxofaciens</i>	5	1,8%
<i>Proteus mirabilis</i>	4	1,5%
<i>Proteus penneri</i>	4	1,5%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	1,5%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4	1,5%
<i>Citrobacter diversus</i>	3	1,2%
<i>E.coli inactive</i>	2	0,7%
<i>Edwardsiella tarda</i>	1	0,4%
<i>Shigella</i> spp.	1	0,4%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0,4%
<i>Salmonella</i> spp.	0	0
<i>Cedeceae</i> spp.	0	0

Tabela 3. Resultado da identificação de 270 colônias de enterobactérias isoladas de carne bovina embaladas a vácuo e mantidas sob refrigeração sem a deterioração “blown pack”.

Espécies	Culturas identificadas	
	nº	%
<i>Hafnia alvei</i>	105	38,9%
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	31	11,5%
<i>Serratia liquefaciens</i>	28	10,3%
<i>Enterobacter</i> spp.	23	8,6%
<i>E.coli</i> inactive	13	4,9%
<i>Escherichia coli</i>	12	4,5%
<i>Klebsiella</i> spp.	9	3,3%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	2,2%
<i>Shigella sonnei</i>	6	2,2%
<i>Proteus vulgaris</i>	5	1,9%
<i>Proteus myxofaciens</i>	5	1,9%
<i>Citrobacter diversus</i>	5	1,9%
<i>Escherichia vulneris</i>	4	1,5%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4	1,5%
<i>Escherichia blattae</i>	3	1,1%
<i>Shigella</i> spp.	3	1,1%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	1,1%
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0,7%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0,3%
<i>Salmonella</i> spp.	1	0,3%
<i>Providencia</i> spp.	1	0,3%
<i>Proteus mirabilis</i>	0 %	0 %
<i>Proteus penneri</i>	0 %	0 %
<i>Edwardsiella tarda</i>	0 %	0 %
<i>Cedeceae</i> spp.	0 %	0 %

5.3 Contagem de bactérias ácido-láticas

Este trabalho evidência a alta prevalência de bactérias ácido-láticas em amostras com a deterioração “blown pack”. Comparando-se as populações de BAL constatou-se que em carnes com deterioração “blown pack” elas são significativamente maiores que em amostras não deterioradas ($p < 0,05$). Ou seja, a média de $5,5 \times 10^8$ UFC/mL do primeiro grupo foi significativamente maior que a média do segundo, que foi de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL. Das 27 amostras deterioradas analisadas, 21 (77,77%) tiveram populações maiores que 10^7 UFC/mL do exsudato cárneo enquanto que nas amostras não deterioradas apenas 8 (29,62%) das 27 tiveram populações maiores que 10^7 UFC/mL como demonstra a Tabela 4.

Para BORCH et al. (1996) a deterioração com formação de gás no interior da embalagem de carnes refrigeradas e a alteração de odor normalmente são detectadas quando os microrganismos deteriorantes estão presentes em níveis de 10^8 UFC a 10^9 UFC/g do alimento. Este mesmo autor concluiu que a interação metabiótica entre bactérias ácido-láticas (microbiota dominante) e enterobactérias intensifica o grau de deterioração do produto.

Entre as amostras não deterioradas, das 27 estudadas 13 (48,15%) apresentaram populações de BAL menores que 10^5 UFC/mL do exsudato, enquanto que nenhuma amostra deteriorada teve populações de BAL menores que 10^5 UFC/mL do exsudato.

Tabela 4. Populações de bactérias ácido-láticas (UFC/mL do exsudato cárneo) em amostras de carne sem a deterioração “blown pack” (não deterioradas) e carnes com a deterioração “blown pack” (carnes deterioradas) e sua distribuição em populações de até 10^5 UFC/mL do exsudato, populações entre 10^5 e 10^7 UFC/mL e populações maiores que 10^7 UFC/mL.

Tipo de amostra	Populações de bactérias ácido-láticas (UFC/mL do exsudato)			Total (n°(%))
	< 10^5 (n°(%))	entre 10^5 - 10^7 (n°(%))	> 10^7 (n°(%))	
Não deteriorada	13/27 (48,15%)	6/27 (22,23)	8/27 (29,62%)	27 (100%)
Deteriorada	0/27 (0%)	6/27 (22,23%)	21/27 (77,77%)	27 (100%)
Total	13/54 (24,08%)	12/54 (22,22%)	29/54 (53,70%)	54 (100%)

HANNA et al. (1979) comprovaram que *Lactobacillus* spp. heterofermentativos são capazes de produzir gás no interior da embalagem a vácuo quando estocados sob temperaturas de refrigeração (1 a 3°C) por 3 semanas. Assim, a presença de *Lactobacillus* em populações elevadas nas carnes estudadas neste trabalho pode ter contribuição significativa no processo de deterioração “blown pack”.

Apesar dos *Lactobacillus* produzirem bacteriocinas e outros compostos que inibem o desenvolvimento de patógenos (AYMERIC & HUGAS, 1998) sua população deve ser controlada por meio de medidas higiênico-sanitárias para evitar que os mesmos contribuam com a deterioração do produto, diminuindo o tempo de vida de prateleira. Considerando que muitos destes microrganismos são encontrados no trato digestivo de ruminantes (HOVE et al., 1999) a contaminação direta ou indireta da carcaça com material de origem fecal deve ser evitada através de medidas preventivas.

Deve-se destacar que nas amostras sem a deterioração “blown pack”, 14,82% (4/27) tiveram populações de enterobactérias maiores que 10^7 UFC/mL e 29,62% (8/27) das amostras tiveram populações de bactérias ácido-lácticas também maiores que 10^7 UFC/mL do exsudato, levantando-se o questionamento sobre o verdadeiro papel destes grupos de microrganismos neste tipo de deterioração. Muitas são as variáveis que levam a culminar na deterioração do tipo “blown pack”, não apenas o tamanho elevado da população microbiana deteriorante, como também fatores que devem ser questionados como a permeabilidade do filme utilizado na embalagem que pode permitir a passagem seletiva de alguns gases em diferentes tipos de embalagem. Esta troca gasosa pode provocar uma mudança significativa da atmosfera gasosa do interior da embalagem favorecendo o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes específicos, ou até mesmo o fato de certas embalagens conseguirem reter algumas moléculas gasosas causando a típica distensão em determinadas amostras de carne e em outras não.

TSIGARIDA & NYCHAS (2001) demonstraram que o tipo de filme utilizado nas embalagens influencia no desenvolvimento de diferentes grupos microbianos, além de influenciar nos tipos de metabólitos produzidos e suas concentrações. Outros fatores como o pH dos diferentes grupos musculares, a contaminação bacteriana inicial e as

variações de temperatura pelo qual o produto foi submetido durante todo o processamento devem ser considerados. Cada mudança será refletida nas diferentes taxas de deterioração (EGAN & SHAY, 1982) ou diferentes taxas de desenvolvimento de bactérias deteriorantes (TSIGARIDA et al., 2000).

5.4 Detecção do *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*

A Figura 2 demonstra em gel de agarose a 1% os produtos da amplificação dos pares de primers para detecção do *Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes* nos cortes cárneos bovinos resfriados e embalados á vácuo, representados por amplicons de 641 pb e 935 pb, respectivamente.

Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 5 onde observa-se que do total de 54 amostras estudadas foram obtidas 68,52% de amostras positivas e 31,48% negativas para o *C. estertheticum*. Estes dados confirmam a ampla distribuição do *C. estertheticum* em carnes embaladas a vácuo e mantidas sob refrigeração.

As amostras deterioradas apresentaram significativamente maior positividade para o *C. estertheticum* que amostras não deterioradas ($p < 0,01$). Das 27 amostras estudadas com a deterioração “blown pack”, 23 (85,18%) foram positivas para o *C. estertheticum* enquanto que as não deterioradas foram 14 (51,85%) positivas como mostra a Tabela 6. Este resultado é coincidente ao de RAUECKER (2007), que encontrou o microrganismo em 85,18% das amostras deterioradas. No entanto, no mesmo trabalho, ao analisar carnes não deterioradas, RAUECKER (2007) encontrou o *Clostridium estertheticum* em apenas 9,52% das amostras.

Ainda que as amostras não deterioradas tenham apresentado significativamente um número menor de amostras positivas para o *C. estertheticum* em relação às amostras com deterioração “blown pack”, a presença do microrganismo em 51,85% das amostras não deterioradas pode ser um indicativo da ampla distribuição deste microrganismo e que apenas sua presença não é suficiente para causar a deterioração. É preciso que haja outros fatores que influenciem no desencadear e na evolução da deterioração como a permeabilidade da embalagem a gases como o oxigênio e o

dióxido de carbono, discutidos anteriormente. Além desses, variações na temperatura de conservação, o uso de sanitizantes na lavagem das carcaças, a interação que há entre diferentes populações microbianas presentes na carne contaminada também podem ser considerados.

A prevalência do *Clostridium gasigenes* em todas as amostras estudadas foi baixa. Os resultados expostos na Tabela 6 mostram a relação total de amostras positivas, 10/54 (18,52%), e negativas, 44/54 (81,48%), para o *C. gasigenes*.

O resultado da pesquisa de *C. gasigenes* em amostras de carne deterioradas mostrou uma prevalência muito baixa de amostras positivas, apenas 8/27 (29,62%), da mesma forma que nas amostras não deterioradas encontrou-se 2/27 (7,40%) para este microrganismo, não havendo diferença estatística significativa entre elas. Da mesma forma RAUECKER (2007) encontrou a presença do *C. gasigenes* em carnes com deterioração “blown pack” em apenas 18,52% (5/27) das amostras estudadas e considerou a prevalência baixa.

Os resultados do presente estudo estão em concordância com estudos anteriores realizados por DAINTY et al. (1989), COLLINS et al. (1992) e BRODA et al. (2000) que também identificaram a presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em carnes bovinas embaladas a vácuo mantidas sob refrigeração.

HELPS et al. (1999) encontraram estes clostrídios no solo, tubo digestivo de animais e fezes. RAUECKER (2007) os isolou de diversas fontes dentro da indústria frigorífica como roletes de esteiras, ralos, salas de desossa, câmaras-frias e outros, justificando o amplo número de amostras de carne positivas. O problema pode ser atribuído à contaminação fecal direta e/ou indireta, e a falhas de higiene operacionais.



Legenda: Canaletas 1 e 14, marcador de peso molecular (DNA ladder 100pb)
 Canaletas 2 e 3 controle positivo (DSM12272) e amostra positiva para o *C. gasigenes* respectivamente.
 Canaletas 6 e 7, 8 controle positivo (DSM 8809) e amostras positivas para *C. estertheticum*, respectivamente.
 Canaletas 5 e 9 controles negativos para *C. gasigenes* e *C. estertheticum*, respectivamente.
 Canaletas 4 amostra negativa para *C. gasigenes*
 Canaletas 10, 11, 12, 13 amostra negativa para *C. estertheticum*

Figura 2. Representação em gel de agarose (1%) contendo produtos de PCR para detecção do *C. estertheticum* (RFP/RRP) e *C. gasigenes* em cortes cárneos bovinos resfriados e embalados á vácuo, amplicons de 641 pb e 935 pb respectivamente.

Tabela 5. Número de amostras de carne refrigeradas embaladas a vácuo positivas e negativas para a presença de *Clostridium estertheticum* a partir do exsudato cárneo de amostras de carne sem a deterioração “blown pack” (não deterioradas) e carnes com a deterioração “blown pack” (carnes deterioradas).

<i>Clostridium estertheticum</i>			
Tipo de amostra	Positivo (n°(%))	Negativo (n°(%))	Total (n°(%))
Não deteriorada	14/27 (51,85%)	13/27 (48,15%)	27 (100%)
Deteriorada	23/27 (85,18%)	4/27 (14,82%)	27 (100%)
Total	37/54 (68,52%)	17/54 (31,48%)	54 (100%)

Tabela 6. Número de amostras de carne refrigeradas embaladas a vácuo positivas e negativas para a presença de *Clostridium gasigenes* a partir do exsudato cárneo de amostras de carne sem a deterioração “blown pack” (não deterioradas) e carnes com a deterioração “blown pack” (carnes deterioradas).

<i>Clostridium gasigenes</i>			
Tipo de amostra	Positivo (n°(%))	Negativo (n°(%))	Total (n°(%))
Não deterioradas	2/27 (7,40%)	25/27 (92,60%)	27 (100%)
Deteriorada	8/ 27(29,62%)	19/27 (70,38%)	27 (100%)
Total	10/54 (18,52%)	44/ 54 (81,48%)	54 (100%)

5.5 Confirmação da identidade dos produtos de amplificação

Os resultados obtidos a partir da purificação dos produtos da amplificação das espécies de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* estão evidenciados na Figura 3.

Dos produtos da amplificação obtidos a partir do primer RFP/RRP para o *C. estertheticum* apenas 333pb dos 641pb (51,95%) foram seqüenciados. Utilizando-se do programa BLAST do Genbank[®] para o alinhamento das seqüências obtidas (Query), com as seqüências de referencia (Sbjct) a fim de se verificar a homologia das bases seqüenciadas, o resultado obtido foi de 100% de homologia com o *C. estertheticum* (n° de acesso S46734) como mostra a Figura 4.

Das amostras enviadas para o seqüenciamento dos produtos da amplificação para o *C. gasigenes* (par 16DBF/16DBR) apenas 434pb dos 935pb (46,42%) do

fragmento foram seqüenciados, tendo como resultado 99% de homologia com as seqüências de referência da subunidade 16S do RNAr do *C. gasigenes* (n° de acesso AF092549 e AF143692) como mostra a Figura 5.

Tanto no seqüenciamento dos produtos da amplificação do *C. estertheticum* como o do *C. gasigenes* foram detectados outros microrganismos com a mesma similaridade, sendo necessário que o seqüenciamento seja complementado para que seja seqüenciada uma quantidade maior de bases aumentando assim a confiabilidade dos resultados.

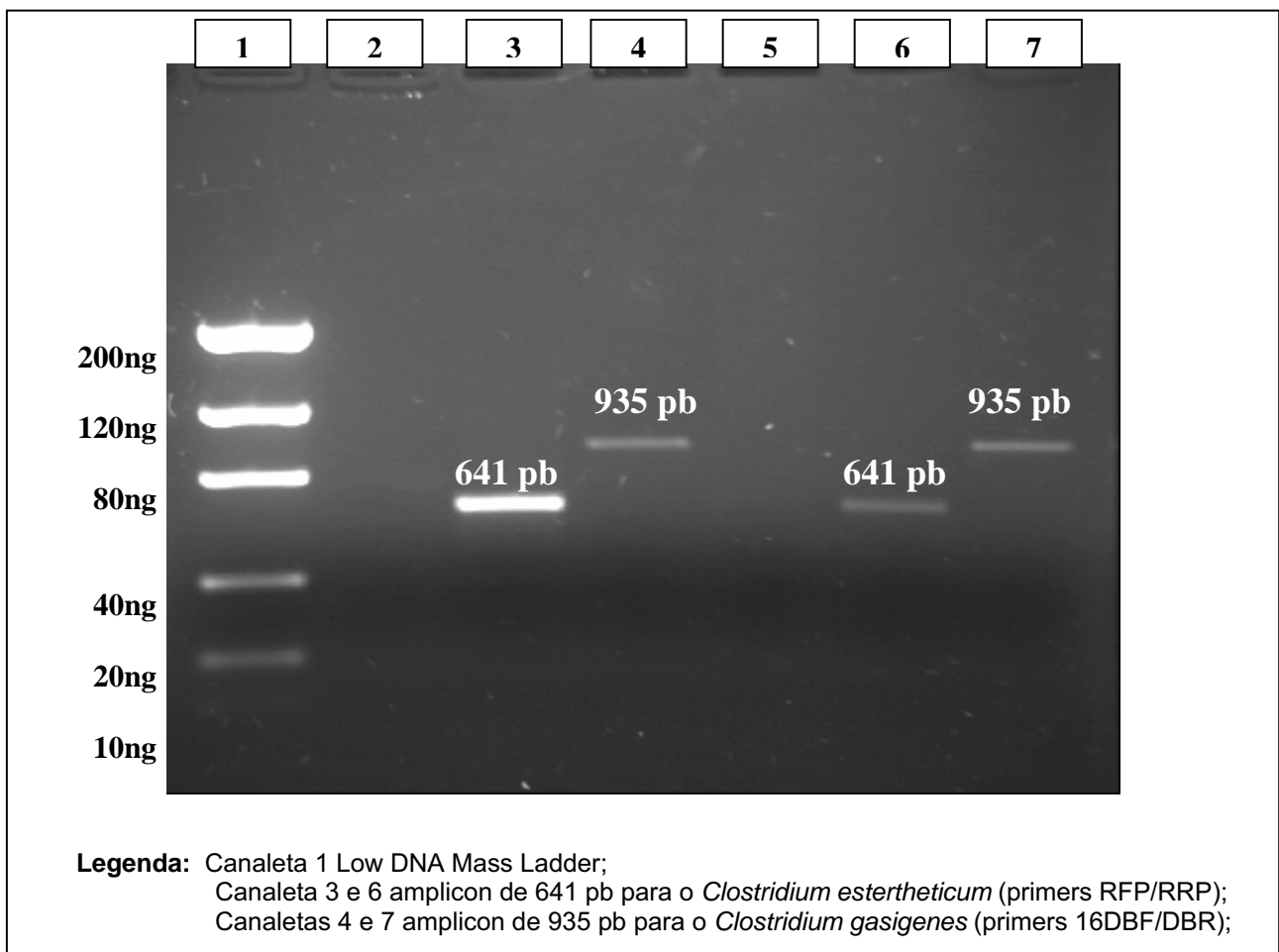


Figura 3. Representação em gel de agarose (2%) da concentração de amplicons

```

S46734 16S rRNA [Clostridium estertheticum, NCIMB 12511, rRNA, 1427
nt]
Length=1427

Score = 608 bits (329), Expect = 4e-171
Identities = 332/333 (99%), Gaps = 1/333 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TACGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCCACTTACCTCTCCTGCACCTCTAGACACCCAG 60
|||||
Sbjct 672 TACGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCCACTTACCTCTCCTGCACCTCTAGACACCCAG 613

Query 61 TTTCAAATGCAGCACCCAAGTTAAGCTCGGGTATTTACATCTGACTTAAATGTCCGCCT 120
|||||
Sbjct 612 TTTCAAATGCAGCACCCAAGTTAAGCTCGGGTATTTACATCTGACTTAAATGTCCGCCT 553

Query 121 ACGCATCCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCT 180
|||||
Sbjct 552 ACGCATCCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCT 493

Query 181 GCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCCTCCTCTGGTACCGTCATTATCGTCCCAGAAGAC 240
|||||
Sbjct 492
GCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCC-CCTCTGGTACCGTCATTATCGTCCCAGAAGAC 434

Query 241 AGAACTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCATTACGCGGCGTTGCTGCGTCAGGGTTTCCC 300
|||||
Sbjct 433 AGAACTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCATTACGCGGCGTTGCTGCGTCAGGGTTTCCC 374

Query 301 CCATTGCGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCCG 333
|||||
Sbjct 373 CCATTGCGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCCG 341

```

Figura 4. Alinhamento e comparação da seqüência de nucleotídeos resultantes do seqüenciamento (Query) e a seqüência de referencia (Sbjct) do programa BLAST (Genbank[®]) para *C. estertheticum* (n° de acesso S46734) onde obteve-se 100% de homologia entre as seqüências.

```

AF092548.1 / AF092548 Clostridium gasigenes 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1483

Score = 780 bits (422), Expect = 0.0
Identities = 430/434 (99%), Gaps = 0/434 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAATACTTAATGCGTTAGCGGCGGCACGGAAGTCATGACAACCTCCACACCTAGTATTCA 60
|||||
Sbjct 844 GAATACTTAATGCGTTAGCGGCGGCACGAGGTCATGACAACCCACACCTAGTATTCA 785

Query 61 TCGTTTACGGCGTGACTACCAGGTTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCC 120
|||||
Sbjct 784 TCGTTTACGGCGTGACTACCAGGTTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCC 725

Query 121 TCAGTGTCAAGTTACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTAATATCTAC 180
|||||
Sbjct 724 TCAGTGTCAAGTTACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTAATATCTAC 665

Query 181 GCATTTACCCGCTACTACTAGGAATTCCACTTTCCTCCTGCACTCTAGATTTCCAGTTT 240
|||||
Sbjct 664 GCATTTACCCGCTACTACTAGGAATTCCACTTTCCTCCTGCACTCTAGATTTCCAGTTT 605

Query 241 GAAATGCAGTTCTCGGGTTGAGCCCGAGTATTTACATCTCACTTAAAAATCCACCTACG 300
|||||
Sbjct 604 GAAATGCAGTTCTCGGGTTGAGCCCGAGTATTTACACCTCACTTAAAAATCCACCTACG 545

Query 301 CTCCCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCT 360
|||||
Sbjct 544 CTCCCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCT 485

Query 361 GGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTCCTTGGGTACCGTCATTATCGTCCCCAAAGACAGA 420
|||||
Sbjct 484 GGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTCCTTGGGTACCGTCATTATCGTCCCCAAAGACAGA 425

Query 421 GTTTTACGATCCGA 434
|||||
Sbjct 424 GTTTTACGATCCGA 411

```

Figura 5. Alinhamento e comparação da seqüência de nucleotídeos resultantes do seqüenciamento (Query) e a seqüência de referencia (Sbjct) do programa BLAST (Genbank®) *C. gasigenes* (n° de acesso AF092549) onde obteve-se 99% de homologia entre as seqüências.

6. Conclusões

- Os microrganismos da família *Enterobacteriaceae* e bactérias ácido-láticas estavam presentes em populações elevadas e em maior número nas carnes com deterioração “blown pack”.
- Dentre os gêneros da família *Enterobacteriaceae* encontrados predominaram *Hafnia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Edwardsiella* devendo-se destacar a presença da espécie *Hafnia alvei*.
- As amostras com deterioração “blown pack” apresentaram maior positividade para o *C. esterteticum* que amostras não deterioradas.
- Não houve diferença estatística de positividade para a presença do *C. gasigenes* entre amostras com deterioração “blown pack” e carnes não deterioradas.

7. Considerações finais

Muitos dos problemas enfrentados pela indústria de alimentos são atribuídos a falhas operacionais e deficiências na higienização. Por tanto, o controle geral dos microrganismos encontrados nesta pesquisa deve ser realizado por meio de medidas higiênico-sanitárias que previnam a contaminação das carcaças com material fecal, quer seja de forma direta ou indireta através de fômites.

Deve-se realizar a higienização de toda a planta e carcaças com produtos que possam reduzir o desenvolvimento destes microrganismos.

Muitas das variações encontradas em amostras com deterioração “blown pack”, como o tempo necessário para que ocorra a deterioração, a intensidade do odor ao se abrir a embalagem tufada, o nível de deterioração, a prevalência de um ou outro microrganismo, podem estar associadas com fatores como a diferença de pH dos diferentes grupos musculares, a história da amostra, se passou por flutuações de temperatura, a contaminação por diferentes populações de microrganismos, assim como a carga bacteriana inicial. Estes, assim como outros fatores, incluindo a importância da permeabilidade do filme devem ser objetos de estudo das futuras pesquisas sobre a deterioração “blown pack”, além do estudo de novos métodos de controle.

8. REFERÊNCIAS

ABEE, T.; KROCKEI, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**., Oxford, v. 28, n.2, p.169-185, 1996.

ANDERSEN, L. Preservation of meat products with a lactic acid bacteria culture: FloraCarn L-2. In: Proceeding of 41 st **International Congress of Meat Science and Technology**, v.2, p.303-304, San Antonio, TX., 1995.

ANONYMOUS. In: Subcommittee on microbiological criteria: committee on food protection: food and nutrition board national research council, An evaluation of the role of microbiological criteria for foods and food ingredients. **National Academy Press**, Washington, D.C., 1985.

ANUALPEC: anuário da pecuária brasileira 2005. **Pecuária de corte**. São Paulo: FNP, 2004. p.53-80.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION **Compendium of methods for the microbiological of foods**. 4th ed. Washington, 2001.

AXELSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S., von Wright, A. (Eds.), **Lactic Acid Bacteria**. Marcel Dekker, New York, p. 1-63, 1993.

AYMERICH, M.T. and HUGAS, M. Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. **Eurocarne**. v.8, n.72, p.39-49, 1998.

BAILEY, M.E.; ROURKE, T.J., GUTHEIL, R.A., WANG, C. Y., Undesirable flavours of meat. In: Charalambous G. (Eds.), **Off-Flavours in food and Beverages**. Elsevier, Oxford, p. 127-159, 1992.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science Technology** v. 6, p.341-346, 1995.

BEEBE, S. D.; VANDERZANT, C.; HANNA, M.O.; CARPENTER, Z.L.; SMITH, G.C. Effect of initial internal temperature and storage temperature on microbial-flora of vacuum packaged beef. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v.39, p.600–605, 1976.

BELL, R.G. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, p. 292–300, 1997.

BHADURI, S., BUCHANAN, R.L., PHILLIPS, J. Expanded response surface model for predicting the effects of temperatures, pH, sodium chloride contents and sodium nitrite concentrations on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. **Journal Applied Bacteriology**, v. 79, p. 163-170, 1995.

BJÖRKROTH, K. J., VANDAMME, P. & KORKEALA, H. J. Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3313–3319, 1998.

BLICKSTAD, E; MOLIN, G. Carbon dioxide as a controller of the spoilage flora of pork with special reference of temperature and sodium chloride. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.46, p.756-63, 1983.

BOEREMA, J. A., BRODA, D.M., BELL, R. G., PCR of psychrotolerant clostridia associated with deep tissue spoilage of vacuum-packed chilled meats. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p. 446-450, 2002.

BOEREMA, J.A., BRODA, D.M., BELL, R.G. Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures. **Letters in Applied Microbiology** v.36, p.406–411, 2003.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M.L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**. v.33, p.103-120, 1996.

BORGES, J. T. S; FREITAS A. S. Aplicação do sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) no processamento de carne bovina fresca. **Boletim de Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. Curitiba, v. 20, n.1, p.1-18, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa, Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília (DF), 10 jan. 2001, Seção 1, p. 45-54.

BRENNER, D.J. Introduction to the family *Enterobacteriaceae*, in the Prokaryotes. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W; SCHLEIFER, K.H. (Ed.). **A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. 2 ed. New York: Springer Verlag, 1992. p. 2673-95.

BRODA, D. M., DE LACY, K. M., BELL, R. G., BRAGGINS, T. J. & COOK, R. L. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. **International Journal of Food Microbiology** v.29, p.335-352, 1996.

BRODA, D.M. Prevalence of cold-tolerant clostridia associated with vacuum-packed beef and lamb stored at abusive and chill temperatures. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Hamilton, v.40, p.93-98, 1997.

BRODA, D.M.; MUSGRAVE, D.R.; BELL, R.G. Use of restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate strains of psychrophilic and psychrotrophic clostridia associated with “blown pack” spoilage of vacuum-packed meats. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n.1, p.107-116, 2000.

BRODA, D.M., BELL, R.G., BOEREMA, J.A. AND MUSGRAVE, D.R. The abattoir source of culturable psychrophilic *Clostridium* spp. causing ‘blown pack’ spoilage of vacuum-packed chilled venison. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.817–824, 2002.

BRODA, D.M., BOEREMA, J.A.; BELL, R.G.; PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing “blown pack” spoilage of vacuum-packed chilled meats. **Journal of Food Microbiology**, v.94, p. 515-522, 2003.

BRODA, D. M. The effect of peroxyacetic acid-based sanitizer, heat and ultrasonic waves on the survival of *Clostridium estertheticum* spores in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, Hamilton, New Zealand, v.45, p. 336–341, 2007.

CARVALHO, E.P. Textos acadêmicos: **Microbiologia de alimentos**. Lavras: UFLA. 128 p. 2001.

COLLINS, M.D.; RODRIGUES, U.M.; DAYNTY, R.H.; EDWARDS, R.A.; ROBERTS, T.A. Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packaged beef: description of *Clostridium estertheticum* spp. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.96, n.1, p.235-240, 1992.

CORREA, W. M.; CORREA, C. N. *Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos*. Botucatu : Editora Medsi, 1992.

COX, N. A., and MERCURI, A. J. Comparison of two minikits (API and R-B) for identification of *Enterobacteriaceae* isolated from poultry and meat products. **Journal of Food Protection**, v.41, p.107-110, 1978.

CUDJOE, K.S. and KAPPERUD, G. The effect of lactic acid sprays on *Campylobacter jejuni* inoculated onto poultry carcasses. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.32, p.491-498, 1991.

DAINTY, R.H; EDWARDS, R.A; HIBBARD, C.M. The relationship of bacterial numbers and types to diamine concentration in fresh and aerobically stored beef, pork and lamb. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 777-788. 1983.

DAINTY, R. H.; EDWARDS, R.A.; HIBBARD, C.M.; RAMANTANIS, S.V. Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packed beef. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 1, p.117–123, 1986.

DAINTY, R. H.; EDWARDS, R. A.; HIBBARD C. M. Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* spp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.49, n.4, p. 473-486, 1989.

DAINTY, R.H.; MACKEY, B.M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.73, p. 1035-1145, 1992.

DAINTY, R. H. Chemical/biochemical detection of spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p.19-33, 1996.

DALGAARD, P. **Evaluation and prediction of microbial fish spoilage**. 1993. Thesis (PhD) - Royal veterinary and Agricultural University, Copenhagen, 1993.

DICKSON, J. S.; ANDERSON, M. E. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: A review. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 2, p. 133-140, 1992.

DIXON, Z.R.; ACUFF, G.R.; LUCIA, L.M., VANDERZANT, C.;MORGAN, J.B.;MAY, S.G. ; SAVELL, J.W. Effect of degree of sanitation from slaughter through fabrication on the microbiological and sensory characteristics of beef. **Journal of Food Protection**, v.54, p. 200-207, 1991.

DOYLE, M.P. Foodborne bacterial pathogens. In: HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A. et al. **Bergeys manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Maryland: Williams & Wilkins 1994.

EGAN, A. F. and SHAY, B. J. Significance of lactobacilli and film permeability in the spoilage of vacuum-packaged beef. **Journal of Food Science** .v. 47, p.1119-1126, 1982.

ERCOLINE, D. RUSSO, F., TORRIERI, E., MAIS, P., VILLANI, F. Changes in spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packing conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.07, p. 4663-4671, 2006.

EUSTACE, I. J. Food packaging: Selection of materials and systems. **Food Australia**. V. 41, p.884-885, 1989.

FARMER, J. J..*Enterobacteriaceae*: introduction and identification, p. 636–653. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), **Manual of clinical microbiology**, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C. 2003.

FLISS. I.; SIMARD, R. E.; ETTRIKI, A. Comparison of three sampling techniques for microbiological analysis of meat surfaces. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 249-

252. 1991.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. 182 p.

FU, A. H., MOLINS, R.A.; SEBRANEK, J. G. Storage quality characteristics of beef rib eye steaks packaged in modified atmospheres. **Journal of Food Science**, v.57, n.2, p. 283-287, 1992.

FUNG, D.Y.C. Rapid methods and automation in food microbiology: a review. **Food Reviews International**, New York, p. 357-375, 1994.

GAMAGE, S. D., J. B. LUCHANSKY, and S. C. INGRAM. Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Hafnia alvei* isolated from chub-packed and retail ground beef. **Letters in Applied Microbiology**, v.26; p.105–109, 1998.

GILL, C.O.; NEWTON, K.G. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. **Meat Science**, v. 2, p.207-217, 1978.

GILL, C.O. Intrinsic bacteria in meat. **Journal in Applied Bacteriology**, Oxford, v.47, p.367–378, 1979.

GILL, C.O. Extending the storage life of raw chilled meats. **Meat Science**, v.43, p.S99-S109, 1996.

GILL, J. I. **Manual de Inspeção Sanitária de Carnes**. 2 ed. Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000, 485p.

GLEDEL, J. Las salmonelas. In: BOURGEOIS, C. M.; MESCLA, J. F.; ZUCCA, J. **Microbiología alimentaria**. Espanha: Acribia, 1994. 676 p. cap. 1, p. 53-66.

GRAM, L., L. RAVN, M. RASCH, J. B. BRUHN, A. B. CHRISTENSEN, AND M. GIVSKOV. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p.79–97, 2002.

GRAU, F.H. Role of pH, lactate, and anaerobiosis in controlling the growth of some fermentative Gram-negative bacteria on beef, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.42, p. 1043- 50, 1981.

GUERRERO, I.; TAYLOR, A. J. Meat surface descontamination using lactic acid from chemical and microbial sources. *Lebensm. – Wiss. Technol.* v.27 , p.201-209, 1994.

HANNA, M.O; SMITH, G.C.; HALL, L.C.; VANDERZANT, C. Role of *hafnia alvei* and *Lactobacillus* species in the spoilage of vacuum-packaged striploin steaks. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 42, n.7, p. 569-571, 1979.

HAYES, P.R. **Food Microbiology and Hygiene**. Elsevier: London, 1985. p. 80-139.

HESS, E. Hygiene during meat production, p. 3-8. In: B. C. Hobbs and J. H. B. Christian (ed.), *The microbiological safety of food*. Academic Press, Inc., New York. 1973.

HELPS, C.R.; HARBOUR, D.A.; CORRY, J.E. PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vaccum-packed chill-stored beef. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.52, p.57-65, 1999.

HILARIO, E.; BUCKLEY, T. R; YOUNG, J. M. Improved resolution of the 4670 ERCOLINI et al. **Applied and Environmental Microbiology** phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of *atpD*, *carA*, *recA* and 16S rDNA. *Antonie Leeuwenhoek* v. 86, p. 51–64, 2004.

HOLLEY, R.A.; GILL, C.O. Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 2005, São Pedro. **Anais...**São Pedro:CTC, 2005.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9. ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HOOD, D.E.; MEAD, G.C. Modified atmosphere storage of fresh meat and poultry. In: PARRY, R.T. (Ed.). **Principles and applications of modified atmosphere packaging of food**. London: Blackie Academic & Professional, 1993. p.269-298.

HOVE, H.; NORGAARD, H.; MORTENSEN, P. B. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. **European Journal of Clinical Nutrition**, n.53, p.339-350, 1999.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p.S139-S150, 1998.

HUIS IN'T VELD, J.H.J.; MULDER, R.W.A.W.; SNIJDERS, J.M.A. Impact of animal husbandry and slaughter technologies on microbial contamination of meat: monitoring and control. **Meat Science**, Barking, v.36, p.123-154, 1994.

HUIS IN'T VELD, J.H.J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**. v. 33, p. 1-18, 1996.

HUIS IN'T VELD, J.H.J.; TEN BRINK, B.; van der VOSSSEN, J.M.B.M. Potential for use of bacteriocins in the preservation of foods. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, 1996.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración**. 2. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2000. p.147-150.

JACKSON, T. C., ACUFF, G. R.; DICKSON, J.S. Meat, poultry, and seafood, p. 83–100. In M. P. Doyle and T. J. Beuchat (ed.), **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. ASM Press, Washington, D.C., 2001.

JAY, J. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1992. 804 pp.

JAY, J. M.; VILAI, J. P. ; HUGHES, M. E. Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5-7°C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p.105–111, 2003.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. Springer Science & Business Media, Inc., New York, N.Y. 790 pp., 2005.

JAKABI, M. J. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* spp. ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. *Revista Instituto Adolf Lutz*, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 47-51, 1999.

JANDA, J. M. and ABBOTT, S. L. The Genus *Hafnia*: from Soup to Nuts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 12–18, 2006.

JONES, D.T.; WOODS, D.R. Acetone-butanol fermentation revisited. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.50, p. 484-524, 1986.

JONES, R. J., PHILLIPS, D.M. A HACCP-based process control plan using predictive microbiology. In: Cresson, e. (Eds.), *Predictive Microbiology Applied to Chilled Food Preservation – Proceeding of Refrigeration Science and Technology*, Conference

n°1997/2 of Commission C2,Quimper (France), Office for Official Publication of the European Communities, Luxembourg, p. 175-194, ISBN 92-828-5750-6, 1997.

JONES, R. J. Observations on the sucession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.273-282, 2004.

KALCHAYANAND, N., RAY, B. & JOHNSON, M. C. Spoilage of vacuum-packaged beef by *Clostridium*. **Journal of Food Protection**, v.52, p.424-426, 1989.

KALCHAYANAND, N., RAY, B. & FIELD, R. A. Characteristics of psychrotrophic *Clostridium laramie* causing spoilage of vacuum-packaged refrigerated fresh and roasted beef. **Journal of Food Protection**, v.56, p.13-17, 1993.

KALINOWSKI, R.M; TOMPIKIN, R.B. Psychrotrofic clostridia causing spoilage in cooked meat and poultry products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, p. 766-772, 1999.

KIM, W.J. Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservative. **Food Reviews International**, New York, v. 9, p.299-313, 1993.

KOCHHAR, S.P. Oxidative pathways to the formation of off-flavours.In: Saxby, M.J. (Ed.) Food Taints and Off-Flavours.Blackie Academic and Profissional, Glasgow, p. 168-225, 1996.

KORKEALA, H. J.; BJORKROTH, K.J. Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. **Journal of Food Protection** v.60, p.724-731, 1997.

KOTZEKIDOU, P. and BLOUKAS, J. G. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelf-life of sliced-packed cooked ham. **Meat Science**, v.42, p.333-345, 1996.

LABADIE, J. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. **Meat Science**, v. 52, p.299–305, 1999.

LAWSON, P.; DAINTY, R. H.; KRISTIANSEN, N.; BERG, J.; COLLINS, M. D. Characterisation of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* spp. Nov. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.19, p. 153-157, 1994.

LEISNER, J, GREER, G., STILES, M.E. Control of beef spoilage by a sulphide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum* UAL 187 during anaerobic storage at 2°C. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2610-2614, 1996.

LEISNER, J.J., VANCANNEYT, M., GORIS, J., CHRISTENSEN, H. and RUSUL G.: Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p.19-24, 2000.

LEE, K. T.; YOON, C.S. Quality changes and shelf life of imported vacuum-packaged beef chuck during storage at 0°C. **Meat Science**, Barking, v.59, p. 71–77, 2001.

LINDBERG, A.M., LJUNGH, Å. S., AHRNE, LOFDAHL, S. and MOLIN. G. *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurized milk or cream and the presence of toxin encoding genes. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p. 11–17, 1998.

LYHS, U. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products.2002.81f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finlândia.

MAAS, M. R., GLASS, K.A. and DOYLE, M.P. Sodium lactate delays toxin production by *Clostridium botulinum* in cook-in-bag turkey products. **Applied and Environmental Microbiology**. v.55, n.9, p.2226-2229, 1989.

MCCABE, B. J. Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimes: a review. **Journal of American Diet Association**, v.86, .1059-1064, 1986.

MACFADIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1976. 312p.

MCEVOY, J.M.; DOHERTY, A.M.; FINNERTY, M. The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.30, p.390–395, 2000.

MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J. et al. Food microorganisms - health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **Bulletin of International Dairy Federation**, n.377, p.4-9, 2003.

MOSSEL, D.A.A.; CORRY, J.E.L.; STRUIJK, C.B.; BAIRD, R.M. **Essentials of the microbiology of Foods**: a textbook for advanced studies. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. p. 175-214.

MURRAY, P., KOBAYASHI, G., PFALLER, M. et al. **Medical Microbiology**. EUA: Mosby-Year Book, 1994. 775 p.

NEWTON, K. G., HARRISON, J. C. L. and SMITH, K. M. Coliforms from hides and meat. **Applied and Environmental Microbiology**.v.33, p.199-200, 1977.

NEWTON, K. G.; GILL, C. O. Development of anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.44, p.91–95, 1978.

NG, L.-K., and STILES, M. E. *Enterobacteriaceae* in ground meats. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p.1574-1582, 1978.

NORTJÉ, G. L.; NAUDÉ, T. Microbiology of beef carcass surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 5, p. 355-358, 1981.

NOTTINGHAM, P. M. Microbiology of carcass meats. In: BROWN, M. H. **Meat microbiology**, London: Applied Science, 1982. p.13-65.

NOVAK, S. & YUAN, J.T.C. Increased inactivation of ozone-treated *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores on fabricated beef surfaces using mild heat. **Journal of Food Protection**, v.67, p.342–346, 2004.

NYCHAS, G. J. E., DROSINOS, E. and BOARD, R. G. Chemical changes in stored meat . In: **The Microbiology of Meat and Poultry** ed. Board, R. G. and Davies, A. R. p.288-326. London: Blackie Academic and Professional. 1998.

NYCHAS, G. J. E.; DROSINOS, E. H. Meat and poultry spoilage, *In* R. K. Robinson, C. A. Batt, and P. D. Patel (ed.), Encyclopedia of food microbiology. **Academic Press**, San Diego, California, p. 1253–1259, 1999.

PARDI, M. C. et al. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. v I. Ciência e Higiene da Carne. Tecnologia da sua obtenção e Transformação. Universidade Federal Fluminense. EDUFF- Editora Universitária, 2001. 623 p.

PENNEY, N.; HAGYARD, C.J.; BELL, R.G. Extension of shelf life of chilled sliced roast beef by carbon dioxide packaging. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.28, n.2, p. 181-91, 1993.

RAUECKER, U. N. *Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes* em carne resfriada, carcaças, equipamentos e ambiente de matadouros-frigoríficos de diferentes estados brasileiros. 2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

RIDDEL, J.; KORKEALA H. Minimum growth temperatures of *Hafnia alvei* and other *Enterobacteriaceae* isolated from refrigerated meat determined with a temperature gradient incubator. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, p.287–292, 1997.

ROBERTS, T. A. & MEAD, G. C. Involvement of intestinal anaerobes in the spoilage of red meats, poultry and fish. In: **Anaerobic Bacteria in Habitats Other Than Man**, p. 333-349. Edited by E. M. Barnes & G. C. Mead. Oxford: Blackwell Scientific, 1986.

ROSS, H. E. *Clostridium putrefaciens*: a neglected anaerobe. **Journal of Applied Bacteriology**, v.28, p.49-51, 1965.

SAKAMOTO, K.; MARGOLLES, A.; VAN VEEN, H. W.; KONINGS, W. N. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.5371-5375, 2001.

SAMELIS, J.; GEORGIADOU, K. G. The microbial association of Greek taverna sausage stored at 4 and 10 degrees C in air, vacuum or 100% carbon dioxide, and its spoilage potential. **Journal of Applied Bacteriology**. v.88, p.58–68, 2000.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. K. Lactic-acid bacteria on vacuum packaged meat their influence on shelf-life. **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v.67, p. 1244–1248, 1987.

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, p.227, 2000.

SIMPSON, W. J.; FERNANDEZ, J.L. Selection of beer spoilage lactic acid bacteria and induction of their ability to grow in beer. **Letters in Applied Microbiology**, v.14, p.13–16, 1992.

SMITH, J. S., KENNEY, P.B., KASTNER, C. L.; TAYLOR, S.L. Biogenic amines in vacuum packaged fresh beef. **Journal of Food Protection**, v.56, p.497-500, 1993.

SPRING, S., MERKHOFFER, B., WEISS, N., KROPPESTEDT, R. M., HIPPE, H., STACKEBRANDT. Characterization of novel psychrophilic clostridia from Antarctic microbial meat: description of *Clostridium frigoris* spp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* spp. nov., *Clostridium bowmanii* spp. nov., and *Clostridium psychrophilum* spp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1019-1029, 2003.

STILES, M. E. and NG, L.K. *Enterobacteriaceae* Associated with Meats and Meat Handling. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, n.4, p.867-872, 1981.

STILES, M.E.; HASTINGS. J.W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. **Trends Food Science Technology**, Cambridge, v.2, p.247-251, 1991.

STILES, M. E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 70, p. 331-345, 1996.

STRATTON, J. E., HUTKINS, R.W. ; TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. **Journal of Food Protection**, v.54, p.460-470, 1991.

SULLIVAN, E.A. ; SHULMAN, K. I. Diet and monoamine oxidase inhibitors: a re-examination. **Canadian Journal of Psychiatry**, v.29, p.707-711, 1984.

SUTHERLAND, J. P.; PATTERSON, J.T.; MURRAY, J.G. Changes in microbiology of vacuum packaged beef. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 39, p. 227–237, 1975.

TOMPKIN, R. B.; McNAMARA, A. M.; ACUFF, G. R. Meat and Poultry Products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods*. 4 ed. Washington APHA, 2001. 676 p. cap. 45, p. 463-471.

TRÜPER, H. G. & DE' CLARI, L. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) ` in apposition'. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.908-909, 1997.

TSIGARIDA, E., SKANDAMIS, P. and NYCHAS, G. J. E. Behavior of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.901-909, 2000.

TSIGARIDA, E. and NYCHAS, G. J. E. Ecophysiological attributes of a *Lactobacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.696-705, 2001.

TORNADIJO, M.E.; GARCÍA, M.C.; FRESNO, J.M.; CARBALLO, J. Study of *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simo'n cheese. **Food Microbiology**, London, v.18, p. 499–509, 2001.

Van DER VOSSSEN, J.; HOFSTRA. H. DNA based identification systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, n.1, v. 33, p.35-49, 1996.

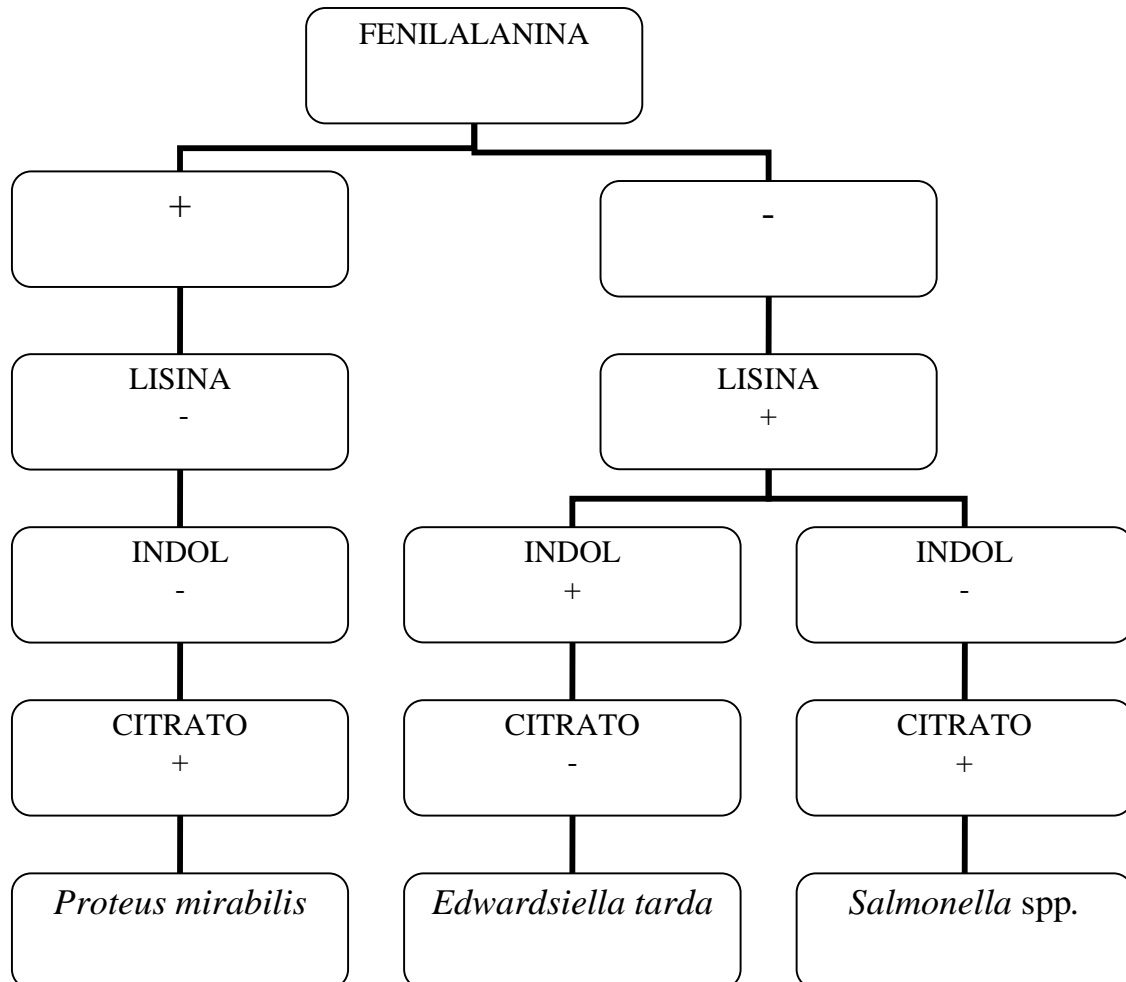
Van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P.W.M.; HAAS, P.E.W.; SOLL, E.R.; van EMBDEN, J.D.A. Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29; p. 2578-86, 1991.

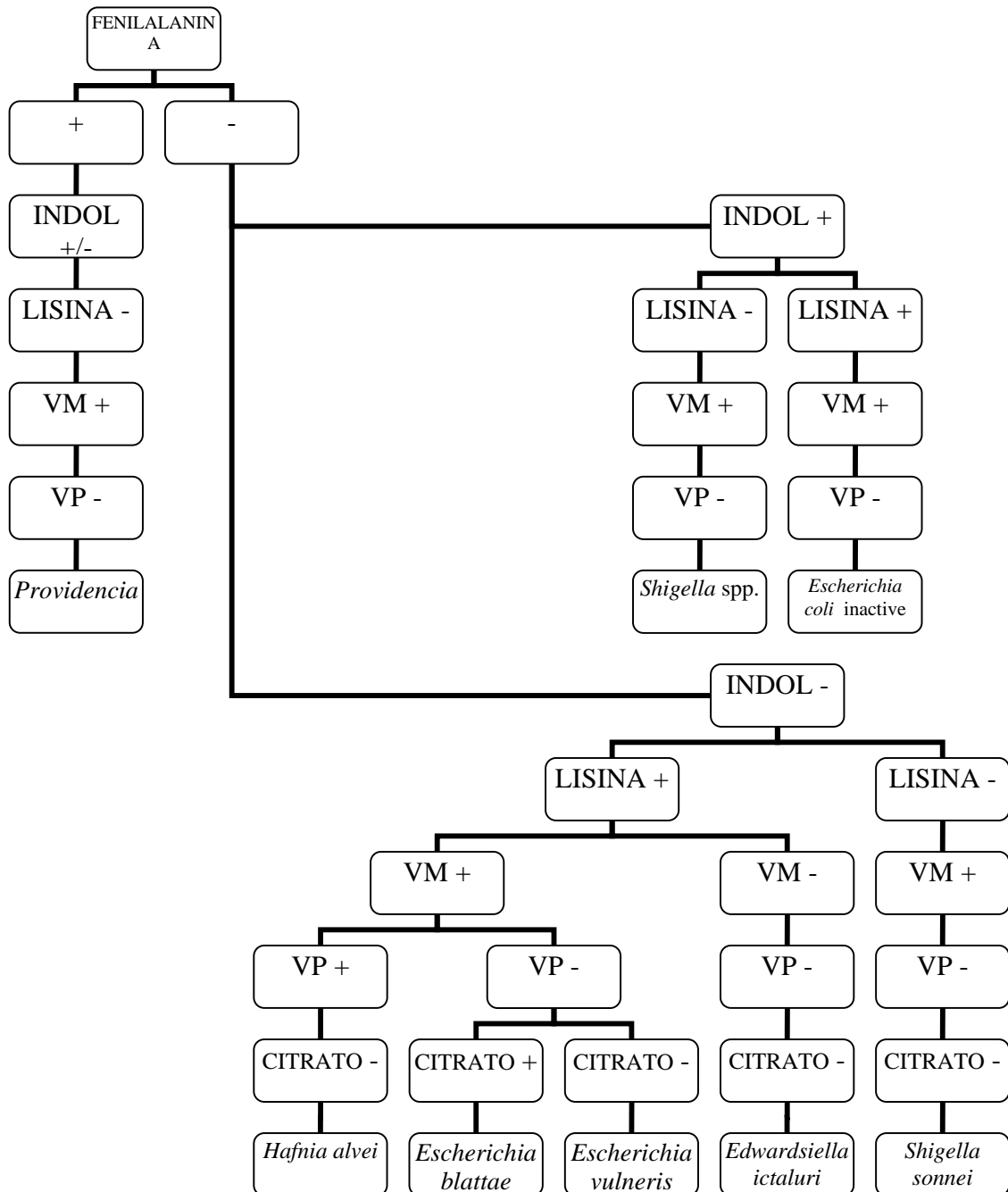
YOST, C.K.; NATTRESS, F.M. Molecular typing techniques to characterize the development of a LAB community on vacuum-packaged beef. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, p.97–105, 2002.

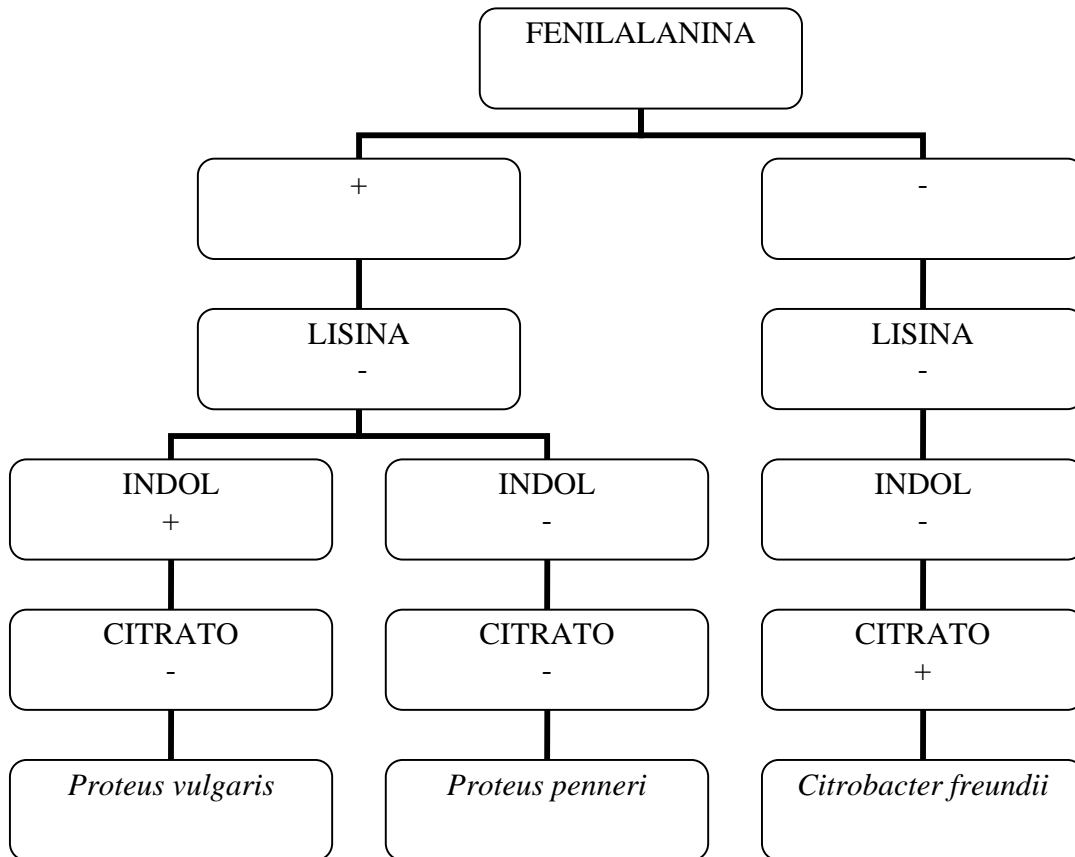
YOUNG, K.M. and FOEGEDING, P.M. Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. **Journal of Applied Bacteriology** v.74, n. 5, p.515-520, 1993.

ZAGORY, D. Selection of packaging materials for minimally processed foods: technical considerations. In: Food Preservations by Moisture Control, Fundamentals and Applications. Part VI: Advances in Minimally Processed Food Packaging ed. Barbosa-Cánovas, G.V. and Welti-Chanes, J. p. 793-806. Lancaster- Basel: Technomic Publishing Co., 1995.

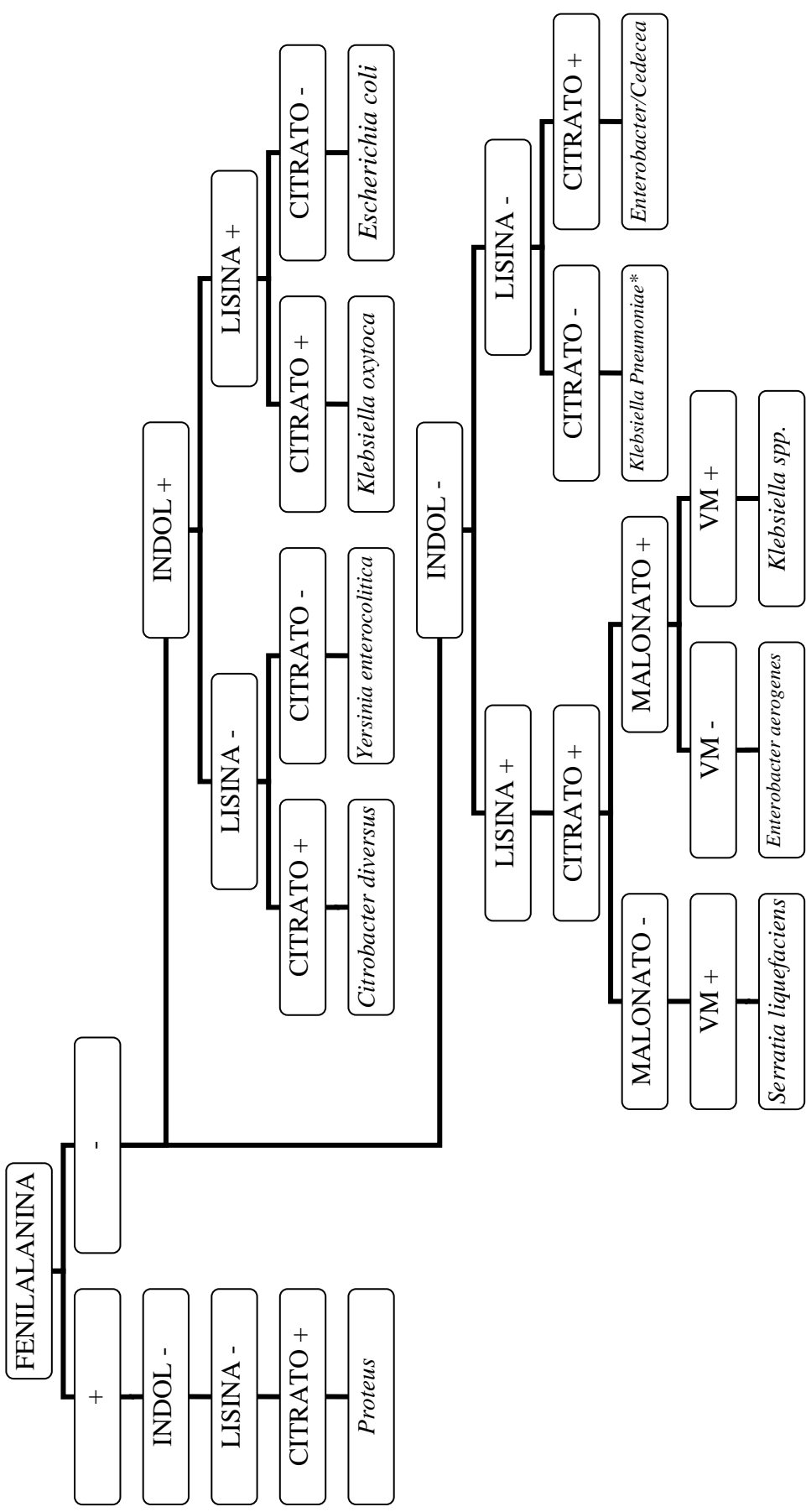
ANEXOS

ANEXO 1, GRUPO I (TSI→ SKFA com H₂S)

ANEXO 2, GRUPO II (TSI → SKFA sem H₂S)

ANEXO 3, GRUPO III (TSI→ SAFA com H₂S)

ANEXO 4, GRUPO IV (TSI → SAFA semH₂S)



* *Klebsiella pneumoniae* Subsp. *rhinosclerotomatis*