

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Determinação da comunidade microbiana pelo método molecular
T-RFLP em carnes refrigeradas embaladas a vácuo**

Anna Cristina Zari Fornazari

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2011**

Anna Cristina Zari Fornazari
Médica Veterinária

Determinação da comunidade microbiana pelo método molecular T-RFLP em carnes refrigeradas embaladas a vácuo

Orientadora:

Prof^a. Dra. **CARMEN JOSEFINA CONTRERAS CASTILLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Fornazari, Anna Cristina Zari

Determinação da comunidade microbiana pelo método molecular T-RFLP em
carnes refrigeradas embaladas a vácuo / Anna Cristina Zari Fornazari. - -
Piracicaba, 2011.

83 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Bactérias lácticas 2. Carnes 3. Clostridium 4. Embalagens de alimentos
5. Enterobacteriaceae 6. Refrigeração I. Título

CDD 664.9092
F727d

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

À Deus, pelo cuidado com minha vida e por me oferecer sempre mais do que preciso e mereço.
Aos meus pais, Valderi Zari e Ivanilde Lopes Zari, pelo amor, ensinamento e motivação durante toda a minha existência.
Ao meu esposo Rodrigo Fornazari pela compreensão, carinho e paciência.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força e capacidade para superar os obstáculos, me orientar nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À minha família, pai, mãe e Arthur, os quais amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao meu amado marido que com muito carinho sempre esteve me apoiando e me ajudando durante todo o trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Carmen Josefina Contreras Castillo, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência, por ser exemplo de profissional e de mulher. Minha eterna gratidão, pela dedicação, apoio e amizade.

Ao Laboratório de Processamento e Qualidade de Carnes e as antigas e atuais *las carmencetes* Juliana, Priscila, Ana Paula, Thalita, Traks, Sabrina, Massafra, Tropo, Karpada, Fernanda e ao *Carmencito* Márcio, pela ajuda, companheirismo e momentos divertidos que passamos juntos. Especialmente para Lucy, que acreditou, ajudou e me apoiou em todos os momentos, me ensinando a crescer como pessoa e pesquisadora, o que tornou possível a realização deste trabalho.

À Roberta Teresa Rizzo Benatto, pelo apoio, carinho e pelas risadas e momentos alegres que passamos no decorrer desses anos.

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai, por toda a ajuda na realização das análises moleculares.

À Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira por sua ajuda na realização das análises microbiológicas e pelas correções da dissertação.

À Dirce do laboratório de Higiene da Unicamp, pela contribuição e paciência nas análises moleculares.

À Profa. Sandra Helena da Cruz, Prof. Ernani Porto, Maria Lucila Hernández-Macedo, Giovana Verginia Barancelli e Renata Bromberg pela imensa contribuição na correção da dissertação.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo e pelo auxílio financeiro concedido para realização deste trabalho.

À todos os funcionários e estagiários do laboratório de microbiologia do CCQA-ITAL pela colaboração durante as análises microbiológicas.

À todos os funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, em especial à Gislaine Martins Nóbilo, Regina Célia Cardoso Marafon, Fábio Benedito Rodrigues, Rubens César Pereira, por todo apoio e paciência.

Às amigas Flávia e Fabiola, pela amizade verdadeira, de perto ou de longe, pelo apoio, conselhos e risadas.

E, por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 Revisão bibliográfica.....	15
2.1.1 Posição do Brasil no mercado mundial de carnes	15
2.2 Deterioração da carne bovina refrigerada.....	18
2.3 Deterioração do tipo <i>blown pack</i>	21
2.4 Fontes de contaminação da carne bovina	24
2.5 Microrganismos relacionados com a deterioração tipo <i>blown pack</i>	25
2.5.1 Clostrídios psicrófilos.....	25
2.5.2 Enterobactérias	26
2.5.3 Bactérias lácticas	27
2.6 Alternativas para o controle da deterioração <i>blown pack</i>	28
2.7 Técnicas moleculares utilizadas para detecção de microrganismos em carnes embaladas a vácuo.....	31
2.7.1 “Polymerase chain reaction” ou Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	31
2.7.2 “Restriction fragment length polymorphism” (PCR-RFLP) ou Polimorfismo do Tamanho de Fragmento de Restrição	32
2.7.3 “Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism” ou Polimorfismo do Tamanho de Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP).....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Amostras.....	35
3.1.1 Análise das amostras de carne bovina resfriadas e embaladas à vácuo pela técnica de T-RFLP.....	37
3.1.2 Linhagens padrão para análises de T-RFLP	39
3.1.3 Extração de DNA total	39
3.1.4 Amplificação dos genes 16S rRNA por PCR e análise dos T-RFLPs.....	40
3.1.5 Purificação e digestão.....	40
3.1.6 Precipitação	41
3.1.7 Análise dos fragmentos de restrição terminais (T-RFs).....	41
3.2 Análises de microbiologia convencional.....	42
3.2.1 Preparo das diluições das amostras para as contagens de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i>	44
3.2.2 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	44
3.2.3 Provas confirmatórias e identificação.....	44
3.2.4 Análises estatísticas	45

3.3 Metodologia de isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i>	45
3.3.1 Sistemas de anaerobiose.....	46
3.3.2 Isolamento de microrganismos <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> para análise por PCR.	47
3.3.3 Caracterização e identificação dos isolados	48
3.3.4 Identificação das colônias pela técnica de PCR.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Análises dos dados de T-RFLP	51
4.1.1 Análises dos resultados de T-RFLP	52
4.2 Contagem de enterobactérias pelo método de microbiologia convencional.....	62
4.2.1 Identificação de enterobactérias pelo sistema API 20E	63
4.3 Comparação entre as técnicas de T-RFLP e de microbiologia convencional para detecção de enterobactérias.....	65
4.4 Identificação de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> pela técnica de PCR	68
5 Conclusões	71
REFERÊNCIAS.....	73

RESUMO

Determinação da comunidade microbiana pelo método molecular T-RFLP em carnes refrigeradas embaladas a vácuo

O estufamento de embalagens a vácuo de carnes refrigeradas, também conhecido como *blown pack*, é atribuído a bactérias psicrófilas e psicrotróficas, dentre as quais fazem parte algumas espécies de clostrídios, enterobactérias e bactérias lácticas. A capacidade desses microrganismos crescer em temperaturas de refrigeração adequadas torna um desafio o seu controle pela indústria. O Brasil é um dos grandes produtores de carne bovina no mundo e apesar da importância que a indústria de carne representa para o país, existem poucos estudos sobre as possíveis causas da deterioração do tipo *blown pack*. A importância deste trabalho fundamenta-se na escassez de pesquisas sobre esse problema que afeta a indústria de carne. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a presença dos principais microrganismos envolvidos na deterioração tipo *blown pack*, com ênfase em clostrídios, enterobactérias e bactérias lácticas. Assim, o método Terminal- Restriction Fragment Length Polymorphism, disponível no laboratório de Biologia Molecular do CENA-USP, foi empregado por permitir um diagnóstico rápido e preciso para detecção de microrganismos. Foram analisadas 15 amostras de carne bovinas refrigeradas, embaladas a vácuo e estufadas, provenientes de frigoríficos dos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás. Os cortes utilizados para as análises foram contrafilé, músculo, alcatra, cupim, picanha e filé de costela. As amostras apresentavam características de deterioração tipo *blown pack* dentro da data de validade, com períodos armazenamento variando de 30 a 120 dias. Foram identificadas as espécies *Clostridium algidicarnis*, *Clostridium gasigenes*, *Clostridium putrefaciens*, *Clostridium frigidicarnis*, *Lactobacillus sakei*, *Hafnia alvei* e *Serratia liquefaciens* pela técnica T-RFLP, que se mostrou uma excelente ferramenta de identificação microbiana nas amostras de carne. Devido à alta prevalência de enterobactérias nas amostras de carnes detectadas pela técnica de T-RFLP, foram realizadas análises convencionais com isolamento e identificação de enterobactérias, a fim de confirmar a presença destes microrganismos viáveis e cultiváveis nas amostras. As espécies de enterobactérias cultivadas e identificadas foram *H. alvei*, *Ser. liquefaciens*, *Citrobacter braakii*, *Pantoea sp* e *Yersinia enterocolitica*, sendo esta última potencialmente patogênica e de interesse em saúde pública. Observou-se que a *H. alvei* foi a espécie predominante nas amostras avaliadas, tanto pela técnica de T-RFLP como pelas análises microbiológicas convencionais. Com o objetivo de complementar os resultados, foram realizadas análises convencionais de cultivo visando o isolamento de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* nas amostras de carne. A técnica de PCR foi empregada com a finalidade de identificação dos isolados obtidos.

Palavras-chave: *Blown pack*; T-RFLP; Clostrídios; Enterobactérias; Bactérias lácticas

ABSTRACT

Determination of microbial community by molecular method T-RFLP in vacuum-packed chilled meats

The distension of the packaging of vacuum packed chilled meat, also known as blown pack, is assigned to psychrophilic and psychrotrophic bacteria, among which are part some clostridium, enterobacteria and lactic bacteria. The ability of these microorganisms to grow at refrigeration temperatures makes it an appropriate challenge its control by the industry. Brazil is a major producer of beef in the world and despite the importance of the beef industry represents for the country, there are few studies on the possible causes of deterioration of blown pack type. The importance of this work is based on the dearth of research on this problem that affects the meat industry. The aim of this study was to evaluate the presence of the main microorganisms involved in the deterioration blown pack type, with emphasis on clostridia, enterobacteria and lactic bacteria. Thus, the method-Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, available at Molecular biology laboratory of CENA-USP, was used to allow a rapid and accurate diagnosis for the detection of microorganisms. We analyzed 15 samples of beef chilled, vacuum packed with abundant gas production, refrigerators from the states of São Paulo, Mato Grosso do Sul and Goiás cuts used for the analysis were striploin, shin, rump, hump, cop of rump and cube roll. The samples showing signs of deterioration such blown pack within the shelf life, with storage periods ranging from 30 to 120 days. Were identified *Clostridium algidicarnis*, *Clostridium gasigenes*, *Clostridium putrefaciens*, *Clostridium frigidicarnis*, *Lactobacillus sakei*, *Hafnia alvei* and *Serratia liquefaciens* by T-RFLP technique, which proved an excellent tool for microbial identification in meat samples. The high prevalence of enterobacteria in samples of meat detected by the technique of T-RFLP analysis was performed with conventional isolation and identification of enterobacteria, in order to confirm the presence of viable and culturable microorganisms in the samples. The species of enterobacteria were identified and cultivated *H. alvei*, *Ser. liquefaciens*, *Citrobacter braakii*, *Pantoea* sp. and *Yersinia enterocolitica*, the latter being potentially pathogenic and interest in public health. It was observed that *H. alvei* was the predominant species in the samples evaluated by both the T-RFLP technique and by conventional microbiological tests. In order to complement the results were analyzed conventional cultivation and isolation of *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* in meat samples. The PCR technique was employed for the purpose of identification of isolates.

Keywords: Blown pack, T-RFLP, Clostridia, Enterobacteria, Lactic bacteria

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa hoje posição de destaque no mercado mundial de carnes, porém para permanecer nessa posição são necessários cuidados. A redução de vida útil decorrente de alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas dos produtos de origem animal tem sido responsável pela dificuldade de uma maior expansão neste segmento de mercado (BORGES; FREITAS, 2002).

Com o objetivo de controlar contaminações por microrganismos na carne bovina, as indústrias investem em boas práticas de fabricação (BPF) e na manutenção de elevados padrões de higiene e refrigeração. Também utilizam embalagens que agem como barreira ao oxigênio e ao dióxido de carbono, além de exclusão de músculos com valores de pH superiores a 6,0, o que permite que a carne possa ter uma vida útil de 10 semanas ou mais (SHERIDAN; SHERINGTON, 1982).

Em 1989 foi observado um tipo de deterioração em carnes embaladas a vácuo, denominada de *blown pack*. O problema surgiu nos EUA (KALCHAYANAND et al., 1989) e, posteriormente, no Reino Unido (DAINTY et al., 1989), Nova Zelândia (1996) Irlanda (2000) e Brasil (BROMBERG et al., 2002, 2003; BUENO et al., 2008), causando perdas importantes para as indústrias de carnes.

Inicialmente, espécies do gênero *Clostridium*, como *C. estertheticum*, *C. gasigenes*, *C. algidicarnis*, *C. putrefaciens* e *C. frigidicarnis* foram apontadas como causadoras desse tipo de deterioração (DAINTY et al., 1989; BRODA et al., 1996; BRODA et al., 1999; BRODA et al., 2000 e BRODA et al., 2002). Além dos clostrídios existem também outros grupos de bactérias que estão presentes na carne bovina embalada a vácuo, entre eles as enterobactérias e bactérias lácticas (YOST; NATTRESS, 2002; FELIPE, 2008).

Com intuito de se obter resultados confiáveis e rápidos, a utilização das técnicas moleculares para detecção, identificação e caracterização de bactérias deteriorantes e patogênicas em alimentos se tornou uma alternativa aos métodos microbiológicos convencionais. De acordo com Marin et al. (2006) os métodos tradicionais de detecção de microrganismos em alimentos, embora confiáveis e eficientes, necessitam de vários dias ou até mesmo semanas para obtenção dos resultados.

Avanços nos estudos de biologia molecular propiciaram o desenvolvimento e emprego de vários métodos moleculares (DESTRO, 1995), baseados principalmente na Reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a identificação de microrganismos em baixas populações em curto período de tempo (ELEY, 1993). Outro exemplo de metodologia

utilizada na identificação de microrganismos é o T-RFLP (Terminal- Restriction Fragment Length Polymorphism).

T-RFLP utiliza métodos rápidos de extração de DNA de comunidades de microrganismos, amplificação do gene 16S RNA por PCR, digestão com enzimas de restrição, e detecção dos fragmentos de restrição terminal em sequenciador automático para determinar os grupos de bactérias presentes nas amostras estudadas.

A técnica de T-RFLP foi utilizada em estudos envolvendo a identificação de comunidades bacterianas em alimentos, pela caracterização de bactérias psicrófilas em carne embalada com atmosfera modificada (NIEMINEM et al., 2011), além de identificação de comunidade microbiana em peixes comestíveis (TANAKA et al., 2010). Essa técnica é considerada uma poderosa ferramenta na análise de alterações da microbiota de maneira geral, sendo também uma alternativa para determinação da diversidade microbiana ambiental e de alimentos (TIEDJE et al., 1999).

Além das técnicas moleculares, as análises microbiológicas convencionais trazem expressiva contribuição para a detecção de microrganismos presentes em alimentos. Um exemplo é o sistema API 20E, que é padronizado para a identificação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos de crescimento não fastidioso e baseia-se em testes bioquímicos convencionais. O sistema API 20E tem sido utilizado em diversos estudos, como ferramenta eficiente na identificação de microrganismos e de ampla aplicabilidade como instrumento diagnóstico (NUCERA et al., 2006; ZAMAN et al., 2010; BAI et al., 2010).

Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram:

- Detectar microrganismos psicrófilos e psicrófilos tais como algumas espécies de clostrídios, enterobactérias e bactérias ácido-lácticas, em amostras de carnes bovinas refrigeradas embaladas a vácuo com deterioração tipo *blown pack* pela técnica de T-RFLP.
- Nas amostras com deterioração tipo *blown pack*, isolar e identificar espécies de enterobactérias, por análises microbiológicas convencionais utilizando o sistema API 20E para identificação.
- Pesquisar, por técnicas de cultivo convencional, a presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* nas amostras de carne com deterioração tipo *blown pack* e utilizar, para a identificação dos isolados, a técnica de PCR.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Posição do Brasil no mercado mundial de carnes

A carne bovina é uma *commoditie* heterogênea, pois é diferenciada por características que dependem da raça do animal, da tecnologia de produção, da idade de abate, do corte e de resfriamento ou congelamento, se for o caso. Esses aspectos são determinantes dos preços pagos pelo produto no mercado internacional, embora estes também sejam afetados por políticas de importação e exportação de cada país, incluindo padrões sanitários, regulamentos, tarifas, subsídios e acordos inter-governamentais (EKBOIR et al., 2002).

O Brasil, com potencialidades naturais e com muito esforço empresarial, tem demonstrado ao mundo que é capaz de contribuir com a economia mundial e, principalmente, com o mercado de carnes, posicionando-se atualmente como o maior exportador (OLIVO, 2008), conforme demonstra a Tabela 1.

Tabela 1 – Exportações mundiais de carne bovina (mil toneladas equivalente carcaça)

Países	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Brasil *	789	929	1.208	1.630	1.857	2.100	2.194	1.829	1.611	1.700
Austrália	1.376	1.343	1.241	1.369	1.388	1.430	1.400	1.407	1.390	1.350
Estados Unidos	1.029	1.110	1.142	209	316	519	650	856	785	837
Índia	365	411	432	492	617	681	678	672	675	700
Argentina	168	345	382	616	754	552	534	422	560	390
Nova Zelândia	483	475	548	594	577	530	496	533	525	517
Canadá	619	657	413	603	596	477	457	494	475	490
Uruguai	145	225	282	354	417	460	385	361	310	360
Paraguai	62	80	78	115	193	240	206	233	210	230
Colômbia	9	3	5	19	13	31	114	206	180	20
Europa	610	580	438	363	253	218	140	203	160	160
Nicaragua	37	44	49	58	59	68	83	89	90	95
México	10	10	12	19	32	39	42	42	45	45
China	53	37	36	52	76	85	81	58	33	25
Costa Rica	16	13	17	16	20	16	17	21	25	25
Ucrânia	98	185	207	11	80	21	50	24	17	17
Outros Países	32	43	52	57	79	52	49	56	385	
TOTAL	5.901	6.490	6.542	6.677	7.327	7.519	7.576	7.394	6.706	6.891

* Estimativa (AgraFNP)

Fonte: Anualpec, 2010

Em 2010, verificou-se o abate de 7,587 milhões de cabeças de bovinos no 2º semestre, com alta de 7,2% em relação ao trimestre anterior e de 10 % na comparação com o mesmo período de 2009. O número de cabeças abatidas retornou ao patamar de 7,6 milhões de unidades, alcançado no período anterior à crise financeira internacional, como mostra a Figura 1 (IBGE, 2010). Para o ano de 2011 há uma estimativa de crescimento da produção da carne bovina entre 1,5% e 2% (FERRAZ, 2010).

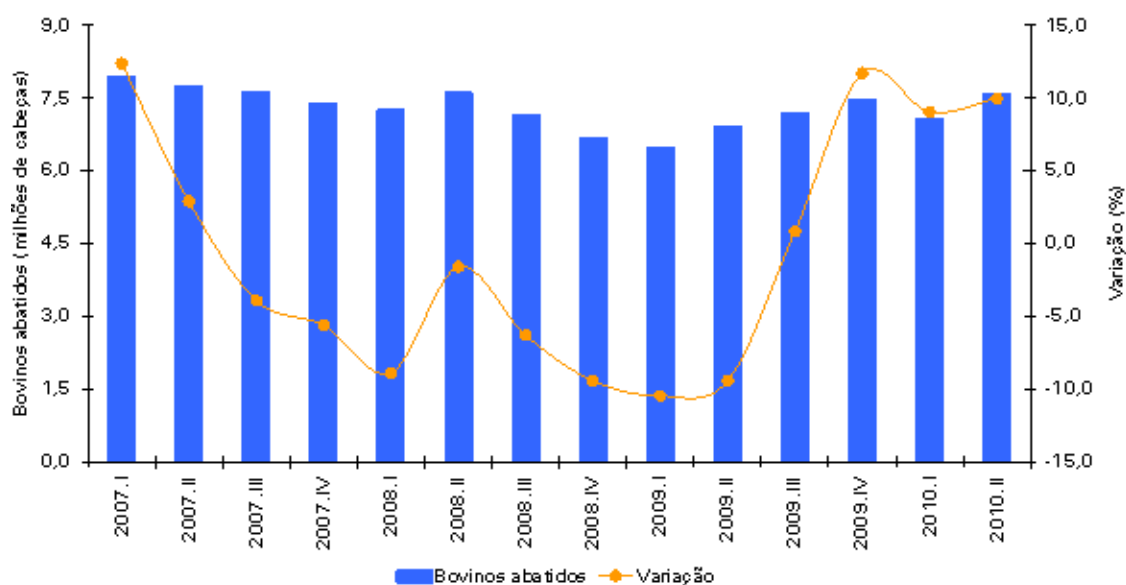


Figura 1 – Quantidade de bovinos abatidos no trimestre de e variação em relação ao mesmo trimestre do ano anterior – Brasil – 2007/2010

Fonte: IBGE, Diretório de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, 2010

A variação de 10,0% frente ao mesmo período de 2009 resulta dos desempenhos das regiões Sul e Centro-Oeste, que cresceram respectivamente 26,1% e 12,9%. Mato Grosso, com alta de 145 mil cabeças abatidas, destaca-se entre as unidades da federação (IBGE, 2010).

A carne produzida no Brasil é predominantemente de animais *Bos taurus indicus* (*Nelore*), pois estes apresentam melhor tolerância ao estresse térmico e são mais resistentes a parasitas quando comparado às raças européias (*Bos taurus taurus*), além de serem adaptados ao clima tropical (MAURO et al., 2008).

O Brasil apresenta um importante mercado interno para consumo de alimentos, principalmente em relação à carne bovina. Além disso, a pecuária nacional obteve nas últimas décadas, taxas constantes de crescimento em termos de produção e exportação.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (Abiec), o setor trabalha com uma estimativa de crescimento entre 8% e 10% nas exportações de carne bovina no ano de 2011.

Em 1980 o Brasil era um dos países que pouco exportava carne bovina devido a problemas sanitários como febre aftosa, cisticercose, brucelose e tuberculose (HUITT, 1981). A partir de 1996, o crescimento de exportação de carne bovina no Brasil começou a ser contínuo, aumentando o número de pedidos nos frigoríficos. O bom planejamento, expansão e controle sanitário do rebanho, puderam dar garantias aos importadores. O grande crescimento das exportações também se deu pelo fato de outros países concorrentes, apresentarem problemas, como doenças no rebanho, o que reduziu a participação desses países no mercado internacional (BRANDÃO et al., 2007).

2.2 Deterioração da carne bovina refrigerada

Um maior interesse científico ocorreu sobre a microbiologia da carne quando grandes quantidades de carne começaram a ser comercializadas para longas distâncias, principalmente quando houve expansão de supermercados (NYCHAS et al., 2008).

A qualidade microbiológica da carne depende de fatores como condição fisiológica do animal na hora do abate, disseminação da contaminação durante o abate e processamento, temperatura e condições de armazenamento e distribuição (NYCHAS et al., 2008). Dessa forma, alguns microrganismos são originários do trato gastrointestinal assim como do ambiente que o animal teve contato pouco tempo antes ou durante o abate (KOUTSOUMANIS; SOFOS, 2004).

A deterioração em carnes pode ser considerada como um fenômeno ecológico que abrange mudanças do substrato disponível para multiplicação bacteriana durante o armazenamento da carne (NYCHAS et al., 2008). Essas mudanças levam ao desenvolvimento odores desagradáveis e formação de limosidade, o que torna a carne um produto sem atrativos ao consumidor (ERCOLINI et al., 2006).

As mudanças sensoriais podem variar de acordo com a associação microbiana presente na carne e com o armazenamento deste alimento. Essas alterações ocorrem pela utilização de nutrientes como açúcares e aminoácidos livres, por microrganismos, resultando em compostos voláteis (ERCOLINI et al., 2006). Cargas microbianas de 10^7 UFC.cm⁻² são normalmente associadas à ocorrência de odores desagradáveis como “queijo” e “manteiga”, que podem

resultarem odores frutados e posteriormente pútridos, com o aumento da carga microbiana como 10^9 UFC.cm⁻² (DAINTY et al., 1985; JAY, 2000).

Nesse sentido, existem algumas alternativas para prevenir a multiplicação de microorganismos aeróbios na carne como embalagem a vácuo, remoção do oxigênio e introdução de gás carbônico (JEREMIAH, 2001). A qualidade da carne pode ser melhor preservada e sua vida útil prolongada com mudanças na atmosfera gasosa que a envolve.. Dois métodos comercialmente utilizados são a embalagem a vácuo e a embalagem com atmosfera modificada (HOOD; MEAD, 1993; NATTRESS; JEREMIAH, 2000). No entanto, a deterioração, pode ocorrer como consequência da multiplicação de microorganismos tolerantes às condições anaeróbicas.

O método de conservação por atmosfera modificada utiliza misturas gasosas contendo variáveis concentrações de O₂ e CO₂, a fim de inibir diferentes bactérias deteriorantes. Além disso, este método é associado com o uso de baixas temperaturas durante o armazenamento, estendendo ainda mais a vida de prateleira das carnes (FABER, 1991).

A microbiota presente na carne embalada a vácuo é selecionada de acordo com as condições ambientais expostas – temperatura, umidade relativa, pressão parcial de oxigênio e dióxido de carbono – sendo que microorganismos anaeróbios estritos e facultativos apresentam alto potencial de crescimento nessas condições. A competição entre a microbiota inerente ao produto atua favorecendo ou inibindo certas espécies de microorganismos (DYKES et al., 2001).

Inicialmente as bactérias mesófilas dominam a microbiota de carnes embaladas a vácuo. Porém, o armazenamento refrigerado favorece o crescimento de bactérias ácido lácticas nessas carnes. Além disso, pode haver um significativo crescimento de bactérias psicotolerantes como *Brochothrix thermosphacta* e *Shewanella putrefaciens* (DANTY; MACKAY, 1992; GILL, 2004) ou ainda a deterioração pode ser causada por *Clostridium* spp. (DANTY et al., 1989; KALCHAYANAND et al., 1989; BRODA et al., 2000).

Bactérias deteriorantes como as do gênero *Pseudomonas*, têm seu crescimento inibido pela liberação de CO₂ por microorganismos como bactérias lácticas. O resultado da deterioração por essas bactérias é caracterizado principalmente pelo odor azedo, ácido devido a metabolização da glicose em ácidos orgânicos (BORCH et al., 1996; NYCHAS; DROSINOS, 1999), como mostra a Tabela 2. Bactérias como *Lactobacillus* spp., principalmente *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc gelidium*, *Leuconostoc carnosum* e *Leuconostoc mesenteroides* são frequentemente encontrados nesses produtos (BORCH et al., 1996).

Tabela 2 - Alterações nas carnes pela atividade bacteriana

Microrganismos	Substrato utilizado		Produto final do metabolismo	
	Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose	Anaerobiose
<i>Pseudomonas</i> sp.	Glucose ¹ Aminoácidos ² Ác. láctico ³		Sulfetos Ésteres Ácidos Aminas Ésteres Nitrilas Aminas	
<i>Acinetobacter</i> sp. e <i>Moraxella</i> sp.	Aminoácidos ¹ Ác. láctico ²		Sulfetos voláteis	H ₂ S
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Glucose ¹ Aminoácidos ² Ác. láctico ³	Glucose ¹ Aminoácidos ²		
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Glucose ¹ Aminoácidos ²	Glucose ¹	Ác. acético Acetona Ác. isovalérico Ác. isobutírico	Ác. láctico Ác. graxos voláteis
<i>Enterobacter</i> sp.	Glucose ¹ Glucose fosfato ² Aminoácidos ³ Ác. láctico	Glucose ¹ Glucose fosfato ² Aminoácidos	Sulfetos Aminas	H ₂ S Aminas
<i>Lactobacillus</i> sp.		Glucose ¹ Aminoácidos ² Ác. láctico ³		Ác. láctico Ác. graxos voláteis

Observação: Os números indicam ordem preferencial de utilização dos substratos

Fonte: LAMBERT et al. (1991)

De acordo com Sakala et al. (2002) a carne bovina embalada a vácuo apresenta diversos microrganismos em sua microbiota, entre eles pode-se citar *B.thermosphacta*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus* ssp., *Lactococcus piscium*, *L. gelidum*, *Acinetobacter* sp., *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Psychrobacterem* e *Enterobacteriaceae*.

2.3 Deterioração do tipo *blown pack*

A deterioração do tipo *blown pack* é um problema que ocorre em carnes refrigeradas embaladas a vácuo e vem sendo cada vez mais estudado. Esse tipo de deterioração é caracterizado pela intensa distensão da embalagem, provocada por gases acompanhada da formação de odores desagradáveis, após 4 a 6 semanas de armazenamento em temperaturas de refrigeração (- 1,5 a 2° C) (BRODA et al., 2000), como mostra a Figura 2.



Figura 2 - Amostra de carne bovina de origem brasileira com embalagem distendida

Fonte: Acervo pessoal

Esse problema pode ocorrer em carnes bovina, suína, de animais de caça e codeiro e também em carnes de aves embaladas a vácuo (BRODA et al. 1996) (Tabela 3).

Tabela 3 – Características da deterioração *blown pack* em carnes embaladas a vácuo e “dog rolls”

Amostras	Características da deterioração
Trazeiro de cordeiro	Grande distensão da embalagem, descoloração esverdeada, grande produção de exsudado, odores "sulfurosos" ao abrir a embalagem e posteriormente de "queijo" ao manter-se em contato com o ar
Contra-filé de veado	Grande distensão da embalagem, intensa proteólise da carne, grande quantidade de exsudado, forte odor lácteo
Contra-filé bovino	Grande distensão da embalagem, proteólise da carne, descoloração esverdeada, grande quantidade de exudado, odor pútrido.
"Dog rolls"	Grande distensão da embalagem, manchas escurecidas, forte odor de leite, textura friável

BRODA et al. (1996)

Esse tipo de deterioração ocorre esporadicamente e normalmente envolve apenas algumas unidades dos produtos de um lote, porém o número de unidades afetadas pode aumentar, quanto maior o tempo de armazenamento (HELPS et al., 1999).

Uma pesquisa realizada por Danty et al. (1989), com o objetivo de analisar a composição gasosa no espaço livre das embalagens de carnes embaladas a vácuo com deterioração tipo *blown pack*, mostrou altos teores de gases hidrogênio e dióxido de carbono. A deterioração tipo *blown pack* também é associada à produção de compostos voláteis indesejáveis como butanol, ácido butanóico, álcool etílico, ácido acético e ésteres derivados destes compostos, bem como a uma variedade de compostos contendo enxofre e é caracterizada por um odor pútrido e um brilho metálico próprios de carne deteriorada (DAINTY; MACKEY 1992).

Acreditava-se que, espécies de clostrídios tinham um papel de menor importância na deterioração da carne (GILL, 1979; ROBERTS; MEAD, 1986). Porém, atualmente sabe-se que alguns clostrídios psicrotolerantes tais como *C. estertheticum* subsp. *estertheticum*, *C. estertheticum* subsp. *laramiense*, *C. frigidicarnis* e *C. gasigenes* são frequentemente associados à deterioração *blown pack* (DAINTY et al., 1989; KALCHAYANAND et al., 1989, 1993; COLLINS et al. 1992; LAWSON et al., 1994; BRODA et al. 1999; BRODA et al., 2000). Estudos mostram que outras bactérias também estão envolvidas com essa deterioração, entre elas

algumas enterobactérias psicrotolerantes (BRIGHTWELL et al., 2007). A multiplicação desses microrganismos é normalmente limitada a produtos com valores de pH superiores a 5,8 e ocorre mais facilmente quando há abusos de temperatura (GILL, 2004; BRIGHTWELL et al., 2007). Assim, temperaturas superiores a 6°C favorecem o crescimento de enterobactérias, que descarboxilam amino-ácidos, produzindo aminas orgânicas, responsáveis por odores e sabores pútridos (HOLLEY; GILL, 2005).

Em trabalho realizado sobre deterioração tipo *blown pack* em carnes de cordeiro (BRIGHTWELL et al., 2007), observaram-se números moderados a elevados de enterobactérias na microbiota daquelas carnes. As análises detectaram que os gêneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* e *Rahnella* produziram gás em condições de anaerobiose e foi constatado que estes microrganismos podem causar deterioração do tipo *blown pack* em carnes bovinas.

Além de enterobactérias, bactérias lácticas também foram encontradas em carne bovina embalada a vácuo com problema de estufamento, com contagens de 10^8 e 10^6 UFC/g, respectivamente (BRODA et al., 2002).

No Brasil há relatos de problemas de distensão de embalagens a vácuo de carnes refrigeradas, que, pelos resultados das análises microbiológicas concluiu-se que o produto sofreu abuso de temperatura durante o período de armazenamento e que bactérias lácticas foram as responsáveis pela distensão das embalagens analisadas (BROMBERG et al., 2002; 2003).

Felipe (2008) encontrou microrganismos da família *Enterobacteraceae* e bactérias lácticas em populações elevadas e em maior número nas carnes com deterioração *blown pack*. No referido trabalho, foi observado que dentre os gêneros de *Enterobacteriaceae* encontrados houve a predominância de *Hafnia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Edwardsiella*. Também foi possível a detecção de clostrídios, sendo que, as amostras que apresentaram deterioração mostraram maior positividade para o *C. esterteticum* que amostras não deterioradas (FELIPE, 2008).

As espécies de microrganismos presentes na microbiota da carne deteriorada podem interagir entre si possibilitando, por exemplo, competição pelo substrato disponível. Nesse sentido, pode haver liberação de bacteriocinas pelas bactérias lácticas, ou declínio do pH, inibindo alguns microrganismos competidores (MALAKAR et al., 2003; YANG et al., 2009).

No Brasil são necessárias mais pesquisas sobre a deterioração do tipo *blown pack* para a determinação dos microrganismos relacionados e, assim, buscar entender melhor o metabolismo

de cada gênero e espécie envolvida na distensão de embalagens de carnes refrigeradas embaladas a vácuo.

2.4 Fontes de contaminação da carne bovina

A qualidade e a segurança microbiológica de produtos crus dependem do controle efetuado durante sua produção, preparação, armazenamento e apresentação para comercialização. Os produtos de origem animal estão sujeitos à contaminação microbiana a partir de várias fontes, sendo que o próprio animal contribui com microrganismos patogênicos e deteriorantes (BELL, 1997).

A carne bovina é um alimento que pode ser facilmente contaminado antes, durante e após o abate. As contaminações que ocorrem durante o processamento levam a alterações no valor nutricional e nas características sensoriais como cor, odor, sabor e textura. Além disso, etapas como sangria, esfolagem, evisceração, corte e desossa favorecem a colonização dos tecidos por microrganismos deteriorantes e patogênicos (ROSA, 2008).

A microbiota do animal vivo é composta basicamente por bactérias Gram positivas mesófilas, como *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacter* e outros. Na pele e vias respiratórias encontra-se normalmente a espécie *Staphylococcus aureus*, agente causador de intoxicação alimentar. No trato intestinal predominam bactérias anaeróbicas estritas esporuladas, especialmente do gênero *Clostridium* (PORTO, 2006).

Aspectos de sanidade animal podem influenciar na qualidade da carne. Infecções no animal vivo podem levar à contaminação dos tecidos internos, principalmente se o agente de contaminação espalha-se na corrente sanguínea. Determinadas situações de estresse e má alimentação também podem favorecer a migração de microrganismos através da parede intestinal, o que pode levar à contaminação dos gânglios linfáticos e das vísceras por um número reduzido de microrganismos, entre os quais poderão estar patógenos, tais como *Salmonella* e esporos de clostrídios (ROSA, 2008).

Pouco se sabe sobre a provável fonte de contaminação de carcaças bovinas por clostrídios psicrófilos, porém grande parte da deterioração bacteriana relacionada a cortes de carnes embaladas a vácuo está associada a contaminações provenientes do ambiente de abate (GILL 1979; NOTTINGHAM, 1982).

Rauecker (2006) conduziu um estudo no Brasil e mostrou altos índices de positividade para o *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em fezes bovina, boxe de atordoamento, bovinos antes da esfolagem, meias carcaças refrigeradas e cortes cárneos deteriorados, demonstrando que o animal e o ambiente de abate são fontes desses microrganismos.

De acordo com Jay (2005), é consenso que os tecidos internos de animais sadios não contêm bactérias no momento do abate, porém, quando carnes frescas são analisadas, uma diversidade de microrganismos é encontrada, tendo como principais fontes e rotas de contaminação a faca de sangria, pele do animal, trato digestório, mãos de manipuladores, utensílios de cortes e manipulação de carnes, ambiente de manuseio e armazenamento e nódulos linfáticos.

Kalchayanand et al. (1991) identificaram as etapas de contaminação de carnes que ocasionaram a deterioração do tipo *blown pack*. Além dos matadouros, foram apontadas etapas de contaminação durante o transporte de carnes antes de serem embaladas a vácuo e durante a desossa, pela entrada de ar ambiente nesta área.

A deterioração do tipo *blown pack* é possível de ser prevenida em plantas de processamento de carnes que possam estabelecer medidas de higiene durante toda a produção, buscando evitar a contaminação dos utensílios e equipamentos e, conseqüentemente, das carnes. Além disso, adotar o uso de produtos químicos como o ácido peracético em estabelecimentos de abate, a fim de remover, destruir, ou inativar os esporos de clostrídios psicrófilos presentes nas carcaças de animais é importante (BRODA et al., 2006; BRIGHTWELL et al., 2009).

2.5 Microrganismos relacionados com a deterioração tipo *blown pack*

2.5.1 Clostrídios psicrófilos

O gênero *Clostridium* compreende uma série de microrganismos anaeróbios estritos que abrange várias espécies patogênicas e não patogênicas. Entre as espécies não patogênicas, algumas psicrófilas e psicrotróficas têm se destacado nos últimos anos na indústria de alimentos, principalmente de carnes e derivados refrigerados. Os clostrídios psicrófilos e psicrotróficos geralmente proliferam-se em temperaturas entre 0°C a 20°C e 0°C a 7°C respectivamente.

Algumas espécies de clostrídios, principalmente *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, foram descritas como agentes causadores da deterioração tipo *blown pack* (BRIGHTWELL et al., 2007). Uma espécie de clostrídio não toxigênico, denominada *C. estertheticum* subsp. *laramiense* (SPRING et al., 2003), foi isolada a partir de carnes refrigeradas frescas e cozidas emlabadas a vácuo com estufamento. Esta bactéria apresenta temperatura ótima de crescimento de 15°C e máxima de 21°C.

Outro clostrídio isolado a partir de amostras comerciais de carne suína cozida refrigerada embalada a vácuo e com produção de odores desagradáveis foi *C. algidicarnis*. Esta espécie tem temperatura ótima de crescimento entre 25°C e 30°C e mínima de 4°C, fermenta carboidratos com produção de ácidos, predominando o butírico e o acético, e de odores nauseantes, mas não produz gás, portanto, não estufa a embalagem (LAWSON et al., 1994).

Em trabalho realizado no Brasil por Bueno et al. (2008) foram detectados pela técnica de PCR os principais microrganismos anaeróbios psicofílicos e psicrotróficos associados à distensão de embalagens de carnes refrigeradas. Os resultados do referido estudo permitiu concluir que, os episódios de estufamento de embalagens das carnes tiveram como principal agente causador o *C. estertheticum*, também identificado como deteriorador de carnes embaladas a vácuo por Broda et al. (2002).

2.5.2 Enterobactérias

Os microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* apresentam características como formato de bacilos Gram-negativos, fermentam glicose com ou sem produção de gás, são aeróbios e anaeróbios facultativos. A temperatura de crescimento da maioria das espécies encontra-se entre 25 e 30°C. (HOLT et al., 1994; ICMSF, 2000). A distribuição das enterobactérias na natureza ocorre de forma ampla, sendo encontradas no solo, água, plantas, frutas, vegetais, carnes, ovos, grãos, animais, insetos e trato digestório de humanos e animais. Várias espécies são patogênicas para humanos e animais, ocasionando importantes perdas econômicas na indústria de alimentos (SILVA et al., 2007).

Stiles e King (1980) pesquisaram a presença de enterobactérias em diferentes fases da cadeia de processamento de carnes e esses microrganismos foram isolados a partir de amostras de carnes, na superfície das plantas de embalagem e no varejo. As espécies identificadas foram

Escherichia coli biótipo I, *S. liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans* e *Klebsiella pneumoniae*, indicando a diversidade de espécies de enterobactérias presente nas etapas de produção da carne.

Em estudo realizado por Hanna et al. (1979) foi detectada produção de gás em embalagens de carnes acondicionadas a vácuo que sofreram flutuações de temperatura no processamento e estocagem. Nestas condições, espécies da família *Enterobacteriaceae* como *S. liquefaciens* e *H. alvei* foram indicadas como responsáveis pelo estufamento das embalagens.

2.5.3 Bactérias lácticas

O grupo de bactérias lácticas de importância na deterioração de alimentos compreende, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus* e *Weissella* (AXELSON, 1993; JONES, 2004).

De acordo com alguns pesquisadores, as bactérias lácticas são consideradas o maior grupo de bactérias associado com deteriorações de produtos cárneos refrigerados e embalados a vácuo, cozidos e em atmosfera modificada (BORCH et al., 1996). No entanto, Yang e Gill (2011) observaram, pela inoculação de esporos de *C. estertheticum* e de células de *Leuc. mesenteroides* em amostras de carne bovina embaladas a vácuo, que houve maior distensão de embalagens de amostras que apresentavam maior número de esporos de *C. estertheticum* inoculados e maior tempo de armazenamento. Por outro lado, detectou-se pouca distensão em amostras com maior número de células inoculadas de *L. mesenteroides*, sugerindo que bactérias lácticas possam aparentemente prevenir o desenvolvimento de *blown pack* em carnes contaminadas com *C. estertheticum*. Com base nisso, mais estudos são necessários para determinar a ação das bactérias lácticas na deterioração tipo *blown pack*.

A deterioração de produtos cárneos pelas bactérias lácticas resulta na produção de limosidade, sabores e odores desagradáveis, descoloração, produção de gás e diminuição do pH (BORCH et al., 1996). Dentre o grupo das bactérias lácticas, os mais frequentes em carne pertencem aos gêneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (NYCHAS et al., 2007).

As bactérias lácticas produzem em seu metabolismo os ácidos láctico, acético e fórmico dependendo do gênero, espécie e condição de crescimento. Produtos cárneos que são armazenados sob atmosfera aeróbica ou em embalagens com alta permeabilidade ao oxigênio podem desenvolver sabores ácidos e doces, além de odores semelhantes a queijo. Estas

alterações são induzidas em atmosfera aeróbica pela formação de acetonas pelas bactérias *B. thermosphacta*, *Lactobacillus* spp. e *Carnobacterium* spp. (BORCH; MOLIN, 1989).

A produção de gás carbônico está associada com o desenvolvimento de *Leuconostoc* spp. tais como: *L. mesenteroides*, *L. carnosum* e *L. amelibiosum*. Além disso, a formação da limosidade em produtos cárneos cozidos e produtos cárneos embalados a vácuo pode ser ocasionadas por *Lactobacillus* spp. e *Leuconostoc* spp. (KORKEALA et al., 1988; VON HOLY et al., 1991).

No Brasil, Bromberg et al. (2002) e (2003) atribuíram as bactérias lácticas a distensão de embalagens a vácuo de carnes provavelmente submetidas abuso de temperatura durante o período de armazenamento.

2.6 Alternativas para o controle da deterioração *blown pack*

A contaminação por microrganismos causadores de deterioração em carnes, entre eles enterobactérias e clostrídios, pode ocorrer desde a produção animal até as últimas etapas de processamento do produto. O emprego de Boas Práticas Agrícolas (BPA) é uma medida que oferece ao produtor informações adequadas de manejo, as quais podem ser adotadas pelos diversos sistemas de produção existentes no Brasil, procurando manter os cuidados com a qualidade da alimentação, água e eliminação de dejetos, com intuito de minimizar a disseminação microbiana entre os animais. As BPAs seguem os princípios do sistema Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) (BRASIL, 2011).

Pouco se sabe sobre a provável fonte de contaminação de carcaças bovinas por clostrídios psicrófilos, porém grande parte da deterioração bacteriana relacionada a cortes de carnes embaladas a vácuo está associada a contaminações que ocorrem nos locais de abate (GILL, 1979; NOTTINGHAM, 1982). Alguns dos microrganismos são originados do trato intestinal do animal assim como de ambientes com os quais o animal teve contato logo antes ou durante o abate (KOUTSOUMANIS; SOFOS, 2004). Portanto, durante o processamento da carne, o uso de práticas de higiene são indispensáveis, pois o emprego de objetos perfurantes necessários para o abate pode introduzir microrganismos na carne. Dessa forma, a higienização correta de facas, ganchos e utensílios utilizados no abate pode evitar contaminações (ROÇA et al., 2002).

De acordo com Sheridan (1998), a pele representa a principal fonte de contaminação das carcaças, pois a presença de fezes na sua superfície pode conter microrganismos patógenos

(EUSTACE et al., 2007) e deterioradores, incluindo espécies de clostrídios como *C. estertheticum* e *C. gasigenes*.

Tendo em vista as possibilidades de contaminação da carcaça por microrganismos existentes na pele e nos pêlos do animal, a esfolagem constitui um ponto crítico do abate e, por isso, deve ser realizada com o animal suspenso em trilhos (esfolagem aérea) ou em mesas especiais (cama elevada) (LAMBERT et al., 1991; GOMIDE, 2006). Durante o procedimento de esfolagem, se as medidas de higiene não forem adequadas, pode haver contaminações da carne pela diversidade de microrganismos presente na pele dos animais (EVANGELISTA, 2000).

Após o procedimento de esfolagem, ocorre a evisceração. Este é um procedimento que resulta em um corte por toda a extensão da carcaça, expondo a cavidade torácica, abdominal e pélvica. De acordo com Gill (1994) e Bell (1997), o trato intestinal é considerado a segunda maior fonte de contaminação por patógenos e deteriorantes durante todo processamento de abate. Dessa forma, a evisceração deve ser conduzida com muito cuidado, com o objetivo de minimizar riscos de contaminação da carcaça, evitando-se perfurações no trato digestório.

O tempo transcorrido durante a evisceração não deve ultrapassar de 20 a 30 minutos, pois quanto mais tempo transcorre, maiores são as possibilidades de penetração de microrganismos intestinais nos tecidos (EVANGELISTA, 2000).

O setor de corte e desossa de carnes corresponde a outra etapa do processamento que exige cuidados. A desossa de peças em açougues e supermercados constitui inconvenientes de ordem higiênico-sanitária e desperdício econômico. A falta de higiene e o manuseio inadequado de quartos e de peças “nuas” até o mercado varejista desvirtuam todos os cuidados dispensados ao produto ainda no matadouro ou nos entrepostos.

Rauecker (2007) isolou *C. estertheticum* e *C. gasigenes* de diversos locais do interior de indústria frigorífica, entre eles a sala de desossa. Assim, é importante que todos os equipamentos e utensílios sejam devidamente higienizados, pois superfícies e equipamentos contaminados durante essa etapa de processamento podem ser fontes de microrganismos deteriorantes psicrotóxicos e psicrófilos. A utilização de temperaturas adequadas, evitando-se o uso de materiais impróprios com panos de limpeza, tábuas de madeira para corte e correias transportadoras absorventes são fatores importantes no controle da contaminação da carne (MANTIS et al., 2007). Para a higienização adequada de superfícies do ambiente é importante

que produtos como detergentes e sanitizantes sejam utilizados nas concentrações corretas (GOMIDE, 2006) e adequadamente empregados.

Outra etapa importante no controle da contaminação microbiana inclui a lavagem das carcaças por meio de jatos de água tratada sob pressão de 3 atm e temperatura por volta de 38°C, com objetivo de eliminar sangue, pequenos fragmentos ósseos e coágulos. Porém, de acordo com Jericho et al. (1993) a lavagem nem sempre se torna um procedimento favorável, pois pode disseminar a contaminação e contribuir para formação de aerossóis. Além disso, lavagem a jato pode ser razoavelmente eficiente na remoção de alguma contaminação visível, mas pêlos e máculas que surgem do contato com fezes ou conteúdo dos intestinos, provavelmente permanecerão.

Com o objetivo de melhorar a eficiência antibacteriana da lavagem, foram criados vários métodos, entre eles a nebulização de cloro, ácido acético, água quente e ácido láctico. Adams e Hall (1988) recomendam o ácido acético e o ácido láctico como sanitizantes para carcaças de animais abatidos para consumo, pois estes são eficientes contra microrganismos e apresentam baixa toxicidade para os humanos. Já Broda (2007), verificou que a utilização do ácido peracético como sanitizante é capaz de inativar *in vitro* até 4 log CFU ml⁻¹ dos esporos de *C. estertheticum*.

Brightwell et al. (2009) avaliaram a diversidade da microbiota em carne embalada a vácuo tratada e não tratada com ácido peracético, e os resultados mostraram houve menor número de enterobactérias nas carnes tratadas com ácido peracético do que nas carnes não tratadas.

Outro fator a ser considerado para o controle microbiano é o resfriamento da carcaça. Segundo Bolton et al. (2009) a carne embalada a vácuo deve ser refrigerada a baixas temperaturas. A carne é considerada refrigerada quando é mantida a temperaturas entre -1,5 a 7°C durante todo o período após o processo de *pos mortem* (LUCHIARI, 2006). A temperatura de armazenamento ideal para o transporte da carne refrigerada é a mais baixa possível em que não ocorre congelamento. Em carne bovina sem embalagem a vácuo a temperatura de congelamento é cerca de -1°C e para carne bovina embalada a vácuo a temperatura de congelamento está entre -2°C, portanto, a temperatura adequada de armazenamento da carne embalada a vácuo deve estar entre -1°C a 0°C (CSIRO, 2006).

A temperatura baixa de armazenamento é o fator mais importante para retardar a deterioração microbiológica de produtos cárneos embalados (MOSCHONAS et al., 2010). Vários

estudos demonstram relação entre a temperatura de armazenamento e o tempo da deterioração *blown pack* associadas ao *C. estertheticum* (BELL et al., 2001; BOEREMA et al., 2007), mas pouco se sabe sobre a influência da temperatura no início desse tipo de deterioração com outras espécies.

2.7 Técnicas moleculares utilizadas para detecção de microrganismos em carnes embaladas a vácuo

Nos últimos anos as técnicas moleculares tiveram um desenvolvimento significativo na detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos (DESTRO, 1995). Especificamente no caso de microrganismos anaeróbios estritos, as técnicas microbiológicas convencionais de cultivo apresentam limitações.

De acordo com Rosa (2008) fatores como a dificuldade no isolamento de linhagens de clostrídios psicotolerantes causadores de deterioração provenientes de amostras contaminadas em número que indique proliferação e metabolismo ativo é um dos principais problemas encontrados. Além disso, em meios convencionais de subcultura podem ocorrer baixa recuperação ou completa inibição de clostrídios psicrotróficos e psicrófilos (KALCHAYANAND et al., 1993; BRODA et al., 1996).

Os métodos microbiológicos tradicionais para detecção de *Clostridium* spp. psicrófilos e psicotolerantes associados à deterioração do tipo *blown pack* são complexos, demandam muito trabalho e tempo no isolamento e confirmação dos resultados. Além disso, a identificação dos microrganismos pelas características fenotípicas é de difícil interpretação (HOLDEMAN et al., 1977; BRODA et al., 1998).

Pode-se afirmar que os métodos moleculares para detecção de clostrídios psicrófilos e psicrotróficos são alternativas rápidas e eficientes no diagnóstico dos agentes causadores da distensão de embalagens, sem a necessidade de isolamento dos microrganismos (HELPS et al., 1999; BRODA et al., 2003; RAUECKER et al., 2007).

2.7.1 “Polymerase chain reaction” ou Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada uma técnica altamente sensível que consiste em obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA por meio da ação da

enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA molde. A PCR é conduzida em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, o qual alterna as temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (KONEMAM et al., 2001).

PCR tem sido utilizada com muita frequência em diagnósticos microbiológicos nos últimos anos (MALORNY et al., 2003) e é considerada uma técnica flexível que possibilita o seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras (CASTELANI; DUARTE, 2011).

Em alimentos, essa técnica é bastante descrita como ferramenta para a detecção direta de microrganismos (JENSEN et al., 1994; DESTRO, 1995). Especificamente em carnes embaladas a vácuo, a PCR possibilitou a detecção dos agentes responsáveis pela deterioração tipo *blown pack*, tais como clostrídios e enterobactérias (BRODA et al., 1999; BOEREMA et al., 2002; BRIGHTWELL et al., 2007; BRODA et al., 2002). Os resultados rápidos e precisos no estudo dos microrganismos associados a *blown pack* utilizando a PCR confirma a importância dessa ferramenta na análise da microbiota em carnes.

2.7.2 “Restriction fragment length polymorphism” (PCR-RFLP) ou Polimorfismo do Tamanho de Fragmento de Restrição

A técnica de PCR- RFLP baseia-se na análise do polimorfismo do tamanho de fragmento de restrição amplificados por PCR submetidos à digestão com endonucleases de restrição específica, seguida de eletroforese em gel de agarose para a confirmação do polimorfismo (FABER et al., 2001; GANDRA et al., 2008).

Essa técnica já foi utilizada para diferenciar linhagens de clostrídios psicrófilos e psicrófilos associadas com a deterioração tipo *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo (BRODA et al., 2000). Os resultados foram úteis no diagnóstico da causa da deterioração prematura de carnes refrigeradas embaladas a vácuo e no rastreamento de clostrídios causadores da deterioração *blown pack* em ambiente de abate.

2.7.3 “Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism” ou Polimorfismo do Tamanho de Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP)

T-RFLP é uma técnica amplamente utilizada na análise comparativa de comunidades microbianas que se baseia na amplificação por PCR do gene 16S rDNA utilizando *primers*

marcados com fluorescência. Os marcadores fluorescentes podem ser 6-FAM, ROX, TAMARA, e HEX, sendo que o mais utilizado é o 6-FAM. É um método muito sensível a mudanças na estrutura bacteriana (LIU et al., 1997; TIEDJE et al., 1999). Os fragmentos obtidos são tratados com enzimas de restrição e separados por eletroforeses capilares onde a corrida é realizada em um modo de varredura com tamanho interno padrão incluído em cada linha de leitura (LIU et al., 1997). A fluorescência dos T-RFs (fragmentos de restrição terminal) são convertidos em um eletroferograma, em que cada pico representa um T-RF. Os eletroferogramas são importados por softwares como GeneScanTM ou Gene MapperTM, ou por software GelComparII. Estes programas calculam o tamanho do fragmento de restrição terminal, assim como a intensidade de fluorescência (altura ou área) do pico.

A característica atribuída a cada membro da comunidade é o comprimento do T-RF do amplicon de PCR digerido com enzimas de restrição. Cada T-RF encontrado durante a análise de fragmentos é chamado de *unidade taxonômica operacional* (UTO). Os sítios nos quais as enzimas de restrição cortam a fita dupla de DNA não são necessariamente únicos para um grupo taxonômico particular. Desse modo, muitas sequências podem compartilhar o mesmo comprimento de T-RF, o que é chamado sobreposição de UTOS ou homoplasia de UTOS (THIES, 2007), assim, há necessidade de se utilizar mais de uma endonuclease nas análises.

Osborn et al. (2000) avaliaram a técnica de T-RFLP para estudo de estrutura de comunidades microbianas e concluíram que a mesma é altamente robusta e reprodutível, uma vez padronizada. Os autores demonstraram que um dos fatores mais importantes na padronização da técnica é a utilização da enzima DNA polimerase de uma mesma procedência para todas as amostras.

Segundo Marsh et al. (2000) o T-RFLP está sendo cada vez mais utilizado na comunidade científica por ser um método rápido e de alta resolução, porém o seu bom funcionamento depende, assim como em todas as análises moleculares, de uma extração eficiente do DNA (material genômico) e adequada amplificação do gene que se deseja pesquisar.

Devido ao acesso de informação de sequências nucleotídicas de diferentes espécies de microrganismos depositadas em banco de dados, técnicas de biologia molecular estão sendo utilizadas como ferramentas para o estudo da diversidade microbiana (WANG et al., 2004). Sequências completas e parciais do gene 16S rRNA de espécies causadoras de *blown pack* como *C. estertheticum*, *C. frigidicarnis*, *C. gasigenes* e *C. algidixylanolyticum* encontram-se

depositadas no GenBank, o que facilita a detecção dessas espécies por métodos moleculares independentes de cultivo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises realizadas no presente trabalho foram divididas em três partes (Figura 3).

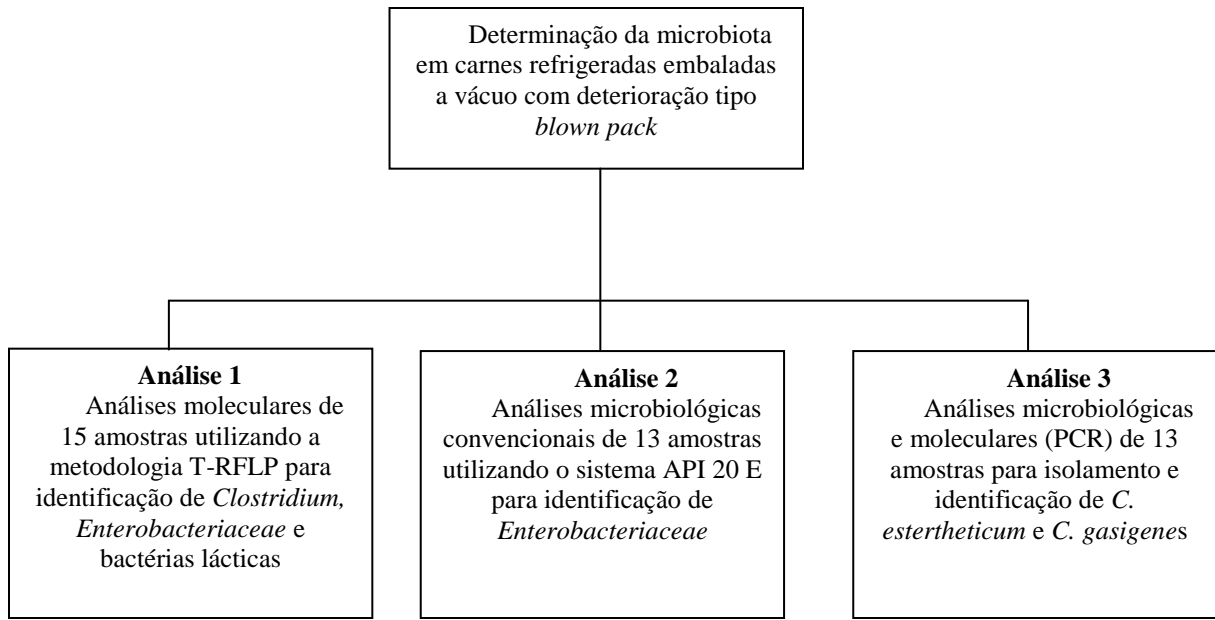


Figura 3 - Esquema de análises realizadas durante este estudo

3.1 Amostras

Foram obtidas 15 amostras de carne bovina resfriada embalada a vácuo com característica de distensão nas embalagens. Algumas dessas amostras estão representadas na Figura 4.

As amostras 5 e 7 foram perdidas devido a problemas técnicos após a realização das análises de T-RFLP. Portanto, não foi possível obter os resultados para essas amostras nas análises microbiológicas.



Figura 4 – Exemplo de quatro amostras de carnes embaladas a vácuo com embalagens distendidas

Fonte: Acervo pessoal

As amostras foram provenientes de frigoríficos do Estado de São Paulo, Mato Grosso do Sul, e Goiás. Os cortes disponíveis para as análises foram: contra-filé, cupim, alcatra, filé de costela, picanha e músculo (Tabela 4).

Tabela 4 - Amostras de carnes embaladas a vácuo com deterioração tipo *blown pack* utilizadas nas análises de T-RFLP e microbiologia convencional

Amostra	Cortes	Peso (Kg)	Vida útil (dias)	Fonte (Frigoríficos)
1	Contra-filé	1,36	30	São Paulo
2	Contra-filé	1,045	60	Goiás
3	Contra-filé	1,110	75	Mato Grosso do Sul
4	Cupim	1,420	60	São Paulo
5	Contra-filé	1,290	120	São Paulo
6	Músculo	2,880	30	São Paulo
7	Filé de costela	2,045	60	Mato Grosso do Sul
8	Contra-filé	3,24	75	São Paulo
9	Contra-filé	1,562	60	Mato Grosso do Sul
10	Contra-filé	1,255	120	Goiás
11	Alcatra	1,754	120	Goiás
12	Filé de costela	2	120	Mato Grosso do Sul
13	Filé de costela	2,28	120	Mato Grosso do Sul
14	Picanha	1,526	30	São Paulo
15	Músculo	3,1	30	São Paulo

Todos os cortes cárneos apresentavam características de deterioração tipo *blown pack* dentro da data de validade e com períodos de conservação variando de 30 a 120 dias. As amostras estavam resfriadas e foram acondicionadas em caixas de material isotérmico com gelo reciclável e transportadas até o laboratório de carnes do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (USP), onde foram mantidas em câmara de refrigeração em temperatura de 1°C.

3.1.1 Análise das amostras de carne bovina resfriadas e embaladas à vácuo pela técnica de T-RFLP

As análises de T-RFLP foram realizadas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Cena/USP, conforme esquematizado na Figura 5.

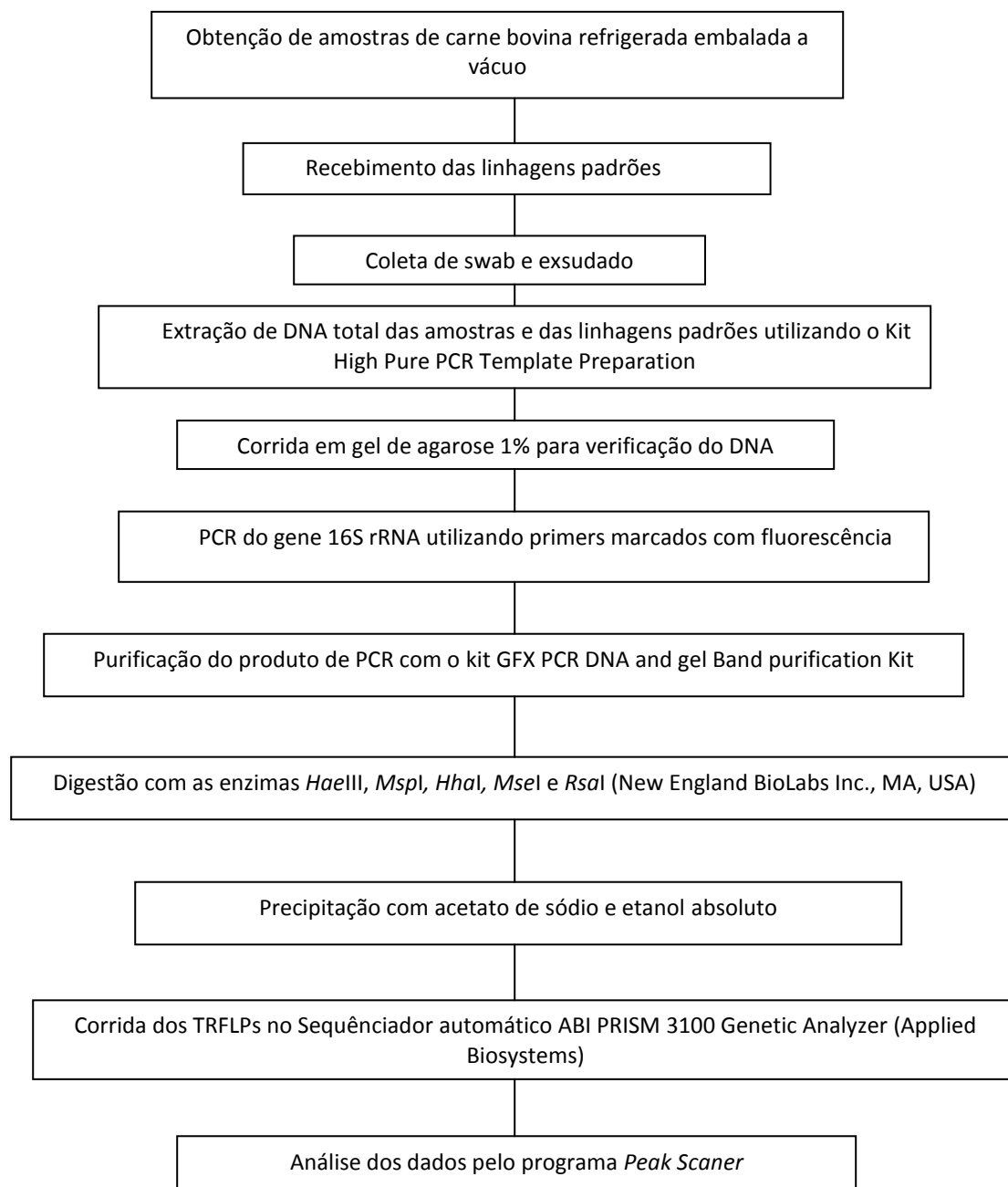


Figura 5 – Fluxograma das análises de T-RFLP

3.1.2 Linhagens padrão para análises de T-RFLP

Foram utilizadas 13 linhagens padrão: *C. algidicarnis* (DSM 15099); *C. algidixylanolyticum* (DSM12273), *C. estertheticum* (DSM 8809); *C. frigidicarnis* (DSM12271); *C. gasigenes* (DSM 12272); *C. laramiense* (DSM 14864); *C. putrefaciens* (DSM 1291); *B. thermosphacta* (DSM 20171); *L. sakei* (ATCC 15521); *L. mesenteroides* (ATCC 8293); *S. marcescens* (ATCC 14756); *H. alvei* (ATCC 11604); *S. liquefaciens* (ATCC 35551).

As linhagens de clostrídios foram reativadas em meio PYGS [peptona (Difco, Detroit Michigan, USA) levedura (Difco), glicose (Difco) e amido (Merck, Rio de Janeiro, Brasil)] com carne cozida e em meio Reinforced Clostridial – RCM (Difco) suplementado com glicose a 1% de (Difco) e bicarbonato de sódio a 0,2% de (Ecibra, São Paulo, Brasil) com carne cozida, ambos pré-reduzidos. As linhagens foram incubadas a 4°C, por 12-21 dias, em condições de anaerobiose, de acordo com Lund et al. (1990).

As linhagens *L. sakei* (ATCC 15521); *Leuc. mesenteroides* (ATCC 8293) e *Ser. liquefaciens* (ATCC 35551) foram reativadas em meio de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Difco) e incubadas a 30°C, por 24 horas. A linhagem de *Serratia marcescens* (ATCC 14756) foi reativada em meio Caldo Nutriente (Difco) e incubada a temperatura de 26°C, por 24 horas. A linhagem de *B. thermosphacta* (DSM 20171) foi reativada em meio STAA [(ágar, peptona, extrato de levedura, fosfato de hidrogênio dipotássio, sulfato de magnésio (Oxoid)] e incubada à temperatura de 24°C por 48 horas. A linhagem *H. alvei* (ATCC 11604) foi reativada em meio Caldo Nutriente (Difco) à temperatura de 26°C por 24 horas.

3.1.3 Extração de DNA total

As embalagens de carne foram abertas em câmara de fluxo laminar onde foram realizados dois procedimentos de coleta de amostras, swab e exsudado, com o objetivo de conseguir maior diversidade de microrganismos. As coletas foram realizadas em triplicata. Foi coletando 1 ml de exsudado e também utilizado o método de coleta por swabs da região superficial da carne para a aquisição do DNA total. O material obtido a partir dos swabs, foi ressuspensos em microtubos contendo 1 ml de solução de salina estéril (NaCl) a 0,85%. Os materiais coletados dos exsudados e dos swabs das amostras, junto com as culturas dos microrganismos padrão, foram utilizados

para a extração do DNA total usando o kit High Pure PCR Template Preparation (Roche Diagnostics, Auckland, New Zealand), seguindo as recomendações do fabricante.

3.1.4 Amplificação dos genes 16S rRNA por PCR e análise dos T-RFLPs

Para T-RFLP, a amplificação por PCR foi realizada segundo AMANN et al. (1995) e foram utilizados os *primers* universais 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (EDWARDS et al., 1989) e 1492r (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (WILSON et al., 1990). Para a detecção de fluorescência na análise de TRFLP, a extremidade 5' do *primer* 27f foi marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM). As reações de amplificação foram realizadas em solução contendo: 2,5 µl de tampão para PCR 10X; 1,0 µl de MgCl₂ 50mM; 0,5 µl de dNTP 10mM; 0,25 µl de BSA 1ng/µl; 0,2 µl de Platinum® Taq Polimerase 1U (Invitrogen); 0,5 µl de cada *primer* (10uM); 3 µl da amostra de DNA total e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 25 µl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; e 72°C por 15 minutos. Para a verificação da amplificação dos fragmentos, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%.

3.1.5 Purificação e digestão

Após a PCR os produtos foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA and gel Band purification Kit (Amersham) seguindo as especificações do fabricante. Em seguida, os produtos de PCR foram digeridos com *Hae*III, *Msp*I, *Hha*I, *Mse*I e *Rsa*I (New England BioLabs Inc., MA, USA). Para a digestão das amostras foram utilizadas 5 U de cada enzima de restrição, 5 µl de DNA, 1,5 µl de Buffer React 10x, 8,27 µl de água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, 0,15 µl de BSA, 0,08 µl de enzima, resultando em volume final de 15 µl. A digestão foi realizada a 37°C por 3 horas e a atividade da enzima foi inativada a 65°C por 10 minutos. As enzimas de restrição utilizadas e suas respectivas soluções tampões estão listadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Enzimas de restrição utilizadas nas análises de T-RFLP

Enzima	Sítio de Corte	Tampão
<i>MspI</i>	C_CGG	Buffer B [®] + BSA
<i>HhaI</i>	GCG_C	Buffer C [®] + BSA
<i>HaeIII</i>	GG_CC	Buffer C [®] + BSA
<i>MseI</i>	T_TAA	React 1 [®]
<i>RsaI</i>	GT_AC	Buffer C [®] + BSA

3.1.6 Precipitação

Após a digestão as amostras foram precipitadas com 0,1 v/v de 3 M de acetato de sódio pH 4,8 a 25°C e 2 volumes de etanol absoluto e centrifugado a 12,000 Xg por 15 minutos. O pellet foi lavado com etanol 70%, agitado pelo aparelho vórtex e novamente centrifugado por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada secagem em concentrador de DNA por 5-10 minutos e ressuspendido em 6 µl de tampão Tris-EDTA (100 mM Tris-Cl; pH 7,6 e 10 mM EDTA; pH 8,0).

3.1.7 Análise dos fragmentos de restrição terminais (T-RFs)

A análise dos Fragmentos de Restrição Terminais (T-RFs) dos produtos amplificados foi determinada por eletroforese capilar utilizando o 3100 Genetic Analyzer Automated Sequencer (Applied Biosystems). Para o carregamento das amostras no sequenciador, o produto precipitado foi ressuspendido em mistura contendo 9,75 µl de Formamida HiDi e 0,25 µl de padrão GeneScanTM – 500 ROXTM Size Standard (Applied Biosystems). Antes do carregamento as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e resfriadas a 0°C por 4 minutos. A análise do comprimento dos fragmentos de restrição terminais foi feita com o software *Peak Scanner* (Applied Biosystems), com base na comparação com os microrganismos padrão. A Figura 6 traz um esquema simplificado da análise.

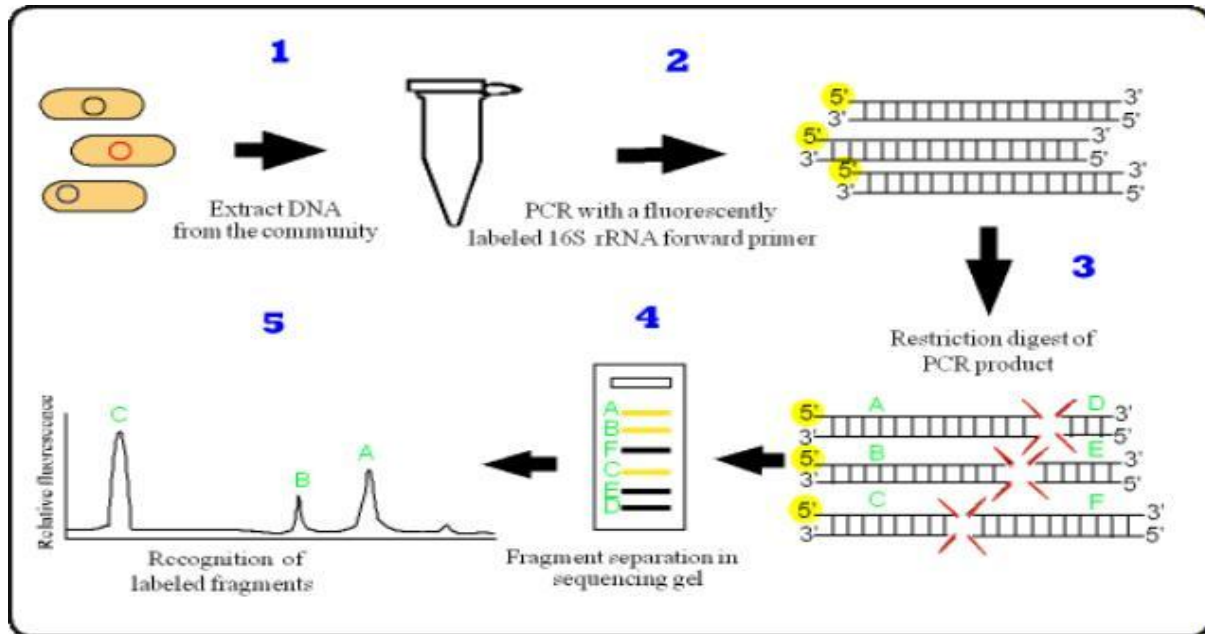


Figura 6 - 1) O DNA é extraído da amostra de interesse; 2) O gene de interesse é amplificado usando a técnica de PCR com um *primer* marcado com fluorescência; 3) Produtos de PCR de tamanho igual ou similar marcados com fluorescência na extremidade final. Após a purificação, os produtos de PCR são digeridos com enzimas de restrição, que geram fragmentos de diferentes tamanhos. 4) Estes fragmentos são separados em gel de eletroforese ou capilaridade. 5) Um leitor a laser detecta os fragmentos marcados e gera um perfil baseado no comprimento dos fragmentos. Fonte: Grüntzig et al. (2002)

3.2 Análises de microbiologia convencional

Com o objetivo de complementar os resultados obtidos com as análises moleculares, análises microbiológicas convencionais foram realizadas a fim de identificar um maior número de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*. As análises microbiológicas convencionais foram realizadas no Instituto de Tecnologia de Alimentos –ITAL/Campinas. Um esquema da metodologia está apresentado na Figura 7.

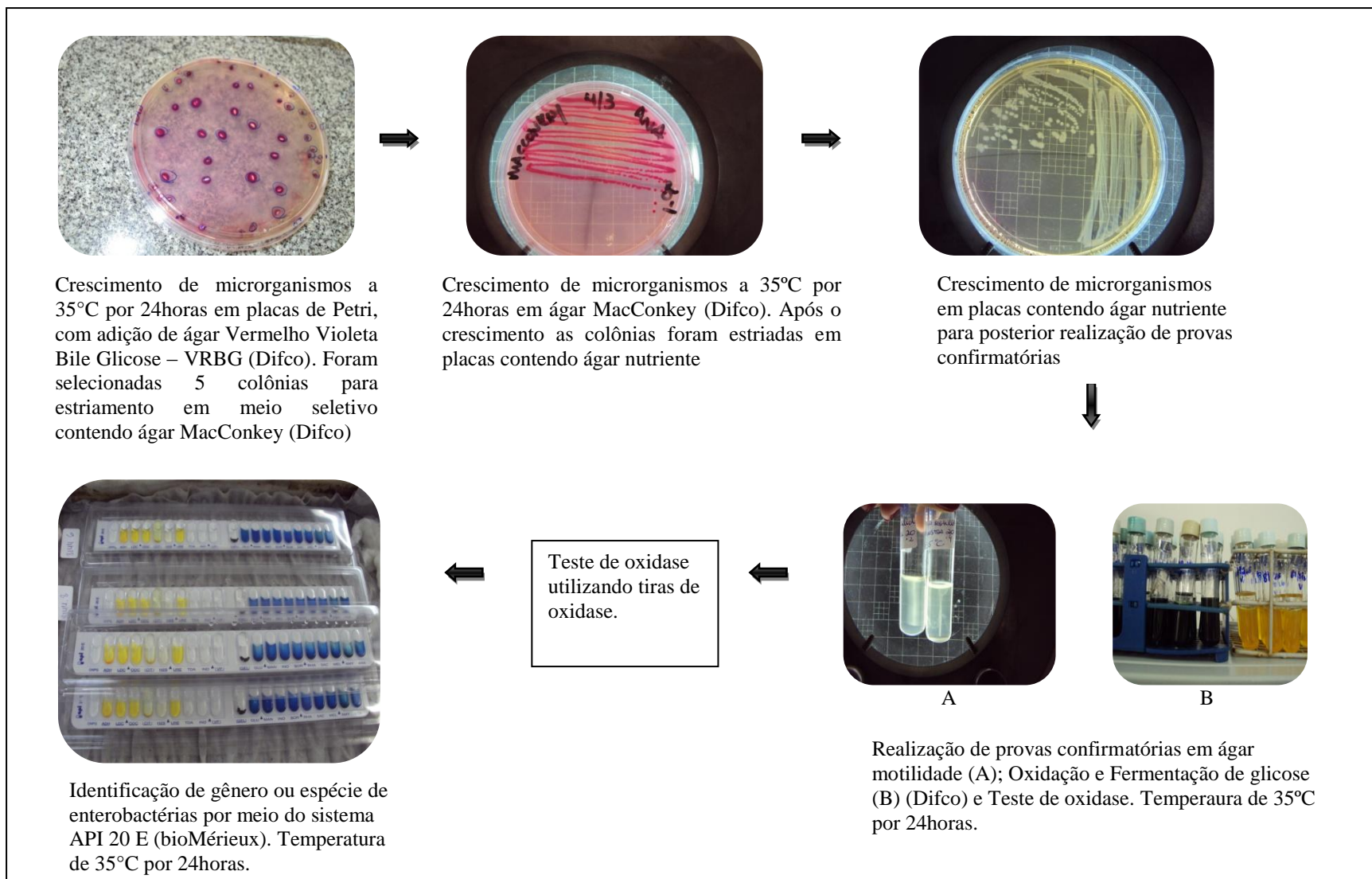


Figura 7 – Esquema das análises microbiológicas convencionais

3.2.1 Preparo das diluições das amostras para as contagens de bactérias da família *Enterobacteriaceae*

As embalagens de carne foram abertas em cabine de segurança biológica. O exsudado foi retirado com auxílio de uma pipeta de vidro estéril e transferido para bolsa plástica estéril, sendo adicionado de água peptonada 0,1% para obtenção de uma diluição decimal (10^{-1}). O material foi homogeneizado em “*stomacher*” (Lab-Blender 400). A partir dessa diluição inicial, diluições foram preparadas sucessivamente empregando-se o mesmo diluente até atingir a diluição 10^{-5} .

3.2.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*

Foi transferido 1 ml das diluições 10^{-1} a 10^{-5} para placas de Petri, sendo adicionadas de aproximadamente 15 ml de ágar Vermelho Violeta Bile Glicose – VRBG (Difco). Após solidificação, foi adicionada uma sobrecamada de VRBG. O procedimento foi realizado em duplicata e as placas foram incubadas em temperaturas de 35°C e 25°C por 24 horas. Posteriormente, foi realizada a contagem das colônias de cor púrpura das placas mantidas em ambas temperaturas. Em seguida, foram escolhidas cinco colônias de cada amostra das placas de VRBG mantidas a 35°C, as quais foram semeadas por estriamento em placas de ágar MacConkey (Difco), meio seletivo para *Enterobacteriaceae*, e incubadas a 35°C por 24 horas. As placas de VRBG mantidas a temperatura de 25°C foram reincubadas, após a contagem com 24 horas, para recontagem com 72 horas e com 5 dias. Após a última contagem, foram escolhidas cinco colônias e estas foram semeadas por estriamento em placas de ágar MacConkey e incubadas a 35°C por 24 horas.

3.2.3 Provas confirmatórias e identificação

Após o crescimento de colônias puras em placas de ágar MacConkey, estas foram inoculadas em tubos contendo ágar Nutriente e incubadas a 35°C por 24 horas. Em seguida foi realizada a inoculação na forma de picada das culturas com agulha de níquel cromo em tubos contendo ágar Motilidade, estes foram incubados a 35°C por 24 horas. Da mesma forma, as culturas foram inoculadas em meio para Oxidação e Fermentação de Glicose (OF-Glicose) (Difco), a fim de diferenciar organismos gram-negativos com base no metabolismo de fermentação e oxidação deste carboidrato. Foi realizado também o teste de oxidase pela transferência da cultura previamente preparada em ágar Nutriente com alça plástica

descartável para tiras de oxidase. Após a confirmação da cultura como pertencente ao membro da família *Enterobacteriaceae* foi utilizado o kit API 20E (bioMérieux) para identificação a nível de gênero ou espécie (Figura 8).



Figura 8 – Tabela de leitura e interpretação dos resultados obtidos pelo método API 20 E

3.2.4 Análises estatísticas

Para detectar diferenças nos valores médios das contagens de enterobactérias nas diferentes condições de temperatura e tempo de incubação, foi utilizado o Sistema de Análise Statistica trial, versão 9 da Stasoft. A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

3.3 Metodologia de isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

As análises para isolamento, caracterização e identificação de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foram realizadas no laboratório de Higiene da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

3.3.1 Sistemas de anaerobiose

Foram utilizados os sistemas de anaerobiose Glove bagTM modelo X-37-27 (Figura 9) e da câmara anaeróbica Shell labTM modelo Bactron II Chamber (Figura 10), durante os procedimentos de cultivo, inoculação e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, pois estes microrganismos apresentam alta sensibilidade ao oxigênio.



Figura 9 - Sistema de anaerobiose Glove bagTM modelo X-37-27



Figura 10 – Câmara anaeróbica Shell labTM modelo Bactron II Chamber

Inicialmente, foram realizadas lavagens dos sistemas com gás nitrogênio pureza 99,99% (White Martins, São Paulo, BR) e atmosfera final composta da mistura de 5% de Hidrogênio + 5% de Dióxido de Carbono + 90% Nitrogênio (White Martins). Foram utilizados indicadores de anaerobiose (GasPak, Difco) para verificar o sistema. Para a incubação, foram utilizadas jarros de anaerobiose com geradores de anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) (Figura 11). Os meios de cultura, reagentes e diluentes foram pré-reduzidos 48 horas antes em anaerobiose para realizar as etapas de repicagem, cultivo, inoculação, isolamento, provas de identificação e esporulação dos clostrídios.



Figura 11 – Jarro gerador de anaerobiose

3.3.2 Isolamento de microrganismos *C. estertheticum* e *C. gasigenes* para análise por PCR.

Foi realizada a desinfecção das embalagens com álcool 70% e abertura das mesmas em cabine de segurança biológica. Em seguida, com uma tesoura estéril foi feito um pequeno corte na embalagem e retirados 2 ml de exsudado com um seringa estéril. Posteriormente, foram inoculados 2 ml do exsudado em 18 ml de caldo PYGS (Peptone, Yest, Glucose, Starch) adicionado de carne cozida. Os tubos foram incubados a 4°C durante 21 dias. Ao final da incubação, foram feitas estrias em ágar sangue CBA [Columbia Blood Ágar Base, (Difco) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado] os quais foram pré-reduzidos por 48 horas. As placas foram incubadas à temperatura de 10°C por 21 dias, em anaerobiose. Posteriormente, três colônias foram isoladas de cada placa. As colônias foram inoculadas em

caldo PYGS pré-reduzido com carne cozida. Os tubos foram incubados a 10°C por 7 dias, para caracterização dos isolados.

3.3.3 Caracterização e identificação dos isolados

A caracterização das colônias como *Clostridium* sp. foi realizada por meio dos testes de catalase, que consistiu na transferência de 3 ml de caldo PYGS previamente inoculado com colônias, como descrito no item 3.3.2, para um tubo de ensaio, o qual foi adicionado 1 ml de H₂O₂ a 3% para observar o borbulhamento imediato (resultado positivo) ou não borbulhamento (resultado negativo). Também foram realizadas coloração em Gram utilizando o kit para coloração de Gram (Laborclin) seguindo as recomendações do fabricante e crescimento em ágar sangue CBA em aerobiose. Após a caracterização das colônias como *Clostridium* sp. (catalase negativo, bastonetes Gram-positivos e não crescimento em ágar sangue CBA em aerobiose) (ROSA, 2008), foi utilizado o método de extração de DNA total dos isolados obtidos de acordo com Furrer et al. (1991). Em seguida, foi empregada a técnica de PCR para identificação das espécies *C. estertheticum* e *C. gasigenes*.

3.3.4 Identificação das colônias pela técnica de PCR

Para análise de PCR utilizou-se os seguintes *primers*: 16 SEF (forward) 5'-TCG GAA TTT CAC TTT GAG-3' (Invitrogen) e 16 SER (reverse) 5'- AAG GAC TTC ACT CAT CTC TG-3' (Invitrogen), descritos por BRODA et al. (2003). O anelamento destes *primers* ocorreram nas posições 207-223 e 996-997, respectivamente, na sequência 16S rDNA do *C. estertheticum* (Gen Bank, acesso S46734). O tamanho exato do produto da PCR é 790 bp (BRODA et al., 2003).

Já para a detecção de *C. gasigenes* foram utilizados os *primers* 16 SDBF (forward) 5'-GAG AGG AGT TCT TCG GAA CGA-3' (Invitrogen) e 16 SDBR (reverse) 5'-AAG CSA CTT CCC CAA TTA C-3' (Invitrogen). O anelamento destes *primers* tem posições 61-81 e 995-977, respectivamente, na sequência 16S rDNA do *C. gasigenes* (Gen Bank acessos AG092548 e AF143692). O tamanho do produto obtido com esses *primers* é de 935 pb (BRODA et al., 2003).

Para a reação de amplificação tanto para identificação de *C. estertheticum* quanto para *C. gasigenes* utilizou-se solução contendo: 10 µl tampão de PCR 10x (LCG), 100 mM de TrisHCL e 500mM de Kcl pH 8,5; 1 µl de dNTP a 10 mM (Invitrogen); 0,25 µl de Taq-

polimerase (1U/ul, LCG); 0,5 µl de cada um dos *primers* a 100mM (Invitrogen); 2,5 µl do DNA extraído e água esterilizada, totalizando 25 µl.

A amplificação do DNA com os primers 16 SEF e 16 SER, 16 SDBF e 16 SDBR foi realizada em termociclador nas seguintes condições: ciclo inicial de 93°C/3min, 30 ciclos de desnaturação a 92°C/1minuto, anelamento a 55°C/1 minuto, extensão a 72°C/2minutos e ciclo final a 72°C/3 minutos (BRODA et al., 2003).

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen), a 100V/30 minutos, corado com SYBER Safe™ (Invitrogen molecular Probes, Oregon, USA), visualizados em transluminador por luz ultravioleta e fotodocumentados. Para cada gel foi adicionado marcador de peso molecular DNA ladder 100pb.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras de carne embaladas a vácuo com deterioração do tipo *blown pack* utilizadas no experimento apresentaram-se com aspecto totalmente alterado, com embalagem distendida contendo grande quantidade de exsudado e odor “pútrido”. Cor esverdeada foi observada em nove das quinze amostras analisadas.

4.1 Análises dos dados de T-RFLP

Após a extração de DNA total dos microrganismos presentes nas amostras de carnes e dos microrganismos padrão, foi realizada a amplificação dos genes 16S rRNA por PCR com *primers* marcados com fluorescência. Os fragmentos com aproximadamente 790 pares de bases foram visualizados em gel de agarose, como mostra a Figura 12.

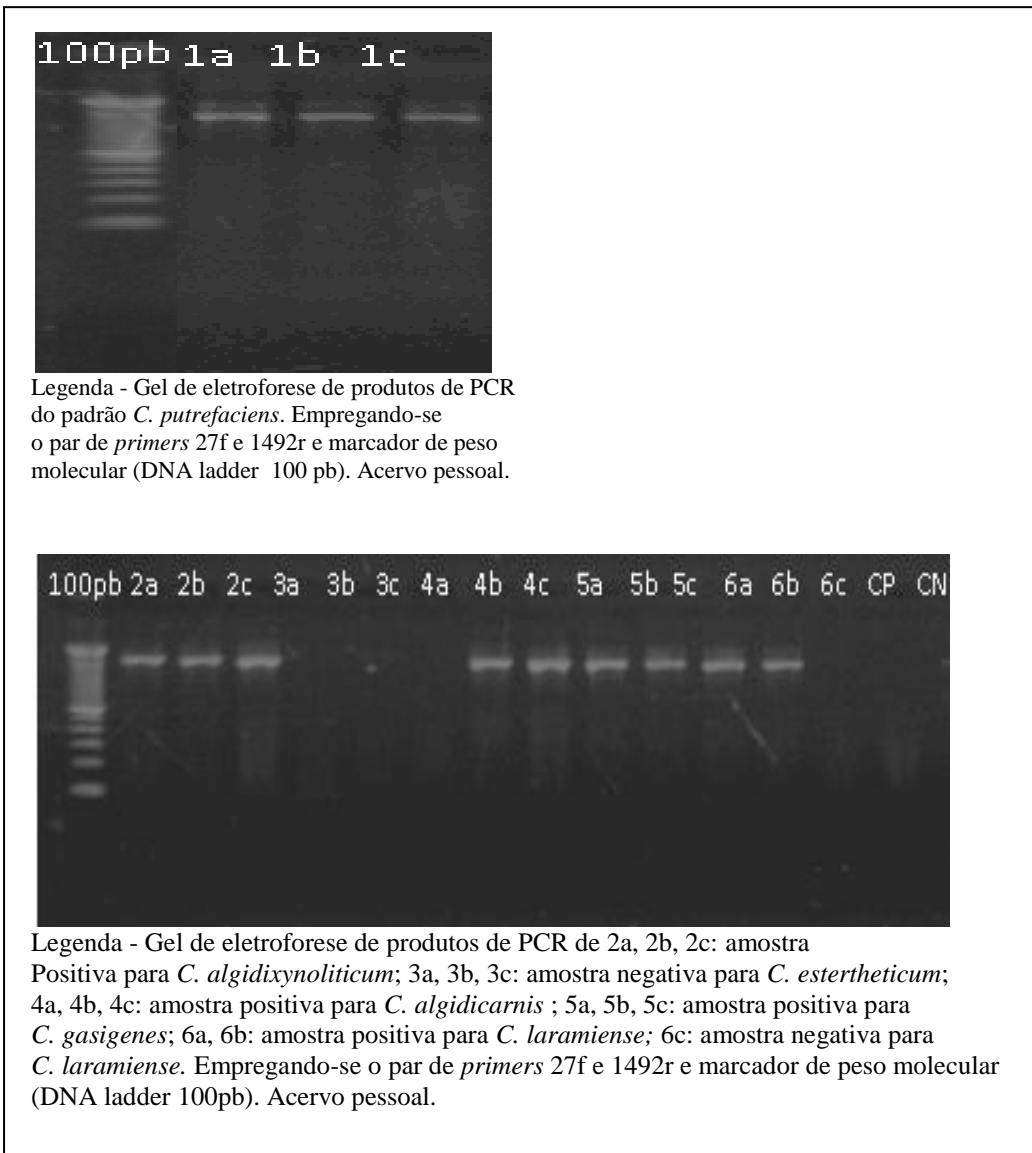


Figura 12 – Perfil dos géis de agarose dos produtos do PCR obtidos pela amplificação com sequências de DNA de culturas de clostrídios

4.1.1 Análises dos resultados de T-RFLP

A análise dos resultados foi realizada utilizando o programa *Peak Scanner* v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), que permitiu a detecção dos microrganismos contaminantes pela comparação dos picos (T-RF) das amostras com os dos microrganismos padrão.

Foram considerados os resultados em que amostras analisadas apresentaram sobreposição com os picos dos microrganismos padrão, utilizando no mínimo três enzimas de restrição. Esse critério foi adotado para melhor segurança das análises, pois os sítios nos quais as enzimas de restrição cortam a fita dupla de DNA não são necessariamente únicos para um

grupo taxonômico particular. Desse modo, muitas sequências podem compartilhar o mesmo comprimento de T-RF, o que é chamado sobreposição de UTOs ou homoplasia de UTOs (THIES, 2007). Assim, para evitar resultados falso positivos, foram consideradas amostras positivas somente aquelas que apresentaram os eletroferogramas positivos com pelo menos três das cinco enzimas utilizadas neste estudo. Uma avaliação das endonucleases utilizadas no trabalho permitiu observar que as enzimas mais eficientes na detecção das sequências do DNA total das amostras de carnes foram *HhaI* seguida das enzimas *MspI* e *HaeIII* (Tabela 6).

Tabela 6 - Microrganismos identificados por análises de T-RFLP em carnes refrigeradas embaladas a vácuo utilizando cinco enzimas de restrição e seus respectivos tamanhos de restrição terminal em pares de bases

Amostras	Microrganismos	Tamanho TRF (pb)				
		<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>MseI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>RsaI</i>
1	<i>S. liquefaciens</i>	369	487	-	333	-
1	<i>H. alvei</i>	369	-	446	-	421
2	<i>H. alvei</i>	369	487	-	-	421
3	<i>S. liquefaciens</i>	369	487	-	333	-
3	<i>L. sakei</i>	603	573	-	334	-
5	<i>H. alvei</i>	369	487	446/450/453	-	-
5	<i>S. liquefaciens</i>	369	487	450	-	-
6	<i>H. alvei</i>	369	487/489	446	-	421
6	<i>C. algidicarnis</i>	232	574	-	-	122/123
6	<i>C. putrefaciens</i>	231	-	153	268	443
6	<i>S. liquefaciens</i>	367/369	487	450	-	-
7	<i>L. sakei</i>	603	573	-	334	-
7	<i>C. gasigenes</i>	229	515	-	-	444
7	<i>C. putrefaciens</i>	231	513	-	268	-
7	<i>C. frigidicarnis</i>	230	516	155	-	545
7	<i>C. algidicarnis</i>	232	-	-	266	443
8	<i>H. alvei</i>	369	487	-	-	421
8	<i>S. liquefaciens</i>	-	487	450	333	-
11	<i>C. gasigenes</i>	-	515	-	267	444
11	<i>C. algidicarnis</i>	232	-	-	266	443
11	<i>C. putrefaciens</i>	231	513	-	268	-
12	<i>C. algidicarnis</i>	232	574	-	-	443
12	<i>C. putrefaciens</i>	231	-	153	268	443
12	<i>H. alvei</i>	369	487	446	-	-
12	<i>S. liquefaciens</i>	369	487	-	333	-
15	<i>H. alvei</i>	-	487	446	-	421
15	<i>L. sakei</i>	603	573	-	334	-

(-) Não detecção de microrganismos nas amostras de carnes

Por T-RFLP foram detectados microrganismos contaminantes em dez das quinze amostras de carne analisadas, enquanto cinco amostras apresentaram resultados negativos. Os resultados mostraram similaridade gênica com as espécies: *C. algidicarnis*; *C. gasigenes*; *C. putrefaciens*; *C. frigidicarnis*; *H. alvei*; *S. liquefaciens* e *L. sakei*, assim esses microrganismos mostraram-se frequentes nas amostras estudadas (Tabela 6. Eletroferogramas representando a detecção de *C. gasigenes*, *H. alvei* e *L. sakei* em amostras de carne estão apresentados na Figura 13).

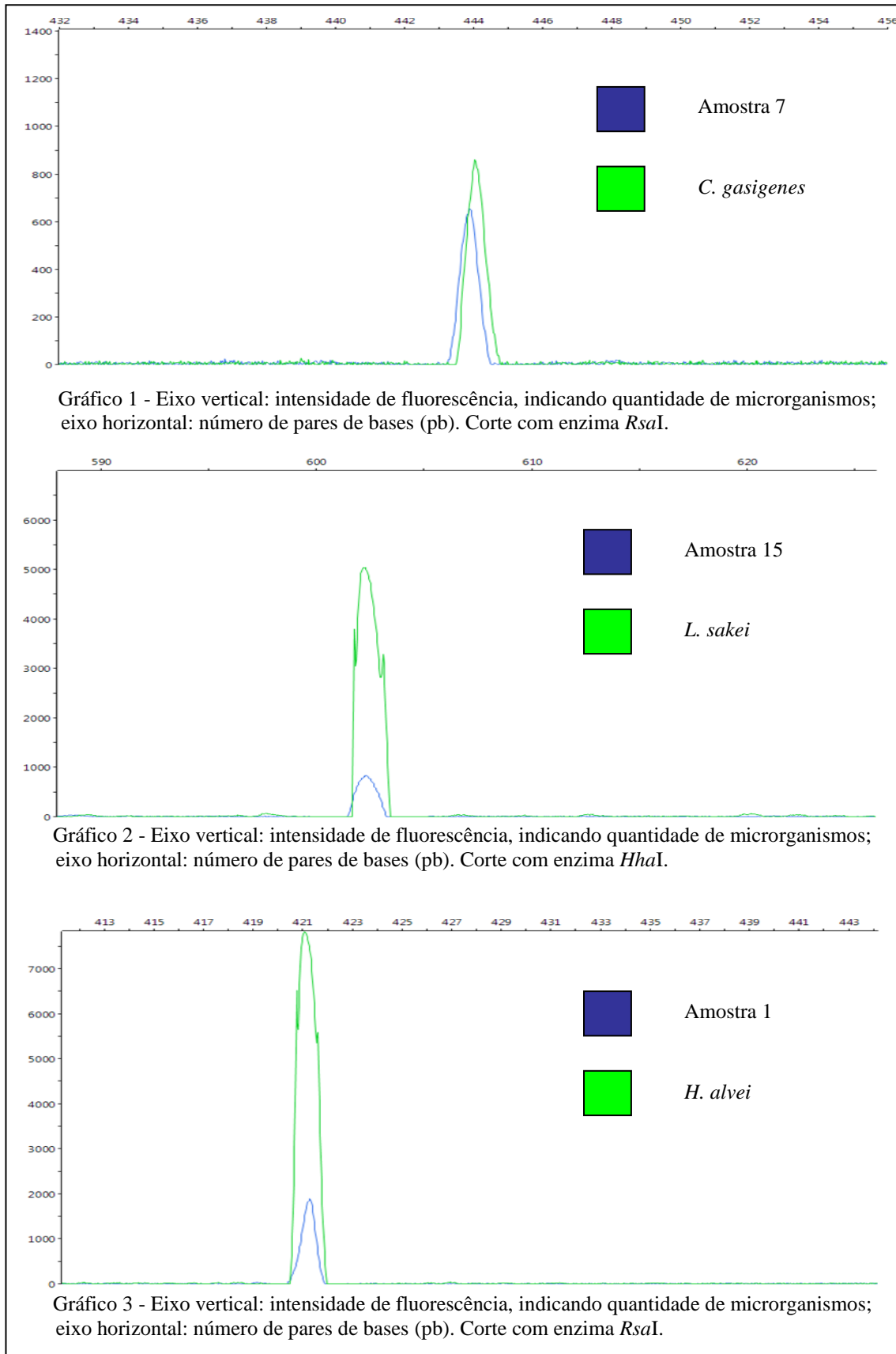


Figura 13 – Gráficos 1, 2 e 3. Eletroferogramas das amostras 7, 15 e 1, mostrando similaridade gênica com os microrganismos *C. gasigenes*, *L. sakei* e *H. alvei* respectivamente

As enterobactérias *H. alvei* e *S. liquefaciens* foram identificadas nas amostras 1, 2, 5, 6, 8, 12, 15 e nas amostras 1, 3, 5, 6, 8, e 12 respectivamente (Tabela 6. A Figura 14 apresenta resultados da detecção de *H. alvei* e *S. liquefaciens*).

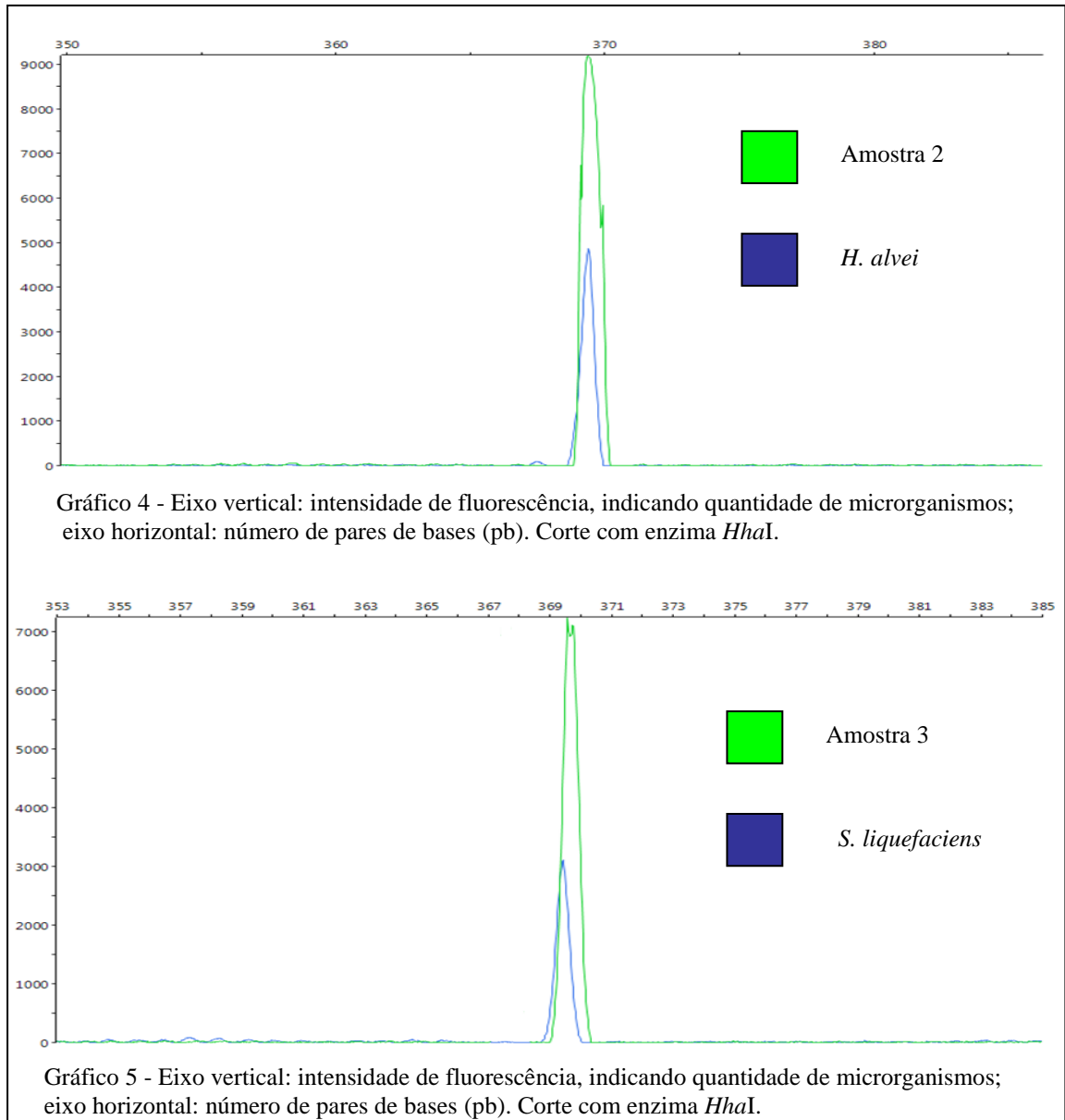


Figura 14 – Gráficos 4 e 5. Eletroferogramas das amostras 2 e 3, mostrando similaridade gênica com os microrganismos *H. alvei* e *S. liquefaciens* respectivamente

H. alvei pode ser encontrada em diversos habitats, sendo o trato gastrointestinal de mamíferos o habitat ecológico mais comum desta espécie (JANDA; ABBOTT, 2006). Já a bactéria *S. liquefaciens* foi detectada em todos os estágios de manipulação da carne em planta de processamento, além de ser associada à deterioração de carne de cordeiro embalada a vácuo (STILES; KING, 1980; BRIGHTWELL, 2007). Dessa forma, a presença desses

microrganismos nas amostras avaliadas nesta pesquisa sugere deficiências na higienização durante as etapas de processamento da carne. Em trabalhos anteriores, *H. alvei* e *S. liquefaciens* foram identificadas como possíveis deteriorantes em carnes com problemas de *blown pack* (HANNA et al., 1979; BOEREMA et al., 2002) corroborando com os resultados do presente estudo.

Outro microrganismo identificado nas análises de T-RFLP foi *L. sakei*, presente nas amostras 3, 7 e 15, como mostra a Figura 15.

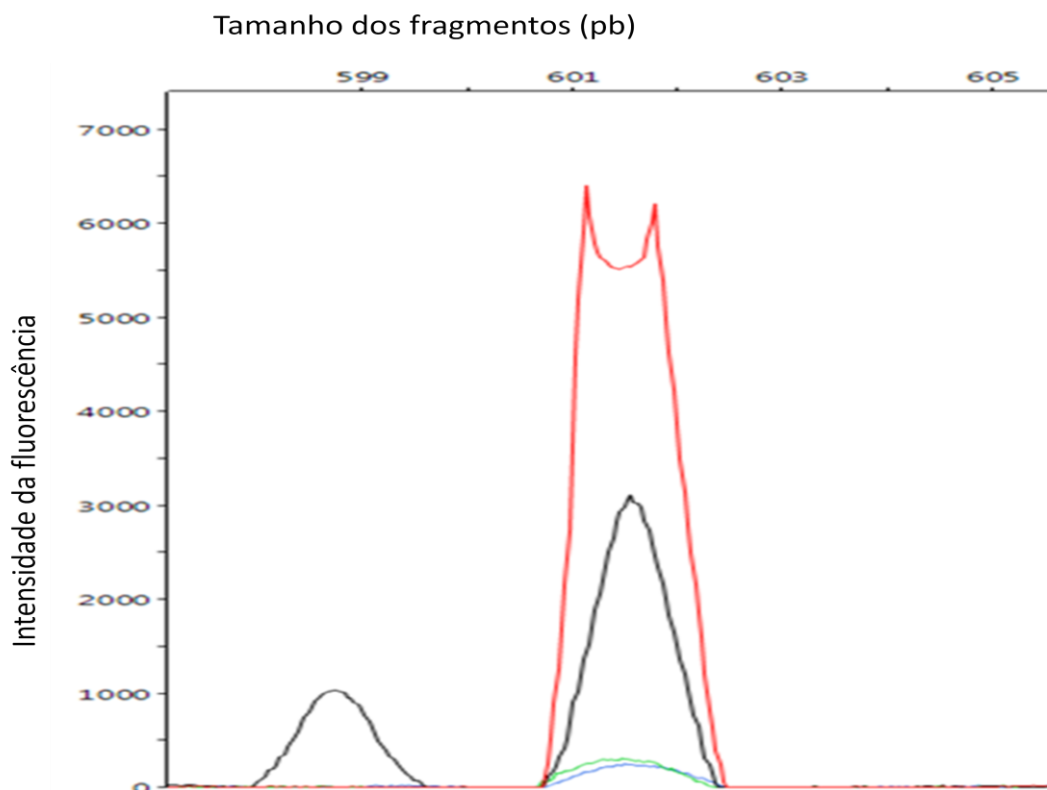


Figura 15 - Eletroferograma dos T-RFLPs analisados no programa *Peak Scanner* (v.1.0) mostrando contaminação das amostras 3, 7 e 15 com *L. sakei* utilizando a enzima de restrição *Hha I*. Amostra 3 (—); amostra 7 (—); amostra 15 (—); *L. sakei* (—)

L. sakei é uma bactéria láctica normalmente encontrada em carnes e derivados (STENTZ et al., 2001). Essa espécie é caracterizada por ser heterofermentativa facultativa, fermentadora de hexoses para produção de ácido láctico e pode produzir CO₂. Um estudo realizado por Hanna et al. (1979) mostrou que *Lactobacillus* spp. heterofermentativos apresentam capacidade de produzir gás no interior da embalagem a vácuo de produtos cárneos, quando estes são armazenados em temperaturas entre 1 a 3°C por 21 dias, indicando

grande possibilidade desse microrganismo estar envolvido com a deterioração *blown pack* em carnes, concordando com os resultados deste experimento.

A detecção de *C. algidicarnis* nas amostras 6, 7, 11 e 12 comprova a relação deste microrganismo com a deterioração de carne embalada a vácuo. Essa espécie fermenta carboidratos com produção de ácidos, predominando o butírico e o acético, com produção de odores nauseantes, mas não de gás, portanto, não estufa a embalagem. Dessa forma, a distensão das embalagens nestas amostras foi provavelmente causadas pelos demais microrganismos encontrados juntamente com essa espécie de clostrídio. Lawson et al. (1994) indicaram ser *C. algidicarnis* responsável pela deterioração de carne de porco cozida refrigerada embalada a vácuo, comprovando seu potencial de deterioração nesse tipo de produto, o que está de acordo com este estudo. BRODA et al. (2009) isolaram recentemente este microrganismo em amostras coletadas em ambientes de abatedouro de cordeiro, fezes, lã e amostras colhidas do chão da sala de abate.

A espécie *C. gasigenes*, detectados nas amostras 7 e 11, também foi associada à deterioração tipo *blown pack* (BRODA et al., 2000; BODA et al., 2002).

Outra espécie identificada neste estudo nas amostras 6, 7, 11 e 12 foi *C. putrefaciens*. Esse microrganismos foi identificado inicialmente por Broda et al. (1999) em cepas isoladas de carne embalada a vácuo que sofreram abuso de temperatura, e posteriormente por Boerema et al. (2002) e Broda et al. (2009) que também o apontaram como contaminante de carnes embaladas a vácuo, coincidindo com os resultados obtidos no presente estudo

A espécie *C. frigidicarnis* foi detectada apenas na amostra 7. A presença deste microrganismo pode sugerir que a amostra 7 sofreu abuso de temperatura, pois o crescimento de *C. frigidicarnis* está associado a essa condição (Broda et al. (1999).

A amostra 7 apresentou todas as espécies de clostrídios detectadas neste estudo por T-RFLP: *C. gasigenes*, *C. putrefaciens*, *C. frigidicarnis* e *C. algidicarnis* (Tabela 6). Além disso, foi possível observar que essa amostra apresentou elevada população de clostrídios, como é o caso do *C. putrefaciens*. Essa constatação baseia-se nos picos apresentados nos gráficos 6, 7, 8 e 9 (Figura 16 e 17), em que a altura do pico correspondem à intensidade da fluorescência do fragmento terminal digerido pela enzima de restrição, o que indica neste caso, a quantidade de fragmento de DNA dos microrganismos. Pela análise dos eletroferogramas da amostra 7, gerados pelo programa *Peak Scanner*, observa-se um pico com altura de 10000 para *C. putrefaciens* (Figura 16, Gráfico 6), mostrando que este microrganismo representava a maior população encontrada entre as espécies de clostrídios presentes na amostra 7. A segunda maior população de clostrídio contaminante observada na

amostra 7 foi de *C. algidicarnis*, com um pico de 8250 de altura (Figura 16, Gráfico 7), seguida por *C. frigidicarnis*, com 5250 (Figura 17, Gráfico 8) e, em menor quantidade, foi detectado *C. gasigenes*, com um pico de 800 (Figura 17, Gráfico 9).

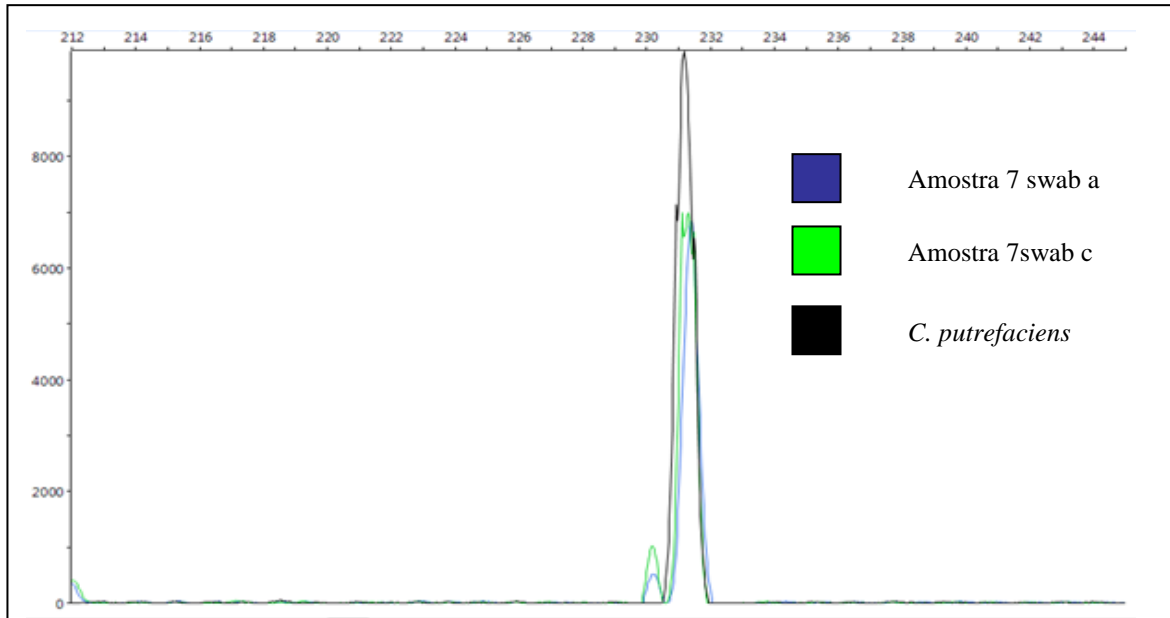


Gráfico 6 - Eixo vertical: intensidade de fluorescência, indicando quantidade de microrganismos; eixo horizontal: número de pares de bases (pb). Corte com enzima *HhaI*.

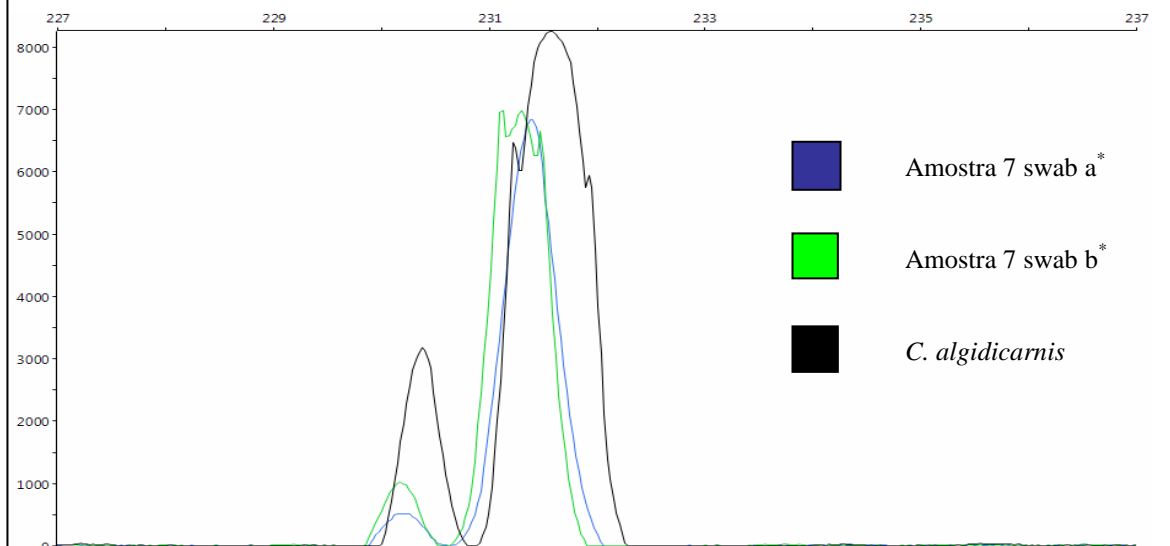


Gráfico 7 - Eixo vertical: intensidade de fluorescência, indicando quantidade de microrganismos; eixo horizontal: número de pares de bases (pb). Corte com enzima *HhaI*

Figura 16 – Gráficos 6 e 7. Eletroferogramas da amostra 7 mostrando similaridade gênica com os microrganismos *C. putrefaciens* e *C. algidicarnis*. (*) coletas

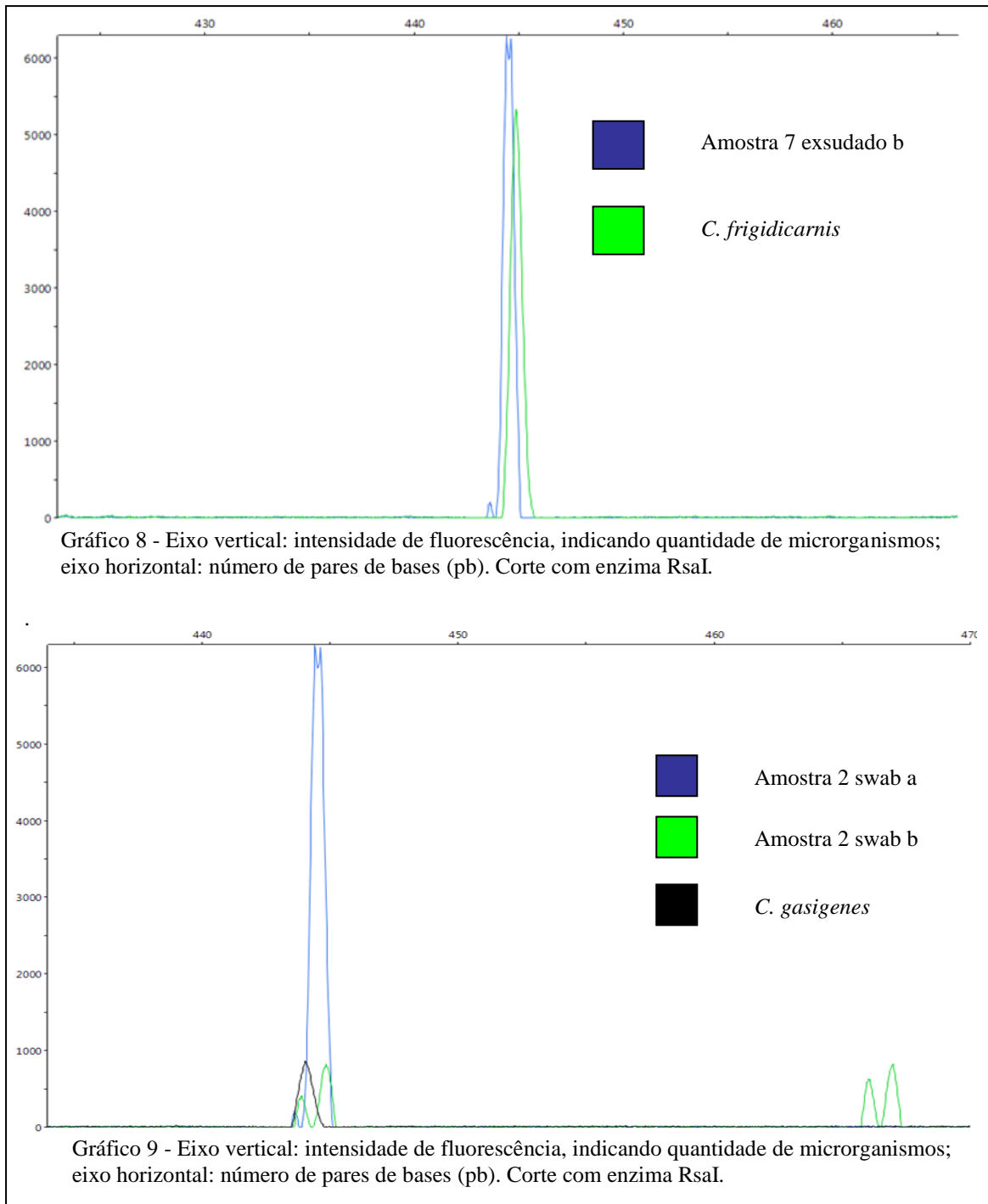


Figura 17 – Gráficos 8 e 9. Eletroferogramas da amostra 7 e 2 mostrando similaridade gênica com os microrganismos *C. frigidicarnis* e *C. gasigenes*

As enterobactérias *H. alvei* e *S. liquefaciens* foram as mais frequentemente encontradas em todas as amostras de carnes avaliadas, como mostra a Figura 18. Este resultado está de acordo com pesquisas que identificaram *H. alvei* e *S. liquefaciens* em amostras de carne com deterioração tipo *blown pack* (BRIGHTWELL et al., 2007; FELIPE, 2008). Os demais microrganismos identificados foram menos frequentes nas amostras: *C. putrefaciens*, *C. algidicarnis*, *L. sakei*, *C. gasigenes* e *C. frigidicarnis* (Figura 18).

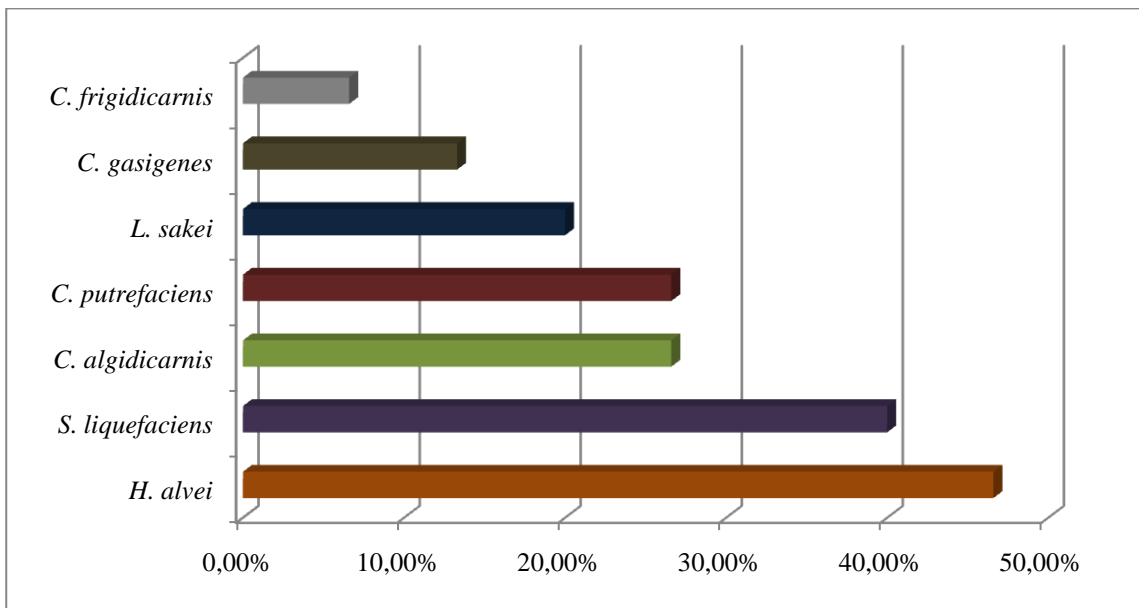


Figura 18 – Porcentagem de microrganismos identificados nas análises de T-RFLP

4.2 Contagem de enterobactérias pelo método de microbiologia convencional

As contagens de enterobactérias nas temperaturas de 35°C (24 horas) e 25°C (24, 72 e 120 horas) (Tabela 7), revelaram que não houve diferença significativa entre as temperaturas avaliadas de crescimento ($p > 0,05$). Dessa forma, as médias das contagens de enterobactérias em logaritmo de UFC/ml mostraram valores muito próximos, indicando que ambas as temperaturas foram favoráveis ao crescimento das enterobactérias, sendo que a incubação a 25°C por 24 horas apresentou maior contagem e a 25°C por 120 horas a menor contagem.

Tabela 7 - Média (\pm desvio padrão) das contagens de enterobactérias em Logarítimo de UFC/ml e valor de p

Temperatura/Tempo	Média (log)	Desvio padrão	P
35°C 24h	5,26 \pm 2,36	2,362849	-
25°C 24h	5,10 \pm 2,38	2,384894	-
25°C 72h	5,48 \pm 2,01	2,017936	-
25°C 120h	5,55 \pm 2,01	2,016568	-
Média total	5,35 \pm 2,14	2,144862	0,949446
p	0,95	-	-

4.2.1 Identificação de enterobactérias pelo sistema API 20E

Os resultados obtidos a partir das análises de um total de 117 colônias isoladas de amostras de carnes com deterioração tipo *blown pack* indicaram maior ocorrência de *H. alvei*, seguida de *S. Liquefaciens* e *C. braakii*. Outras espécies de enterobactérias também foram identificadas neste estudo: *Pantoea* sp. e *Y. enterocolitica* (Tabela 8).

Tabela 8 - Porcentagem de microrganismos identificados nas amostras pelo método API 20 E

Microrganismo	Porcentagem (%)
<i>H. alvei</i>	92,30
<i>S. liquefaciens</i>	15,38
<i>C. braakii</i>	15,38
<i>Pantoea spp.</i>	7,69
<i>Y. enterocolitica</i>	7,69

A bactéria *H. alvei* foi identificada em doze das treze amostras de carnes por análises microbiológicas convencionais, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9 – Espécies de enterobactérias identificadas por análises microbiológicas de amostras de carnes bovinas refrigeradas embaladas a vácuo com distensão da embalagem

Amostras	Microrganismos
1	<i>H. alvei</i> e <i>C. braakii</i>
2	<i>H. alvei</i> e <i>C. braakii</i>
3	<i>H. alvei</i> e <i>Pantoea</i> spp.
4	<i>H. alvei</i>
6	<i>H. alvei</i> e <i>S. liquefaciens</i>
8	<i>H. alvei</i>
9	<i>H. alvei</i>
10	<i>H. alvei</i>
11	<i>H. alvei</i> e <i>S. liquefaciens</i>
12	<i>H. alvei</i>
13(-)	-
14	<i>H. alvei</i> e <i>Y. enterocolitica</i>
15	<i>H. alvei</i>

(-) Não detecção de microrganismos nas amostras de carne

Este resultado sugere a possível contaminação do ambiente de abate, pois estudos comprovam a presença de *H. alvei* na água e no solo (JANDA; ABBOTT, 2006). Além disso, o gênero *Hafnia* é um microrganismo anaeróbico facultativo (JANDA; ABBOTT, 2006), o que torna o ambiente da carne embalada a vácuo favorável ao seu crescimento.

A elevada ocorrência de *H. alvei* nas amostras de carne deste estudo estão de acordo com os resultados encontrados por Felipe (2008) que identificou *Hafnia alvei* com maior frequência (18,5%) em amostras de carne bovina embaladas a vácuo com deterioração tipo *blown pack*. Outras pesquisas também reforçam a presença dessa enterobactéria como possível deteriorante de carnes com problemas de *blown pack* (HANNA et al., 1979; BOEREMA et al., 2002), podendo ainda ser encontrada em 50% dos isolados entéricos de carne bovina refrigerada (LINDBERG et al., 1998; RIDELL; KORKEALA, 1997). Resultados similares ao deste estudo foram observados por BRIGHTWELL et al. (2007), que identificaram em carnes com deterioração *blown pack*, além de *H. alvei*, outras enterobactérias, como *S. liquefaciens* e *Y. enterocolitica*.

Assim como no presente trabalho, Brenner (1992) também detectou gêneros de enterobactérias entre eles *Citrobacter*, *Hafnia* e *Yersinia* em carnes e produtos cárneos deteriorados. Porém Felipe (2008) detectou esses mesmos gêneros em amostras de carne bovina embalada a vácuo refrigerada não deteriorada, o que mostra que essas bactérias podem ser encontradas nesse tipo de produto, com ou sem deterioração, indicando que a deterioração poderá ocorrer não apenas pela presença destes microrganismos na carne, mas pela quantidade em que se encontram, das condições que favoreçam seu desenvolvimento.

A enterobactéria *Y. enterocolitica* detectada neste trabalho, representa sério risco à saúde do consumidor, pois é um enteropatógeno invasivo para humanos que provoca sintomas clínicos intestinais e extra-intestinais que variam desde gastroenterite branda a linfadenite mesentérica e, em casos raros, pode evoluir para septicemia. Assim como no presente trabalho, *Y. enterocolitica* foi encontrada em amostras de carne bovina crua, indicando que além de microrganismos deteriorantes, as carnes embaladas a vácuo com problemas de *blown pack* podem apresentar microrganismos potencialmente patogênicos (MAURO et al., 2008).

Quanto à enumeração de enterobactérias nas amostras de carne, os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Contagem de *Enterobacteriaceae* totais em amostras de carnes embaladas a vácuo

Amostras	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/ml)			
	35°C		25°C	
	24h	24h	72h	120h
1	4,3x10 ⁶	2,3x10 ⁶	2,6x10 ⁶	3,3x10 ⁶
2	4,5x10 ⁶	3,9x10 ⁶	4,0x10 ⁶	4,2x10 ⁶
3	1,0x10 ⁶	4,9x10 ⁵	2,6x10 ⁶	9,6x10 ⁶
4	2,8x10 ⁵	1,2x10 ⁵	1,9x10 ⁵	2,0x10 ⁵
6	8,6x10 ⁵	4,8x10 ⁵	5,2x10 ⁵	5,2x10 ⁵
8	3,9x10 ⁶	3,5x10 ⁶	4,7x10 ⁶	4,7x10 ⁶
9	8,5x10 ⁶	8,4x10 ⁶	1,3x10 ⁷	1,3x10 ⁷
10	4,0x10 ⁸	3,5x10 ⁸	3,8x10 ⁸	3,8x10 ⁸
11	5,0x10 ⁵	6,7x10 ⁵	8,0x10 ⁵	8,0x10 ⁵
12	1,0x10 ¹	<10	2,2x10 ²	2,2x10 ²
13	<10	<10	2,3x10 ²	2,5x10 ²
14	1,4x10 ²	4,0x10 ¹	1,0x10 ²	1,6x10 ²
15	6,3x10 ⁵	4,1x10 ⁵	8,4x10 ⁵	8,4x10 ⁵

4.3 Comparação entre as técnicas de T-RFLP e de microbiologia convencional para detecção de enterobactérias.

O método de T-RFLP se mostrou eficaz para a detecção da microbiota dominante nas amostras avaliadas neste estudo, por permitir um diagnóstico rápido e preciso especialmente para microrganismos de difícil cultivo como os anaeróbios estritos, como no caso dos clostrídios. Estes resultados estão de acordo com Tanaka et al. (2010) que demonstraram que este método é uma ferramenta poderosa para avaliar a diversidade de bactérias além de ser uma técnica de rápida determinação da comunidade microbiana, o que é interessante para as empresas de alimentos.

A utilização de três enzimas de restrição melhorou a resolução taxonômica da técnica de T-RFLP, oferecendo uma interpretação mais confiável dos resultados, concordando com Nieminen et al. (2011) que conseguiram melhores resultados utilizando três enzimas de restrição nas análises de T-RFLP, na caracterização de comunidades de bactérias psicrotróficas presentes em carnes embaladas em atmosfera modificada.

Pelo sistema API 20E utilizado nas análises microbiológicas, foi possível a identificação de cinco gêneros de enterobactérias em doze das treze amostras analisadas neste estudo. Pesquisas recentes mostram a utilização deste sistema (BAI et al., 2010; ZAMAN et al., 2010), comprovando a eficiência desta técnica, corroborando com os resultados do presente trabalho.

Pelas análises microbiológicas convencionais detectou-se *H. alvei* em uma maior quantidade de amostras de carne analisadas (92,30%), do que com a técnica de T-RFLP, que identificou este microrganismo em menor número de amostras (46,66%). Isto pode ter ocorrido devido ao volume reduzido do exsudado coletado das amostras para a extração de DNA nas análises moleculares, impossibilitando a obtenção de quantidade suficiente de microrganismos viáveis, o que possivelmente restringiu a posterior amplificação da região 16S rRNA por PCR (NOCKER et al., 2007; NIEMINEN et al., 2011). Limitações da técnica T-RFLP, tais como a formação de hetero-dúplex de DNA durante a PCR, que prejudica a digestão pelas endonucleases, e a presença de múltiplas cópias do gene 16S rRNA dentro de uma única espécie com apenas pouco sítios de restrição (FARRELLY et al., 1995) podem ter contribuído para a não detecção de *S. liquefaciens* nas amostras 16 e 17 por T-RFLP (Tabela 11). Assim, análises de microbiologia convencional associadas a análises moleculares foram necessárias para se confirmar a presença de contaminantes nas amostras estudadas.

Tabela 11 - Relação dos resultados de T-RFLP e API 20 E

Microorganismos		
Amostras	Análise T-RFLP	Análise API 20E
1	-	<i>H. alvei</i> e <i>C. braakii</i>
2	<i>H. alvei</i>	<i>H. alvei</i> e <i>C. braakii</i>
3	<i>S. liquefaciens</i> e <i>L. sakei</i>	<i>H. alvei</i> e <i>Pantoea</i> spp.
4	-	<i>H. alvei</i>
6	<i>C. algidicarnis</i> e <i>C. putrefaciens</i>	<i>H. alvei</i> e <i>S. liquefaciens</i>
8	<i>H. alvei</i> e <i>S. liquefaciens</i>	<i>H. alvei</i>
9	-	<i>H. alvei</i>
10	-	<i>H. alvei</i>
11	<i>C. gasigenes</i> , <i>C. algidicarnis</i> , <i>C. putrefaciens</i>	<i>H. alvei</i> e <i>S. liquefaciens</i>
12	<i>C. algidicarnis</i> , <i>C. putrefaciens</i> , <i>H. alvei</i> , <i>S. liquefaciens</i>	<i>H. alvei</i>
13	-	-
14	-	<i>H. alvei</i> e <i>Y. enterocolitica</i>
15	<i>H. alvei</i> e <i>L. sakei</i>	<i>H. alvei</i>

(-) Não detecção de microrganismos

O microrganismo *S. liquefaciens* foi identificado por ambas as metodologias, comprovando sua presença em carnes com deterioração tipo *blown pack* (BOEREMA et al., 2002; BRIGHTWELL et al., 2007; FELIPE, 2008). Porém a técnica de T-RFLP pode detectar esse microrganismo em maior número de amostras (23%) do que as análises microbiológicas convencionais (15,38%). A não detecção da bactéria por microbiologia convencional sugere que a escolha aleatória das colônias no meio VRBG para crescimento em ágar Mac Conkey não foi bem sucedida ou que o microrganismo estava em estado não cultivável (NIEMINEN et al., 2011).

Foi possível concluir neste estudo que a associação do método T-RFLP com a análises microbiológicas convencionais foi eficaz na identificação das espécies de bactérias psicrotólicas envolvidas com a deterioração tipo *blown pack* em carnes refrigeradas embaladas a vácuo.

4.4 Identificação de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* pela técnica de PCR

As análises para o isolamento e posterior identificação por PCR de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foram realizadas com o objetivo de complementar os resultados do presente trabalho. Esses microrganismos foram escolhidos devido a sua associação frequente na deterioração tipo *blown pack*, relatada em estudos anteriores (DANTY et al., 1989; BRODA et al., 2000; BRODA et al., 2003; BOEREMA et al., 2003).

Entretanto, para a identificação dos isolados, só foi possível a obtenção dos resultados para *C. estertheticum*, devido à contaminação dos reagentes durante a prática deste trabalho, prejudicando assim a identificação de *C. gasigenes* nas amostras deste estudo.

Os resultados obtidos no isolamento e posterior identificação pela técnica de PCR de *C. estertheticum* mostraram a ausência deste microrganismo nas 13 amostras analisadas (Figura 19).

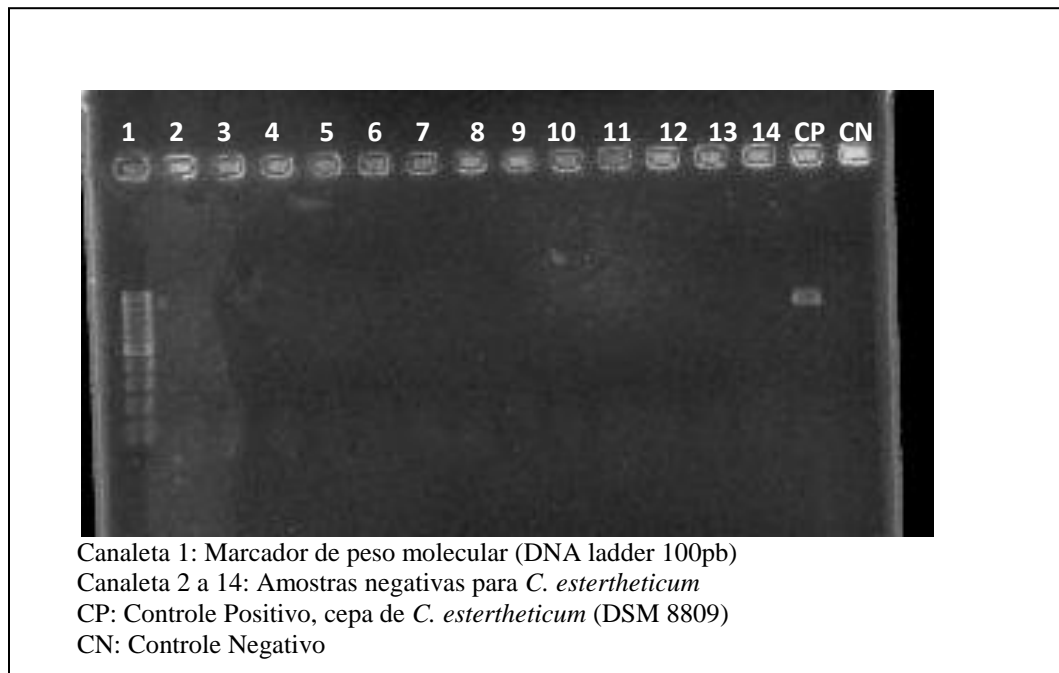


Figura 19 - Representação em gel de agarose (1%) contendo produtos de PCR para detecção de *C. estertheticum* em amostras de carne bovina embaladas a vácuo com deterioração tipo *blown pack*

Estes resultados estão de acordo com os encontrados nas análises de T-RFLP, confirmando a não detecção de *C. estertheticum* pelas duas técnicas moleculares (PCR e T-RFLP). Isso pode ter ocorrido pela ausência de *C. estertheticum* nas amostras. Ainda, de acordo com Yang et al. (2011), é possível que o número de esporos de *C. estertheticum* seja influenciado por bactérias lácticas envolvidas na deterioração tipo *blown pack*, pois estas utilizam a glicose para produção de ácido láctico, sendo que este processo tende a reduzir o pH na superfície da carne, local onde ocorre o desenvolvimento dos microrganismos (JONES, 2004). Dessa forma, as bactérias lácticas não somente competem com o *C. estertheticum* pela glicose disponível como também inibem a presença deste microrganismo no ambiente proporcionado pela carne embalada a vácuo.

Neste estudo foram utilizados somente dois padrões de bactérias lácticas nas análises de T-RFLP - *L. sakei* (ATCC 15521) e *Leuc. mesenteroides* (ATCC 8293). Seria necessária uma maior diversidade de padrões de microrganismos desta família para se poder detectar a eventual presença de outras bactérias lácticas nas amostras de carne embaladas a vácuo com deterioração *blown pack* e assim, a atribuir possível inibição de *C. estertheticum* por esse grupo de microrganismo.

5 Conclusões

- ✓ O método T-RFLP mostrou-se eficaz na detecção dos principais microrganismos contaminantes nas amostras de carnes embaladas a vácuo.
- ✓ Foram identificadas por T-RFLP espécies de grupos de bactérias comumente envolvidos nesse tipo de deterioração: enterobactérias, bactérias lácticas e clostrídios.
- ✓ As endonucleases utilizadas nas análises de T-RFLP que apresentaram maior eficiência em detectar as sequências de DNA das amostras foram *HhaI*, *MspI*, e *HaeIII*, mostrando que estas seriam as mais apropriadas para o uso em estudos com amostras procedentes de carnes.
- ✓ As análises microbiológicas convencionais mostraram-se eficientes na detecção de enterobactérias presentes nas amostras com deterioração tipo *blown pack*.
- ✓ Os resultados demonstram a importância da associação de métodos convencionais de cultivo e técnicas moleculares, pois a utilização em conjunto da técnica T-RFLP com as análises microbiológicas convencionais possibilitou identificar um maior número de enterobactérias do que cada uma das técnicas isoladamente.
- ✓ As técnicas de PCR assim como T-RFLP não identificaram *C.estertheticum* nas amostras de carnes com problemas de *blown pack*, sugerindo sua ausência ou baixa contaminação da carne por este microrganismo.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.R.; HALL, C.J. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. **International Journal of Food Science and Technology**, Guildford, v. 23, n. 3, p. 297-301, 1988.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA PECUÁRIA – ANUALPEC, São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2010. 369 p.
- AXELSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: _____. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1993.
- BAI, L.; LIU, X.; FU, P.; GUO, Y. Serotyping and virulence genes of suspected *Escherichia coli* O157 strains in food from 2005 to 2007. **Institute of Nutrition and Food Safety**, Beijing, v. 39, n. 3, p. 335-8, 2010.
- BEEL, R.G. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, p. 292-300, 1997.
- BELL, R.G.; MOORHEAD, S.M.; BRODA, D.M. Influence of heat shrink treatments on the onset of clostridial “blown pack” spoilage of vacuum packed chilled meat. **Food Research International**, Hamilton, v. 34, p. 271–275, 2001.
- BOEREMA, J.A.; BRODA, D.M.; PENNEY, N.; BRIGHTWELL, G. Influence of peroxyacetic acid-based carcass rinse on the onset of “blown pack” spoilage in artificially inoculated vacuum-packed chilled beef. **Journal of Food Protection**, Hamilton, v. 70, n. 6, p. 1434–1439, 2007.
- BOEREMA, J.A.; BRODA, D.M.; BELL, R.G. PCR detection of psychrotolerant clostridia associated with deep tissue spoilage of vacuum-packed meats. **Letters in Applied Microbiology**, Hamilton, v. 35, p. 446-450, 2002.
- _____. 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**, Hamilton, v. 36, n. 6, p. 406- 411, 2003.
- BOLTON, D.; MOSCHONAS, J.; SHERIDAN, J.J. Isolation and sources of ‘blown pack’ spoilage clostridia in beef abattoirs. **Journal of Applied Microbiology**, Teagasc, v. 107, p.616-624, Aug.2009.
- BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M.L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, Kävlinge, v. 33, n. 1, p. 103–120, Nov.1996.
- BORCH, E., MOLIN, G. The aerobic growth and product formation of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix*, and *Carnobacterium* in batch cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Lund, v. 30, p. 81-88, 1989.

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.

BRANDÃO, F.T.; FERREIRA JÚNIOR, J.C.; BRICHI, L.O.; MIRANDA, I.T.P. Exportação da Carne Bovina Nacional: Os desafios que o setor enfrentará nos próximos anos frente às novas exigências do mercado internacional. **Revista de Ciências Empresariais**, Maringá, v. 4, n. 2, p.7-14, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Boas Práticas Agropecuárias na Região Sudeste**. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/Members/acn/boas-praticas-agropecuarias-na-regiao-sudeste>>. Acesso, 20 /02/2011.

BRENNER, D.J. Introduction to the family *Enterobacteriaceae*, in the Prokaryotes. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. **A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. 2nd ed. New York: Springer Verlag, 1992. p. 2673-2695.

BRIGHTWELL, G.; CLEMENS, R.; URLICH, S.; BOEREMA, J. Possible involvement of psychrotolerant *Enterobacteriaceae* in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats. **International Journal of Food Microbiology**, Hamilton, v. 119, n. 3, p. 334–339, Nov. 2007.

BRIGHTWELL, G.; CLEMENS, R.; ADAM, K.; URLICH, S.; BOEREMA, J. Comparison of culture-dependent and independent techniques for characterization of the microflora of peroxyacetic acid treated, vacuum-packaged beef. **Food Microbiology**, Hamilton, v. 26, n. 3, p. 283-288, 2009.

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**, Hamilton, v. 29, 335-352, Apr. 1996.

BRODA, D.M.; De LACY, K.M.; BELL, R.G. Influence of culture media on the recovery of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of vacuum-packed chilled meats. **International Journal of Food Microbiology**, Hamilton, v. 39, p. 69-78, Jan. 1998.

BRODA, D.M.; LAWSON, P.A.; BELL, R.G.; MUSGRAVE, D.R. *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with “blown Pack” spoilage of vacuum-packed meats. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Hamilton, v. 49, p. 1539-1550, Oct. 1999.

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**, Hamilton, v. 88, n. 1, p. 107-116. Jan. 2000.

BRODA, D.M.; BELL, R.G.; BOEREMA, J.A.; MUSGRAVE, D.R. The abattoir source of culturable psychrophilic *Clostridium* spp. causing “blown pack” spoilage of vacuum-packed chilled venison. **Journal of Applied Microbiology**, Hamilton, v. 93, n. 5, 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 Applied Microbiology**, Hamilton, v. 94, n. 3, 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, v.45, n. 3, p. 336–341, Sep. 2007.

BRODA, D.M.; BOEREMA, J.A., BRIGHTWELL, G. Sources of psychrophilic and psychrotolerant clostridia causing spoilage of vacuum-packed chilled meats, as determined by PCR amplification procedure. **Journal of Applied Microbiology**, Hamilton, v. 107, n. 1, p.178-86, Jul. 2009.

BROMBERG, R.; OLIVEIRA, J.; JUNQUEIRA, V.C.A. Associação de *Clostridium* sp. psicrotrófico com deterioração de carne bovina embalada a vácuo. **Anais...** Porto Alegre: CBCTA, 2002.

_____. Microorganisms associated with “blown pack” spoilage of chilled vacuum-packed beef. **Anais...** Campinas: ICOMST, 2003.

BUENO, C.P.; MESQUITA, A.J.; MELO, C.S.; MESQUITA, A.Q.; REZENDE, C.S. M.; PRADO, C.S. Diagnóstico molecular de *Clostridium estertheticum estertheticum* e *Clostridium estertheticum* like em carnes refrigeradas embaladas a vácuo. **Anais...** , São Paulo: CBCTA, 2008.

CASTELANI, L.; DUARTE, K.M.R. **Métodos moleculares em microbiologia de alimentos**. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/imagens/artigos/422011-091440-duarte1000.pdf>>. Acesso em: 20 Mar. 2011.

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. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 235-240, 1992.

DAINTY, R.H.; EDWARDS, R.A.; HIBBARD, C.M. Time course of volatile compounds formation during refrigerated storage of naturally contaminated beef in air. **Journal of Applied Bacteriology**, Langford, v. 59, p. 303–309, Sept. 1985.

_____. Spoilage of vacuum-packaged beef by a *clostridium* sp. **Journal of Science Food and Agricultural**, Langford, v. 49, n. 4, p. 473-486, Sep. 1989.

DAINTY, R.H.; MACKAY, B.M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **Journal of Applied Bacteriology**, Matforsk, v. 73, p. 103- 114, Dec. 1992.

DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado. 1995. 142 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

DYKES, G.A.; MOORHEAD, S.M. Survival of *Campylobacter jejuni* on vacuum or carbon dioxide packaged primal beef cuts stored at -1,5°C. **Food Control**, Hamilton, v. 12, n. 8, p. 553-557, Dec. 2001.

EDWARDS, U.; ROGALL, T.; BLOCKER, H.; EMDE, M.; BOTTGER, E.C., Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, Hannover, v. 17, n. 19, p. 7843-7853. Oct. 1989.

EKBOIR, J.; JARVIS, L. S.; SUMNER, D.A.; BERVEJILLO, J.E.; SUTTON, W.R. Changes in foot and mouth disease status and evolving world beef markets. **An International Journal Agribusiness**, Hoboken, v. 18, n. 2, p. 213-229, Apr. 2002.

ELEY, A. New Molecular Methods for the Detection of Bacteria in Food. **Nutrition & Food Science**, Sheffield, v. 93, p. 9 - 13, 1993.

ERCOLINI, D.; LA STORIA, A.; VILLANI, F.; MAURIELLO, G. Effect of a bacteriocin-activated polyethylene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. **Journal of Applied Microbiology**, Naples, v. 100, n. 4, p. 765-772. Apr. 2006.

EUSTACE, I.; MIDGLEY, J.; GIARRUSSO, C.; LAURENT, C.; JENSON, I.; SUMNER, J. An alternative process for cleaning knives used on meat slaughter floors. **International Journal of Food Microbiology**, North Sydney, v. 113, n. 1, p. 23-27, Jan. 2007.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo. Ateneu, 2003. 652 p.

FABER, J.M. Microbiological aspect of modified atmosphere packaging technology. **Journal of Food Protection**, Washington, v. 54, n. 1, p. 58-70, 1991.

FARBER, J.M.; GENDEL, S.M.; TYLER, K.D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W.L.; FRITSCHER, S.J.; BARRETT, T.J. Molecular typing and differentiation. In: _____. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, Washington: APHA, 2001, cap. 11, p. 127-158.

FARRELLY, V.; RAINEY, F.A.; STACKEBRANDT, E. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. **Applied and Environmental Microbiology**, Braunschweig, v. 61, n. 7, p. 2798-2801, July. 1995.

FELIPE, L.M. **Associação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Clostridium estertheticum* com a deterioração “blown pack” em cortes cárneos embalados a vácuo.** 2008. 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

FERRAZ, J.V. **Setor de carnes terá produção e consumo maiores em 2011.** Disponível em: <http://www.abiec.com.br/news_view.asp?id=%7B3C8447AB-0F7C-4E30-B767-C15CC02B4CCE%7D>. Acesso em: 24 Fev. 2011.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELEIN, C.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in Milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, Berne, v. 70, n. 5, p. 372-379, May. 1991.

GANDRA, E.A.; GANDRA, T.K.V.; DE MELLO, W.S.; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GILL, C.O. A review: intrinsic bacteria in meat. **Journal of Applied Bacteriology**, Hamilton, v. 47, n. 2, p. 367-378, 1979.

_____. Visible contamination on animals and carcasses and the microbiological conditions of meat. **Journal of Food Protection**, Lacombe, v. 67, n. 2, p. 413-419, 2004.

_____. Spoilage, factors affecting. In: JENSEN, W. J.; DEVINE, C. E.; DIKEMAN, M. (Ed.), **Encyclopedia of meat science**. Oxford, Elsevier Ltd, 2004. p. 1324–1330.

GOMIDE, L.A.M.; RAMOS, E.M.; FONTES, P.R. **Tecnologia de abate e tipificação de carcaças**. Viçosa: UFV, 2006. 370 p.

GORDON, D.M; FITZGIBBON, F. The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: Host and geographical effects. **Microbiology**, Canberra, v. 145, p. 2663-2671, Oct. 1999.

GRUNTZIG, V.; STRES, B.; AYALA DEL RIO, H.L.; TIEDJE J. M. **Improved protocol for T-RFLP by capillary electrophoresis.** Disponível em: http://rdp.cme.msu.edu/html/trflp_jul02.html. Acesso em: 10 de fev. de 2011.

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.

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

HOLDEMAN, L.V.; CATO, E.P.; MOORE, W.E.C. **Anaerobe laboratory manual**, Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977. 152 p.

HOLLEY, R.A.; GILL, C.O. **Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos**. Disponível em: <www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro_congresso/5.doc>. Acesso em: 19 de fev. 2011.

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**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

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.

HUITT, W. J. Um Perfil das indústrias de carnes e de seu futuro. **Revista de Administração de Empresas**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p.49-58. 1981.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Abate bovino tem alta de 7,2% entre 1º e 2º trimestres, 2010. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias>>. Acesso em: 25 fev. 2011.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD. ICMSF. **Microorganismos de los alimentos. 1: su significado y métodos de enumeración**. 2ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 439 p.

JAY, J.M. Food preservation with modified atmospheres. In: HELDMAN, D.R. (Ed.) **Modern food microbiology**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. p. 283-295.

_____. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artemed, 2005. 711 p.

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

JEREMIAH, L.E. Packaging alternatives to deliver fresh meats using short – or long – term distribution. **Food Reserch International**, Barking, v. 34, n. 9, p. 749-72, 2001.

JERICHO, K.W.F.; BRADLEY, J.A.; GANNON, V.P.J.; KOZUB, G.C. Visual demerit and microbiological evolution of beef carcasses: methodology. **Journal of Food Protection**, Beltsville, v. 56, n. 2, p. 114-119, Feb. 1993.

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

KALCHAYANAND, N.; RAY, B.; FIELD, R.A.; JOHNSON, M.C. Spoilage of vacuum-packaged refrigerated beef by *Clostridium*. **Journal of Food Protection**, Laramie, v. 52, p. 424–426. 1989.

KALCHAYANAND, N.; RAY, B.; FIELD, R.A. Characteristics of *Clostridium laramie*, a new psychrotrophic species, associated with spoilage of vacuum-packaged fresh beef. **American Society of Animal Science**, Laramie, v. 42, p. 26–29. 1991.

_____. Characteristics of psychrotrophic *Clostridium laramie* causing spoilage of vacuum-packaged refrigerated fresh and roasted beef. **Journal of Food Protection**, Laramie, v. 56, p. 13–17, 1993.

KOCHER, T.D.; WILSON, A.C. DNA amplification by the polymerase chain restriction. In: BROWN, T.A. **Essential molecular biology: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1991. v. 2, p. 185–207.

KONEMAM, E.W.; STEPHEN D.A.; WILLIAM M.J. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2001. 1465 p.

KORKEALA, H.; SUORTTI, T.; MAKELA, P. Ropy slime formation in vacuum-packed cooked meat products caused by homofermentative lactobacilli and a *Leuconostoc* species. **International Journal of Food Microbiology**, Helsinki, v. 7, n. 4, p. 339–347, Dec. 1988.

KOUTSOUMANIS, K.P.; SOFOS, J.N. Microbial contamination of carcasses and cuts. In: JENSENS, W.K.. **Encyclopedia of meat sciences**. Amsterdam: Elsevier, 2004.

LAMBERT, A.D.; SMITH, J.P.; DODDS, K.I. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat – a review. **Food Microbiology**, London, v. 8, p. 267–297, 1991.

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* sp. nov. **Letters in Applied Microbiology**, Reading, v. 19, p. 153–157, 1994.

LINDBERG, A.M.; LJUNGH, A.; AHRNÉ, S.; LÖFDAHL, S.; 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**, Lund, v. 39, p. 11–17, Jan. 1998.

LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Michigan, v. 63, p. 4516–4522, Nov. 1997.

LUCHIARI FILHO, A. Produção de carne bovina no Brasil: qualidade, quantidade ou ambas? **II SIMBOI – Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte**, Brasília (2006). Disponível em: <<http://www.upis.br/simboi/anais/Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20Carne%20Bovina%20no%20Brasil%20Albino%20Luchiari%20Filho>>. Acesso em: 10 mai. 2011.

LUND, B.; PECK, W. Heat resistance and recovery of spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* in relation to refrigerated, processed foods with an extended shelf-life, **Journal of Applied Bacteriology**, Colney, v. 76, p. 115-128, 1994.

MALAKAR, P.K.; BARKER, G.C.; ZWIETERING, M.H.; VAN'T RIET, K. Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, Colney, v. 84, p. 263–272, 2003.

MALORNY, B.; TASSIOS, P.T.; RADSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

MANTINS, F.; BURRIEL, A.; SABATAKOU, O.; VACALOPOULOS, A.; RAMANTANIS, S. Some factors determining the shelf life of vacuum packed heat-treated Greek sausages. **Veterinary Archivis**, Athens, v. 77, n. 3, p. 229-235, June. 2007.

MAURO, A.; LAGANÀ, P.; BRUNO, G.; MICALI, M.; MINUTOLI, E.; DELIA, S. Isolation of *Yersinia enterocolitica* biotype 1. A from raw meat products. **The Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, Messina, v. 49, n. 2, p. 75-78, June. 2008.

MARSH, T.L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Michigan, v. 66, n. 8, p. 3616–3620, Aug. 2000.

MOSCHONAS, G.; BOLTON, D.J.; SHERIDAN, J. J.; MCDOWELL, D. A. Isolation and sources of 'blown pack' spoilage clostridia in beef abattoirs. **Journal of Applied Microbiology**, Dublin, v. 107, n. 2, p. 616-624, Mar. 2009.

_____. The effect of storage temperature and inoculum level on the time of onset of 'blown pack' spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, Dublin, v. 108, p. 532–539, 2010.

NATTRESS, F.M.; JEREMIAH, L.E. Bacterial mediated off-flavours in retail-ready beef after storage in controlled atmospheres. **Food Research International**, Lacombe, v. 33, p. 743–748, Feb. 2000.

NIEMINEN, T.T.; VIHAVAINEN, E.; PALORANTA, A.; LEHTO, J.; PAULIN, L.; AUVINEN, P.; SOLISMAA, M.; BJÖRKROTH, K.J. Characterization of psychrotrophic bacterial communities in modified atmosphere-packed meat with terminal restriction fragment length polymorphism. **International Journal of Food Microbiology**, Helsinki, v. 144, n. 3, p. 360-366, Jan. 2010.

- NYCHAS, G.E.; DROSINOS, E.H. Meat and poultry/spoilage of meat. In: ROBINSON, R.K. (Ed.). **Encyclopedia of food microbiology**. Oxford: Elsevier, 1999. p. 1253–1260.
- NYCHAS, G.E.; SKANDAMIS, P.N.; TASSOU, C.C.; KOUTSOUMANIS, K.P. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, Athens, v. 78, p. 77–89, 2008.
- NOCKER, A.; BURR, M.; CAMPER, A.K. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. **Microbial Ecology**, Bozeman, v. 54, p. 276–289. 2007.
- NOTTINGHAM, P.M. Microbiology of carcass meats. In: BROWN, M.H. **Meat microbiology**. London: Applied Science, 1982. p. 13–65.
- NUCERA, D.M.; MADDOX, C.W.; DALEN, P.H.; WEIGEL, R.M. Comparison of API 20E and *invA* PCR for Identification of *Salmonella enterica* Isolates from Swine Production Units. **Journal of Clinical Microbiology**, Illinois, v. 44, n. 9, p. 3388–3390, 2006.
- OLIVO, N. **Mercado mundial de carnes**. 50 ed. Criciúma: Ed. do autor, 2008. 154 p.
- OSBORN, A.M.; MOORE, E.R.B.; TIMMIS, K.N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiology**, Braunschweig, v. 2, n. 1, p. 39–50, Feb. 2000.
- PORTO, E. Microbiologia de carnes. In: CASTILLO, C.J. **Qualidade da carne**. São Paulo: Varela, 2006. p.101–127.
- RAUECKER, U.N.; DEL'ACQUA, T.V.; MESQUITA, A.Q., NUNES, I.A.; MESQUITA, A.J. Detecção de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* incriminados na deterioração de carnes bovinas refrigeradas embaladas a vácuo através da técnica de PCR. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG-CONPEEX, 3.; 2006, Goiânia.
- RAUECKER, U.N. ***Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes* em carne resfriada, carcaças, equipamentos e ambiente de matadouros-frigoríficos de diferentes estados brasileiros**. 2007. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - 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: BARNES, E. M.; MEAD, G.C. **Anaerobic bacteria in habitats other than man**, Oxford: Blackwell, 1986. p. 333–349.
- ROÇA, R.O.; CARAMORI JÚNIOR, J.; GOMES, L.A.; JOAQUIM, C. Avaliação da contaminação microbiana durante o abate Kasher de bovinos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 82–87, 2002.

ROSA, V.P. *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*: **Detecção, isolamento, rastreamento e controle em empresas produtoras e exportadoras de carnes bovinas resfriadas embaladas a vácuo**. 2008. 168 p. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SAKALA, R.M.; HAYASHIDANI, H.; KATO, Y.; HIRATA, T., MAKINO, U.; FUKUSHIMA, A.; YAMADA, T.; KANEUCHI, C.; OGAWA, M. Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *International Journal of Food Microbiology*, Sagami-hara, v. 74, n.1-2, p. 87-99, 2002.

SHERIDAN, J.J.; SHERINGTON, J. The microbiology of hot and conventionally deboned vacuum packaged beef. *Meat Science*, Castleknock, v. 7, p. 245-258, Oct. 1982.

SHERIDAN, J.J. Sources of contamination during slaughter and measures for control. *Journal of Food Safety*, Trumbull, v.18, n.4, p. 321-339, Dec. 1998.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; DOS SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. p. 112-114,

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*, Braunschweig, v. 53, p. 1019-1029, Jul. 2003.

STENTZ, R.; CORNET, M.; CHAILLOU, S.; ZAGOREC, M. Adaptation of *Lactobacillus sakei* to meat: a new regulatory mechanism of ribose utilization? *Dairy Science and Technology*, Jouy-en-Josas, v. 81, n. 1-2, Jan./Apr. 2001.

STILES, M.E.; KING, L. *Enterobacteriaceae* associated with meats and meat handling. *Applied and Environmental Microbiology*, Alberta, v. 41, n. 4, p. 867-872, 1980.

TANAKA, Y.; TAKAHASHI, H.; KITAZAWA, N.; KIMURA, B. Rapid estimation of microbial populations in fish samples by using terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA. *Journal of Food Protection*, Tokyo, v. 73, n. 1, p. 104-113, 2010.

THIES, J.E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphism. *Soil Science Society of American Journal*, Ithaca, v. 71, n. 2, p. 579-571, 2007.

TIEDJE, J.M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NISSLEIN, K.; MARSH, T.L.; FLYNN, S.J. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, Michigan, v. 13, p. 109-122, 1999.

VON HOLY, A.; CIOETE, T.E.; DYKES, G.A. Quantification and characterization of microbial populations associated with spoiled. Vacuum-packed Vienna sausages. **Food Microbiology**, Johannesburg, v. 8, p. 95-104. 1991.

WANG, M.; AHRNÉ, S.; ANTONSSON, M.; MOLIN, G. T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA gene sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of different ages. **Journal Microbiology Methods**, Lund, v. 59, p. 53-69, 2004.

WILSON, K.H.; BLITCHINGTON, R.B.; GREEN, R.C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Durham, v. 28, p. 1942–1946, Sep. 1990.

YANG, X.; GILL, C.O.; BALAMURUGAN, S. Effects of temperature and pH on the growth of bacteria isolated from blown packs of vacuum-packaged beef. **Journal of Food Protection**, Lacombe, v.72, n.11, p. 2380–2385, 2009.

YANG, X.; BALAMURUGAN, S.; GILL, C.O. Effects on the development of blown pack spoilage of the initial numbers of *Clostridium estertheticum* spores and *Leuconostoc mesenteroides* on vacuum packed beef. **Meat Science**, Lacombe, v. 88, p. 361–367. 2011.

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.

ZAMAN, C.; OSAKI, T.; HANAWA, T.; YONEZAWA, H.; KURATA, S.; KAMIYA, S. Analysis of the microflora in the stomach of Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Mitaka, v. 25, p. 11-14, 2010.