



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**



**“AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DO POTENCIAL DE ESTUFAMENTO POR  
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS E ENTEROBACTÉRIAS EM CORTES BOVINOS  
EMBALADOS A VÁCUO”**

**RAFAEL DJALMA CHAVES**

*Biólogo*

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Pilar Rodriguez de Massaguer, PhD.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Mestre em  
Ciência de Alimentos

**Campinas – SP**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C398a Chaves, Rafael Djalma  
Avaliação microbiológica e do potencial de estufamento por  
bactérias ácido lácticas enterobactérias em cortes bovinos embalados a  
vácuo / Rafael Djalma Chaves. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Pilar Rodríguez de Massaguer  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Microbiologia. 2. Bactérias produtoras de ácido láctico. 3.  
Enterobactérias. 4. Carne embalada a vácuo. I. Massaguer, Pilar  
Rodríguez de . II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Microbiological evaluation and assessment of blowing ability by lactic acid  
bacteria and enterobacteriaceae in vacuum packed re meat

Palavras-chave em inglês (Keywords): Microbiology, Lactic acid bactéria, Enterobacteriaceae,  
Vacuum Packed meat

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Pilar Rodriguez de Massaguer

José Luiz Pereira

Cristiana de Paula Pacheco

Data de defesa: 09/04/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

***BANCA EXAMINADORA***

---

**Profª Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer**  
**Orientadora**

---

**Prof. Dr. José Luiz Pereira**  
**Membro**

---

**Profª. Dra. Cristiana de Paula Pacheco**  
**Membro**

---

**Profº. Dr. Pedro Eduardo de Felício**  
**Membro - Suplente**

---

**Profº. Dr. Tomomasa Yano**  
**Membro - Suplente**

*Aos meus pais e à minha irmã, dedico*

## ***AGRADECIMENTOS***

- ❖ Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais e à minha irmã Rita, pelo apoio e incentivo à minha carreira;
- ❖ Aos meus amigos: Marcão, Felipe e Bread, meus atuais companheiros de moradia, ao Lauro, Shin, Daniel, Jorge, Vinícius Bitão, Rafael Garden, Renato, amigos da turma 2000 noturno de Biologia da Unicamp; Alessandro, pela amizade e consultoria estatística, e a tantos outros (felizmente, seria difícil citar todos), pelos momentos de alegrias e tristezas compartilhados ao longo desses 10 anos de vida universitária;
- ❖ À professora Pilar, por ter me aberto as portas de seu laboratório e dado esta oportunidade única;
- ❖ A todos colegas (e amigos) do laboratório de Termobacteriologia da FEA: Cris, que me ajudou no início e agora no fim da minha tese; aos amigos que saíram antes: Salatir, Verônica, Alessandra Reyes e Eli, pelos ótimos momentos juntos; e em especial à Alessandra Regina, por ter me acompanhado desde o início e ao longo de toda a elaboração desta tese, seja com ajuda prática, teórica ou pelo simples prazer da companhia. A todos vocês, muito obrigado!
- ❖ Ao professor José Luiz, pela oportunidade de aprender um pouco mais em suas disciplinas ao atuar como PED e pela continuidade de meus estudos.
- ❖ Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos no período de pesquisa.

*“As falhas dos homens eternizam-se no bronze. As suas virtudes escrevemos na  
água.”*  
William Shakespeare

*“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em  
levantarmo-nos sempre depois de cada queda.”*  
Confúcio

## ÍNDICE

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	4
1. INTRODUÇÃO .....	6
2. OBJETIVOS .....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. Embalagens versus conservação de alimentos.....	14
3.1.1. Acondicionamento a vácuo .....	15
3.2. Alterações físico-químicas e microbiológicas da carne no período do post-mortem.....	17
3.2.1. Deteriorantes de carnes embaladas a vácuo.....	20
3.3. Caracterização dos principais grupos de micro-organismos relacionados à deterioração de carnes e produtos cárneos.....	26
3.3.1. Cocos Gram positivos .....	26
3.3.2. Bastonetes Gram positivos formadores de esporos .....	27
3.3.3. Bastonetes Gram negativos .....	28
3.3.4. Identificação em nível molecular .....	34
4. METODOLOGIA.....	35
4.1. Caracterização das amostras de cortes bovinos embalados a vácuo.....	35
4.3. Coleta das amostras provenientes dos cortes cárneos - Superfície.....	36
4.4. Enumeração e isolamento de micro-organismos a partir dos cortes bovinos (BAL e enterobactérias).....	37
4.5. Caracterização dos isolados obtidos (BAL e enterobactérias) .....	38
4.6. Identificação dos isolados (BAL e enterobactérias).....	40
4.7. Recuperação de BAL e enterobactérias provenientes da linha de produção do frigorífico parceiro.....	43
4.8. Manutenção das culturas obtidas a partir das amostras de carne e da linha de produção do frigorífico parceiro.....	47
4.9. Teste de reprodução do defeito de estufamento das embalagens.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
5.1. Enumeração de bactérias ácido lácticas (BAL) .....	56
5.2. Enumeração de enterobactérias .....	60
5.3. Caracterização das culturas de BAL e enterobactérias isoladas a partir dos cortes cárneos deteriorados e não deteriorados analisados e a partir de levantamento na linha de produção do frigorífico.....	64
5.4. Identificação dos isolados .....	72

5.4.1. Bactérias ácido lácticas .....	72
5.4.2. Enterobactérias .....	74
5.5. Reprodução do defeito de estufamento das embalagens .....	81
6. CONCLUSÕES .....	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
8. ANEXO 1 – MEIOS DE CULTURA MODIFICADOS.....	108
9. ANEXO 2 – PERFIL DE FERMENTAÇÃO DOS ISOLADOS .....	110

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Permeabilidade de diferentes gases em diferentes materiais (adaptado de Brown, 1992).....	15
Tabela 2. Grupos, em nível de gênero, de bactérias Gram positivas de importância em alimentos.....	32
Tabela 3. Revisão das propriedades determinativas de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	32
Tabela 4. Chave de agrupamento em nível de gênero de bactérias Gram negativas importantes na deterioração de produtos cárneos.....	33
Tabela 5. Codificação e temperatura observada nos pontos de coleta.....	44
Tabela 6. Condições e tempos de incubação para os isolados provenientes de cortes bovinos e do frigorífico parceiro de enterobactérias, BAL e <i>Pseudomonas</i> utilizados para teste de reprodução de defeito.....	52
Tabela 7. Caracterização das amostras deterioradas de cortes bovinos.....	52
Tabela 8. Caracterização das amostras não deterioradas de cortes bovinos.....	55
Tabela 9. Enumeração de BAL em amostras de cortes bovinos embalados a vácuo.....	56
Tabela 10. Contagens de enterobactérias em cortes bovinos, deteriorados e não deteriorados, embalados a vácuo.....	60
Tabela 11. Caracterização morfológica e microscópica dos isolados provenientes de MRS Agar em cortes bovinos deteriorados.....	65
Tabela 12. Caracterização morfológica e microscópica dos isolados provenientes de MRS Agar em cortes bovinos não deteriorados.....	66
Tabela 13. Caracterização morfológica e microscópica dos isolados provenientes de VRBA modificado em cortes bovinos deteriorados.....	68
Tabela 14. Caracterização morfológica e microscópica dos isolados provenientes de VRBA modificado em cortes bovinos não deteriorados.....	69
Tabela 15. Caracterização dos isolados provenientes da linha de produção do frigorífico juntamente com as temperaturas encontradas em cada ponto.....	70
Tabela 16. Espécies de BAL provenientes das amostras bovinas (deterioradas e não deterioradas) e da linha de produção do frigorífico parceiro.....	72

Tabela 17. <b>Espécies de enterobactérias provenientes das amostras bovinas (deterioradas e não deterioradas)</b> .....	74
Tabela 18. <b>Identificação de enterobactérias provenientes da linha de processamento do frigorífico parceiro</b> .....	77
Tabela 19. <b>Resultados do teste de reprodução de defeito a partir de inoculação em bifes de contra-filé, para os isolados de enterobactérias e BAL, e leitura de pH do exsudato após abertura</b> .....	81
Tabela 20. <b>Enumeração e identificação de enterobactérias em VRBA modificado a partir de amostras provenientes de 4 semanas de ensaio de reprodução do defeito a 15°C</b> .....	82
Tabela 21. <b>Enumeração de BAL em MRS agar após 4 dias de incubação a 30°C em ambiente microaerofílico, a partir de micro-organismos provenientes de 4 semanas de ensaio de reprodução do defeito a 15°C</b> .....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Verificação de cores dos testes positivos e negativos do sistema API 50 CHL (acima) e API 20 E (abaixo).....	42
Figura 2. Retirada da camada excedente de gordura (esquerda) e eliminação da flora da superfície do corte com o auxílio de ferro de passar comum (direita).....	48
Figura 3. Inoculação da suspensão bacteriana ajustada em 10 <sup>8</sup> UFC/mL na superfície do bife. ....	49
Figura 4. Bife já inoculado e envolto por embalagem EVA multicamada no interior da seladora (esquerda) e banho ajustado em 83°C para realização do termo-encolhimento (direita).....	50
Figura 5. Bife embalado a vácuo e termoencolhido, já codificado, pronto para a incubação (esquerda) e bandeja com embalagens usadas em parte do estudo (direita).....	51
Figura 6. Distensão da embalagem após 4 semanas a 15°C em amostra inoculada com <i>Hafnia alvei</i> .....	87

## **ÍNDICE DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1. Comparação da contaminação por BAL provenientes de amostras deterioradas de cortes bovinos embalados a vácuo.....</b>	<b>57</b>
<b>Gráfico 2. Comparação da contaminação por BAL provenientes de amostras não deterioradas de cortes bovinos embalados a vácuo.....</b>	<b>57</b>
<b>Gráfico 3. Contagem de enterobactérias provenientes de amostras deterioradas.....</b>	<b>61</b>
<b>Gráfico 4. Contagem de enterobactérias provenientes de amostras não deterioradas.....</b>	<b>61</b>

# **“AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DO POTENCIAL DE ESTUFAMENTO POR BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS E ENTEROBACTÉRIAS EM CORTES BOVINOS EMBALADOS A VÁCUO”**

## **RESUMO**

Este trabalho teve como objetivos avaliar a microbiota de carnes embaladas a vácuo, em específico bactérias ácido lácticas (BAL) e enterobactérias. Para tanto foram analisadas 12 amostras de carne bovina brasileira embaladas a vácuo, sendo 7 deterioradas (5 contra-filé, 1 cupim e 1 picanha) e 5 não deterioradas (contra-filé).

As amostras foram cedidas por 2 frigoríficos do estado de São Paulo, com exceção de 3 amostras não deterioradas adquiridas em mercado localizado na cidade de Campinas. Foi realizada a avaliação visual e sensorial das amostras, bem como a enumeração e identificação dos isolados recuperados, para posterior utilização no ensaio de reprodução do defeito.

Foi analisada também a contaminação na linha de produção do frigorífico parceiro, desde o local de confinamento do gado até as esteiras de embalagem. As contagens da superfície da carne e do exsudato foram realizadas em meios específicos para cada grupo estudado: de Mann, Rogosa & Sharpe (MRS Agar, Difco) para BAL e Violet Red Bile Agar (VRBA, Oxoid) acrescido de 1% de glicose para enterobactérias. A incubação se deu a 30°C por 4 dias.

As médias das contagens de BAL encontradas para as carnes deterioradas ficaram em torno de  $10^8$ UFC/mL para o exsudato e  $10^7$ UFC/100cm<sup>2</sup> para a superfície da peça. Já para as enterobactérias,  $10^6$ UFC/mL e  $10^4$ UFC/100cm<sup>2</sup>, respectivamente. Para as carnes não deterioradas as médias de BAL ficaram em  $10^7$ UFC/mL para o exsudato e  $10^5$ UFC/100cm<sup>2</sup> para a superfície e para as enterobactérias,  $10^2$ UFC/mL e  $10^2$ UFC/100cm<sup>2</sup> respectivamente. A diferença entre as médias das contagens do exsudato proveniente das amostras deterioradas e não deterioradas, assim como entre as médias da superfície também provenientes dos 2 tipos de amostra, foram consideradas significativamente diferentes ( $p < 0.01$ ).

Os isolados foram identificados pelo sistema API (bioMérieux®), sendo API 50CHL para BAL como: *Lactobacillus brevis* (1 isolado), *Lactobacillus pentosus* (2 isolados), *Lactococcus lactis* (2 isolados) e *Leuconostoc mesenteroides* (2 isolados) e API 20E para enterobactérias identificadas como: *Hafnia alvei* (4 isolados), *Serratia marcescens* (2 isolados), *Serratia odorifera* (1 isolado), *Yersinia enterocolitica* (1 isolado), *Klebsiella pneumoniae* (1 isolado), *Escherichia coli* (4 isolados), *Ewingella americana* (1 isolado), *Buttiauxella agrestis* (1 isolado), *Enterobacter sakazakii* (1 isolado) e *Flavimonas oryzihabitans* (1 isolado) sendo que a *Hafnia alvei* predominou em 50% das amostras de carne embalada a vácuo, já no ambiente de frigorífico a *E. coli* predominou no corredor de abate.

Para a realização do teste de reprodução do defeito, 3 peças de contra-filé foram cortadas, assepticamente, em bifés de 10x5x2cm e inoculadas individualmente com suspensão de células vegetativas pré-ajustada de 10<sup>8</sup>UFC/mL (Densimatic) de 6 diferentes isolados de enterobactérias, 4 de BAL e 1 *Pseudomonas sp.* O vácuo aplicado nas sacolas plásticas pré-soldadas (EVA multicamadas) com os bifés inoculados foi de 6mBar, praticado normalmente pela indústria, seguido de termo-encolhimento por 4 segundos a 83°C. A incubação foi procedida por 4 semanas a 4 e 15°C. Após 7 dias de incubação a 15°C, foi observado estufamento nas embalagens inoculadas com *Hafnia alvei*. Todas as outras embalagens inoculadas com enterobactérias, assim como com BAL, iniciaram o estufamento das embalagens com 15 dias de incubação. Com incubação a 4°C e somente após 6 semanas, aconteceu perda de vácuo e início de estufamento na embalagem inoculada com *H. alvei*.

Apesar de que, de acordo com a literatura, os *Clostridium* psicrotróficos estão envolvidos nos episódios de estufamento de embalagens, nesta pesquisa concluímos que linhagens de BAL (homo e heterofermentativas) e enterobactérias também causam este defeito. Além disso, o abuso de temperatura (15°C) reportado ao longo da linha de produção do frigorífico em estudo pode aumentar a contaminação inicial destes organismos, fazendo com que o acondicionamento a vácuo não se torne uma barreira tão eficiente ao desenvolvimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate the bacteria flora of vacuum packed meat, particularly lactic acid bacteria (LAB) and *Enterobacteriaceae*. For both microorganisms, 12 samples of red vacuum packaged meat were analyzed, seven of which were deteriorated (5 striploin, 1 hump and 1 rump cap) and 5 fresh (striploin).

The samples were donated by 2 slaughterhouses located in São Paulo State, except 3 samples which were purchased in a market located in Campinas city. Enumeration and identification of the recovered isolates were performed, followed by inoculation tests to verify the defect.

Contamination of slaughterhouse production line was also analyzed, from the stockyard area until the conveyor belt after packaging. Surface and purge counts were made with specific culture medium: de Mann, Rogosa & Sharpe (MRS agar, Difco) for LAB and Violet Red Bile Agar (VRBA, Oxoid), 1% glucose added, for *Enterobacteriaceae*. Incubation was conducted at 30°C for 4 days,

LAB average counts found for deteriorated samples were  $\sim 10^8$ CFU/mL in purge and  $10^7$ CFU/cm<sup>2</sup> in meat surface and  $10^6$ UFC/mL and  $10^4$ CFU/100cm<sup>2</sup> for *Enterobacteriaceae*, respectively. For fresh samples, the values for LAB were  $10^7$ CFU/mL in purge and  $10^5$ CFU/100cm<sup>2</sup> of LAB in the meat surface and for *Enterobacteriaceae*,  $10^2$ CFU/mL for purge and  $10^2$ CFU/100cm<sup>2</sup> for meat surface. Mean counts between purge from deteriorated and non deteriorated

samples and mean counts between meat surface from both samples were considered significantly different ( $p < 0.01$ ).

Isolates were identified with API system (bioMérieux®): API 50 CHL for LAB: *Lactobacillus brevis* (1 isolate), *Lactobacillus pentosus* (2 isolates), *Lactococcus lactis* (2 isolates) and *Leuconostoc mesenteroides* (2 isolates) and API 20E for *Enterobacteriaceae* identified as: *Hafnia alvei* (4 isolates), *Serratia marcescens* (2 isolates), *Serratia odorifera* (1 isolate), *Yersinia enterocolitica* (1 isolate), *Klebsiella pneumoniae* (1 isolate), *Escherichia coli* (4 isolates), *Ewingella americana* (1 isolate), *Buttiauxella agrestis* (1 isolate), *Enterobacter sakazakii* (1 isolate) and *Flavimonas oryzihabitans* (1 isolate). *Hafnia alvei* was the dominant species in 50% samples of vacuum packed meat while in the abattoir environment, *E. coli* was dominant at the slaughter blood conveyor.

For the inoculation test to verify the defect, 3 fresh vacuum pack strip loins were aseptically cut in 10x5x2cm beefs and inoculated individually with pre adjusted bacterial suspension  $10^8$ CFU/mL (Densimatic) of 6 different *Enterobacteriaceae* isolates, 4 LAB and 1 *Pseudomonas sp.* were used individually. The applied vacuum in individual packs (EVA multilayer) was 6mBar, as industrial practice, followed by heat-shrinking of 83°C, 4s. Incubation was about 4 weeks at 4 and 15°C. After 7 days incubation at 15°C, blown pack was observed in samples with *Hafnia alvei* inoculated. In all other samples, the blown pack started after 15 days incubation. After 6 weeks at 4°C, was observed vacuum loss in the sample inoculated with *H. alvei*.

Although, according to literature, the psychrotrophic clostridia are involved in blown pack cases, in this research it is concluded that LAB strains (homo – heterofermentative) and *Enterobacteriaceae* also cause the defect. Besides, temperature abuse along the slaughterhouse production line (15°C) may increase initial contamination of these organisms, becoming the vacuum packaging a non so efficient barrier against spoilage and pathogenic microorganisms development.

## **1. INTRODUÇÃO**

As exportações brasileiras de carne bovina cresceram 413,6% entre 1999 e 2007, segundo estudo da Organização Mundial do Comércio (OMC). No mesmo período, o Brasil aumentou sua participação no mercado internacional de carne bovina de 6,8% para 28,4%. O levantamento divulgado pela OMC revela que, apesar das alegadas barreiras que dificultam a entrada de seus produtos nos mercados dos países ricos, no período de 1999 a 2007, o Brasil aumentou consideravelmente suas exportações agropecuárias em vários setores, como carne bovina e de frango (ABIEC, 2009).

O Brasil atingiu no ano de 2008 o *status* de maior exportador de carne bovina do mundo, superando países tradicionais no segmento, tais como Austrália e Argentina. Segundo dados da ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes), o volume aproximado foi de 1,38 milhão de toneladas de carne (carcaça) correspondente a aproximadamente 5,3

bilhões de dólares. O maior importador desta carne foi a Rússia, com quase 30% do total comercializado (ABIEC, 2009).

Em 2009, houve uma queda nos valores das exportações. Segundo a ABIEC, de janeiro a novembro de 2009 foram comercializadas 1,139 milhão de toneladas contra 1,294 milhão em 2008. Aliado ao fato do preço em dólar, por tonelada, também ter diminuído, as exportações fecharam 2009 por volta de 4 bilhões contra 5,3 bilhões em 2008. Em 2009 a carne exportada *in natura* / fresca, que é comercializada embalada a vácuo, foi de 926.082 toneladas a preço de US\$ 3.264 / ton, totalizando US\$ 3.022.566.

A perspectiva de recuperação dos países desenvolvidos e, como consequência, do nível de emprego e renda deve melhorar o nível de demanda na União Européia, Estados Unidos e Japão, países que mais sofreram os efeitos da crise econômica internacional. A impossibilidade de expansão da oferta local na Europa deve resultar em um aumento das exportações brasileiras, beneficiadas também por um número cada vez maior de fazendas habilitadas a exportar para a União Européia (ABIEC, 2009).

A previsão da ABIEC para 2010 é de aumento entre 10 e 20 por cento na receita total das exportações de carne bovina, resultado de melhores preços e do aumento da quantidade produzida.

Visto a enorme possibilidade de rentabilidade com a carne bovina e seus produtos, estudos relacionados com a qualidade, segurança, transporte e

tecnologia de carnes e seus derivados tornam-se imprescindíveis para a economia do país (ABIEC, 2010). Atualmente, a principal fonte de resistência da União Européia em adquirir carne brasileira é a Irlanda. O embargo sofrido em 2008 foi devido à falta de acordo com o governo brasileiro sobre as propriedades certificadas para a exportação de carne, questionando as exigências feitas pelos europeus como rastreabilidade do gado adotado no Brasil.

A preocupação dos pesquisadores com a qualidade dos produtos cárneos é citada desde os primórdios do século 20. Estudos envolvendo a cinética de micro-organismos, assim como o binômio tempo x temperatura observado nos processos térmicos para produtos cárneos têm sido, exaustivamente, pesquisados. Trabalhos mais recentes envolvem também a preocupação de se estender a vida de prateleira dos produtos perecíveis, e com esse propósito novas técnicas de barreiras continuam sendo desenvolvidas. Uma dessas é o acondicionamento a vácuo de produtos perecíveis.

O sistema de embalagem a vácuo é o mais utilizado no mercado institucional para distribuição de peças de carne bovina. Este sistema consiste da remoção do ar do espaço livre associada ao fechamento hermético, utilizando-se filmes com barreira ao oxigênio, vapor d'água e aos gases. A redução da concentração de oxigênio inibe o desenvolvimento de micro-organismos aeróbios, a oxidação de lipídeos e da mioglobina aumentando a

vida útil do produto (Sarantópoulos *et al.*, 2001; Sarantópoulos, 1991). Porém, condições completas de anaerobiose são raramente alcançadas, uma vez que os filmes empregados comercialmente têm certa permeabilidade ao oxigênio (filme multicamada de alumínio, poliéster e copolímero de polipropileno com permeabilidade de  $<1\text{cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}/\text{atm}$ ,  $25^\circ\text{C}/75\%$  U.R. e celofane laminado com polietileno de permeabilidade de  $1000\text{cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}/\text{atm}$ ,  $25^\circ\text{C}/90\%$  U.R.). Além da redução da concentração de oxigênio, a embalagem a vácuo minimiza a exsudação, reduz a perda por evaporação, melhora as condições higiênico-sanitárias, promovendo um ambiente adequado para maturação e redução significativa no espaço necessário para estocagem e transporte (Sarantópoulos, 1991). Porém, a quantidade do vácuo aplicado pode não ser suficiente devido à necessidade de alta produtividade na indústria. Níveis maiores de vácuo poderiam atrasar a produção como um todo, pois requerem um tempo maior para a condição exigida ser atingida.

No entanto, estes atributos parecem não ser suficientes para evitar a deterioração, que pode ser detectada pelo esverdeamento da carne com odores pútridos e pelo problema de estufamento de embalagem (*blown pack*), e vem causando perdas significativas para o segmento pecuarista. Na segunda metade do século e até o início deste, atribuíam-se o problema de estufamento de embalagens a bactérias do gênero *Clostridium*.

Os clostrídios são bactérias anaeróbicas estritas, fazendo que a embalagem com baixa tensão de oxigênio seja o habitat ideal para o seu

desenvolvimento. Importância especial se dá aos chamados clostrídios psicrotolerantes, que suportam as temperaturas de armazenagem das carnes, por volta de 4°C, podendo crescer a 15°C e até a temperaturas de congelamento. Estudos anteriores já confirmaram a presença destes microorganismos em contrafilé embalado a vácuo (Silva *et al.*, 2008). Entretanto, pesquisas recentes demonstraram que esse tipo de deterioração pode ter o envolvimento de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e bactérias ácido lácticas, além do *Clostridium* (Brightwell *et al.*, 2007).

Neste enfoque, Gill e Gill (2005) citam que, quando a carne é embalada a vácuo ou é usada uma atmosfera modificada com >20% CO<sub>2</sub>, o crescimento de *Pseudomonas* ssp., um dos principais deteriorantes em carnes, é suprimido. Já sob estas condições as BAL, microaerofílicas, crescem mais rapidamente (*Lactobacillus*, *Carnobacterium* e *Leuconostoc*) e são frequentemente os únicos organismos detectáveis durante a armazenagem refrigerada de produtos em embalagem com atmosfera modificada (EAM). Estas bactérias fermentam carboidratos e proteínas presentes nas carnes e, quando estes últimos são exauridos, o crescimento pára. Isto ocorre normalmente quando a população atinge 10<sup>8</sup>UFC/cm<sup>2</sup>.

As BAL podem ter a morfologia de cocos e bastonetes Gram positivos, não formadores de esporos, com catalase negativa quando cultivados em Agar Nutriente (NA, Oxoid) (Cornell, 1983), usualmente não apresentam motilidade e ocasionalmente reduzem o nitrato. São fermentadoras da glicose e

homofermentativos, quando produzem mais de 85% de ácido láctico, ou heterofermentativos, quando o produto final é constituído de ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol e / ou ácido acético em quantidades iguais (Cornell, 1983). A proteólise ou lipólise é muito limitada ou não existe. Dentre as propriedades que levam estes micro-organismos a se destacarem nos produtos cárneos, pode-se citar seu caráter psicrotrófico, tolerância a altas tensões de CO<sub>2</sub>, ao nitrito, a sais e a baixos valores de pH. Na carne fresca e seus derivados, as BAL usualmente estão em concentrações inferiores a 10<sup>3</sup>/g e menos de 10/cm<sup>2</sup> na superfície da carne podem crescer sob as seletivas condições do armazenamento a vácuo (Egan, 1983).

Diferentes espécies de *Bacillus* também podem ser encontradas em cortes cárneos e seus derivados. Estes podem ser caracterizados como micro-organismos em forma de bastonetes, gram positivos e produtores de esporos. Os endósporos são estruturas redondas, ovais, ou cilíndricas, altamente refráteis, presentes no interior da célula bacteriana, conferindo-lhes resistência a fatores adversos do meio. Considerando o gênero *Bacillus*, atenção especial se dá aos produtores de enterotoxinas, como o *B. cereus* (Bennett e Belay, 2003). Outra importante espécie encontrada em carnes é o *B. anthracis*, agente causador do carbúnculo (*anthrax*) em humanos e animais (Cheun *et al.*, 2001) fazendo-se necessário e de extrema importância a avaliação da presença destes micro-organismos nos alimentos. Muitos *Bacillus* fazem parte do

ambiente de planta dos frigoríficos por estarem amplamente disseminados na forma de esporos.

Além das bactérias Gram positivas acima citadas, micro-organismos Gram negativos, tais como *Hafnia alvei* (Hanna *et al.*, 1979), *Serratia liquefaciens* e *Enterobacter* ssp psicotolerantes (Stile *et al.*, 1981) e outras enterobactérias em geral (Brighthwell *et al.*, 2007) têm sido relacionadas ao estufamento de carnes embaladas a vácuo por diversas razões, tais como alta contaminação inicial, permeabilidade do filme e temperatura de estocagem.

## 2. OBJETIVOS

Esta pesquisa teve por objetivo geral a enumeração, isolamento e identificação de espécies de bactérias ácido lácticas e enterobactérias correlacionadas a deterioração em cortes de carne bovina embalados a vácuo.

Para tanto, alguns objetivos específicos foram alcançados:

- ❖ Enumeração e isolamento de bactérias ácido lácticas (BAL) e enterobactérias a partir de 12 amostras de carne bovina embalada a vácuo, sendo 7 deterioradas e 5 não deterioradas;
- ❖ Caracterização morfológica e de gênero mediante testes de produção de heme-proteínas, metabolismo homo / heterofermentativo para BAL e produção de oxidase, para as enterobactérias;
- ❖ Identificação das BAL mediante perfil fenotípico de utilização de carboidratos pelo kit API 50CHL;
- ❖ Identificação das enterobactérias mediante perfil fenotípico de utilização de carboidratos pelo kit API 20E;
- ❖ Determinação dos pontos de contaminação na linha de produção do frigorífico parceiro e identificação dos isolados presentes;
- ❖ Reprodução do defeito (estufamento) a partir dos isolados obtidos tanto das amostras deterioradas e não deterioradas quanto dos recuperados a partir da linha de produção do frigorífico parceiro.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### *3.1. Embalagens versus conservação de alimentos*

O fator mais importante a se considerar na microbiologia de alimentos embalados com material flexível é a permeabilidade do material ao oxigênio, dióxido de carbono e vapor d'água. O oxigênio geralmente estimula o crescimento de bactérias aeróbicas, ao passo que inibe bactérias anaeróbicas estritas além de manter também a cor vermelha brilhante da carne fresca, mas, pode contribuir para a oxidação de lipídios em alguns cortes cárneos (Davies, 1995). O nitrogênio é um gás inerte, usado como preenchimento para se evitar o colapso da embalagem enquanto que o gás carbônico possui efeito bactericida (Davies, 1995).

No contexto de perecibilidade de alimentos, atmosfera modificada, controlada e embalagens a vácuo podem produzir condições que são bacteriostáticas (Davies, 1995). Estes métodos geralmente reduzem a taxa de crescimento dos micro-organismos, mas podem não ter efeito bactericida para aeróbios e anaeróbios simultaneamente. Em adição, os métodos citados aumentam sua efetividade na medida em que a temperatura diminui. Sendo assim, o abuso da temperatura durante a distribuição da carne pode permitir o crescimento de organismos antes inibidos (Davies, 1995).

As características necessárias para resistência, permeabilidade e selabilidade são funções dos materiais feitos a partir de poliéster, nylon,

polipropileno, polietileno e polivinil. Na Tabela 1 estão apresentadas as taxas de permeabilidade aos principais gases de diferentes materiais de embalagem.

Tabela 1. Permeabilidade de diferentes gases em diferentes materiais (adaptado de Brown, 1992).

<b>POLÍMERO</b>	<b>TPO<sub>2</sub></b> (cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> .dia.atm)	<b>TPCO<sub>2</sub></b> (cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> .dia.atm)	<b>TPVA</b> (g/m <sup>2</sup> .dia)
Etileno vinil álcool	1,4	3,9	28
Policloreto de vinilideno	2,0	4,9	1,8
Náilon 6	51	114	197
Polietileno tereftalato	94	472	35
Policloreto de vinila	98	394	18
Polipropileno	2.300	10.800	4,9
Polietileno de alta densidade	3.640	11.400	5,9
Polycarbonato	5.900	21.100	216
Poliestireno	7.230	17.700	140
Polietileno de baixa densidade	9.800	49.200	19,7

### **3.1.1. Acondicionamento a vácuo**

O acondicionamento a vácuo consiste na remoção de todo o ar do interior da embalagem, sem a introdução de outro gás para que então ocorra a selagem (Brody, 1989). A composição gasosa pode mudar durante o armazenamento devido à respiração do próprio tecido cárneo fresco ou ao metabolismo de micro-organismos (Davies, 1995).

A ausência de oxigênio em alimentos embalados a vácuo, principalmente aqueles com pH > 4.6, pode proporcionar condições favoráveis ao crescimento de organismos anaeróbicos patogênicos produtores de toxinas, tais como o *Clostridium botulinum*. Além disso, a supressão de organismos aeróbicos deterioradores pode criar condições favoráveis para o crescimento de bactérias aeróbicas patogênicas, tais como *Listeria monocytogenes*,

*Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli* enterotoxigênica. Contudo, a presença de dióxido de carbono tem como objetivo inibir o crescimento de organismos Gram negativos deteriorantes, tais como *Pseudomonas* ssp. Bactérias ácido lácticas são menos afetadas por níveis elevados de CO<sub>2</sub>. Baseado nessas informações, o acondicionamento a vácuo poderia agir seletivamente em favor de patógenos anaeróbicos estritos e facultativos em muitos alimentos frescos (Brody, 1989).

O termo-encolhimento realizado após a selagem a vácuo garante uma melhor adesão do material plástico ao produto. Este procedimento poderia levar à ativação de esporos dormentes na superfície da carne, ocasionando em estufamento precoce das embalagens. Classicamente, esporos mesofílicos proteolíticos podem ser ativados após tratamento de 80°C por 10 minutos. Temperaturas de ativação pelo calor para esporos psicrófilos e psicrotróficos podem ser tão baixas quanto 50-60°C (Broda *et al.*, 1999). No entanto, Bell e colaboradores (2001) conduziram um estudo para testar a teoria de que o termo-encolhimento seria o responsável pelo aparecimento do defeito precocemente. Para tanto, realizaram testes de reprodução do defeito, fazendo o acondicionamento a vácuo de cortes inoculados com 10<sup>3</sup>UFC/cm<sup>2</sup> de *Clostridium estertheticum* com e sem posterior termo-encolhimento. Não obtiveram resultados significativamente diferentes em relação aos 2 grupos, mostrando que o pensamento de que o termo-encolhimento aceleraria o aparecimento do estufamento é equivocado.

### ***3.2. Alterações físico-químicas e microbiológicas da carne no período do post-mortem***

O animal recém abatido após um período de repouso apresenta em seus músculos ATP, fosfocreatina e tem pH em torno de 6.9 a 7.2. Quando o suprimento de oxigênio é cortado através da sangria, o músculo torna-se anaeróbio e há formação de ácido láctico. Quando a fosfocreatina é exaurida, inicia-se a queda do nível de ATP. Em seguida são degradadas as reservas de glicogênio, outros carboidratos e finalmente o ATP. Como resultado, os prótons que são produzidos durante a glicólise causam diminuição significativa do pH intracelular.

A velocidade de queda do pH, bem como o pH final da carne após 24-48h, é muito variável. Em suínos, essa queda é mais rápida e em bovinos, mais lenta: pH inicial (0h) em torno de 7.0, cai para 6.4 após 5h e até 5.5 em 24h (Roça, 2000) .

A glicose está presente no músculo *post-mortem* em concentrações que variam de 0.1 a 0.5% (Gill, 1996) e é prontamente utilizada para o crescimento das células microbianas na superfície da carne. No início, um gradiente de difusão se desenvolve a partir do interior do músculo. Isso mantém uma concentração adequada de glicose na superfície garantindo que a bactéria continue a usar o carboidrato, atrasando a utilização de outros compostos pelo micro-organismo (Gill, 1986). Somente quando a população bacteriana atinge

10<sup>7</sup>UFC/cm<sup>2</sup>, os aminoácidos começam a ser degradados, aumentando a concentração de amônia e aumentando o pH.

Valores da glicose residual no *post-mortem* podem ser menores devido a condições impostas ao animal pré-abate, tais como estresse, fome ou medo. Estas circunstâncias diminuem a quantidade de glicogênio de reserva do animal vivo. Devido às suas características, a carne proveniente de animais estressados é referida como DFD (do inglês Dark, Firm, Dry; traduzindo, Escura, Firme, Seca).

Considerando os micro-organismos comumente relacionados à deterioração em produtos cárneos, *Pseudomonas* e outras bactérias Gram negativas, na primeira fase do crescimento, não geram odores ofensivos como produto de seu metabolismo. O crescimento é suportado por carboidratos, e seu catabolismo libera substâncias contendo ácidos graxos de cadeia curta, cetonas e alcoóis, que têm como características odores doces e de frutas (Dainty, 1996).

A segunda fase começa quando a glicose é esgotada e os micro-organismos começam a usar aminoácidos como fonte energética. Os compostos voláteis responsáveis pelos odores desagradáveis, tais como a cisteína, cistina e a metionina, são precursoras de H<sub>2</sub>S, metilsulfito e dimetilsulfito. Estes compostos são produzidos por *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae* e possuem odores descritos como pútridos e sulfurosos. As

pseudomonas degradam os aminoácidos por desaminação, enquanto que as enterobactérias fazem a descarboxilação (McMeekin, 1982).

Essa condição é semelhante ao que ocorre com a carne embalada a vácuo. No interior das embalagens, o oxigênio residual é rapidamente consumido pela respiração tecidual e microbiana, e o CO<sub>2</sub> é aumentado em até 20%. Portanto, durante a estocagem, as bactérias Gram negativas aeróbicas são substituídas lentamente por bactérias Gram positivas (Dainty, 1983; Egan e Roberts, 1987; Dainty e Mackey, 1992).

Uma pesquisa recente de Jones (2004) demonstrou que em carne bovina embalada a vácuo armazenada a -1,5°C por aproximadamente 16 semanas, havia uma sucessão de espécies lácticas que dominavam durante o armazenamento, embora sua população atingisse um número máximo em 8 semanas. Em geral as bactérias do gênero *Carnobacterium* ssp. dominam primeiramente e são sucedidas pelas bactérias lácticas mais acidúricas, incluindo *Lactobacillus* ou *Leuconostoc* ssp. Collins e colaboradores (1987) classificaram o gênero *Carnobacterium* incluído no gênero *Lactobacillus*, afirmando que esses micro-organismos compartilham alguns *habitats*, mas diferem em outros, como por exemplo, meios com diferentes concentrações de pH (*Carnobacterium* cresce em pH 9.0, *Lactobacillus* não) (Hammes e Hertel, 2006). O fator chave responsável pelas mudanças na população parece ser o pH da carne. Outra diferença clara em relação ao *Lactobacillus* é a produção

de apenas L-lactato a partir do peptidoglicano e ausência de crescimento em Agar acetato (Montel *et al.*, 1991).

Em contraste com carne embalada com pH normal (5.4), em carnes de pH alto (pH > 5,8) ou em embalagens de carnes com oxigênio presente em baixas concentrações, várias bactérias anaeróbias facultativas indesejáveis podem crescer e causar deterioração. Nestas condições, na flora de deterioração, bactérias como o *Brochothrix thermosphacta* surgem e geram odores butíricos resultantes da produção de acetoína. Se as temperaturas oscilam acima de 6°C, as *Enterobacteriaceae* podem ser um problema porque elas descarboxilam aminoácidos para produzir aminas orgânicas, que têm odores e sabores pútridos (Patterson e Gibbs, 1977).

### **3.2.1. Deteriorantes de carnes embaladas a vácuo**

Periodicamente as carnes bovinas resfriadas embaladas a vácuo, que não tenham sido submetidas a abuso de temperatura, apresentarão evidências de estufamento atribuídos à clostrídios em forma de esporo psicrotolerante ou psicrófilico (Broda *et al.*, 2009). Primeiramente, este tipo de deterioração estava relacionado somente à carne bovina resfriada que havia sofrido abuso de temperatura durante a estocagem (Broda *et al.*, 1996 a).

Espécies de *Clostridium* vêm apresentando significativa importância como deteriorantes de carnes. Desde 1989 estudos relatam um tipo particular de deterioração em carnes frescas e cozidas, caracterizada por intensa

produção de gás, exsudato e odor pútrido (Kalchayanand *et al.*, 1989 e 1993; Lawson *et al.*, 1994; Broda *et al.*, 1996a e b; Broda *et al.*, 1997). As referidas espécies eram caracterizadas pelo desenvolvimento em temperaturas inferiores a 5°C, sendo agrupadas como clostrídios tolerantes ao frio (Broda *et al.*, 1997).

Algumas das espécies de *Clostridium* tolerantes ao frio podem causar deterioração por estufamento da embalagem e alteração sensorial do produto, enquanto que outras não. Dentre os principais contaminantes estão: *Clostridium putrefaciens* e *Clostridium algidicarnis* (Ross, 1965); *C. estertheticum* e *C. gasigenes* (Kalchayanand *et al.*, 1989), além de *C. laramie*, apontado como uma nova espécie de *Clostridium* por suas propriedades fenotípicas (Kalchayanad *et al.*, 1993).

O reconhecimento de clostrídios psicrotolerantes como agentes causadores de deterioração no interior de tecidos musculares tem sido dificultado, entre outros fatores, pela dificuldade de isolar cepas a partir de amostras contaminadas. Além disso, em meios convencionais de subcultura pode ocorrer baixa recuperação ou completa inibição de clostrídios psicrotróficos e psicrófilos (Kalchayanand *et al.*, 1993; Broda *et al.*, 1996b). Broda e colaboradores (2003) citaram que o desenvolvimento de métodos moleculares seria uma alternativa rápida e específica para detecção de clostrídios causadores de estufamento em carnes embaladas a vácuo **sem isolá-los**. Esclareceram que uma concentração de 10<sup>4</sup> UFC/g de amostra seria

necessária para atingir o nível mínimo de detecção do problema. Neste sentido, técnicas genéticas como PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e RFLP (*Restriction fragment length polymorfism*) têm se apresentado como importantes ferramentas na identificação destes micro-organismos (Pacheco-Sanchez, 2008).

Porém, investigações recentes em cortes de carne de cordeiro embaladas a vácuo demonstraram um alto número de *Enterobacteriaceae* psicrotolerantes ( $10^4 - 10^6$  UFC / ml), mas não clostrídias, envolvidos em estufamento de embalagens (Brightwell *et al.*, 2007). Houve a produção de gás em homogeneizados de carne sob condições anaeróbicas.

Patterson e Gibbs (1977) demonstraram que carnes em condições normais de vácuo e pH (5.4) e temperatura de estocagem (0 – 2°C), ocorre o aparecimento de odores desagradáveis após 6 semanas de estocagem, com uma contagem de  $10^7/cm^2$  de lactobacilos e  $10^6/cm^2$  de organismos Gram negativos. *Enterobacteriaceae* apareceram de forma predominante após 8 semanas de estocagem. Os autores citam Hechelmann e colaboradores (1974) onde são descritos organismos do gênero *Enterobacter* que se multiplicaram abaixo de 5°C e podem contribuir substancialmente para o estufamento de embalagens.

Outros autores afirmam que as bactérias ácido lácticas são a flora predominante em carnes embaladas a vácuo e produtos cárneos (Hitchener *et*

*al.*, 1982; Franz *et al.*, 1996), tais como *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus sakei* e *Leuconostoc carnosum*, entre outros (Collins *et al.*, 1987).

Bactérias ácido lácticas são invariavelmente o grupo de micro-organismos predominantes em carnes embaladas a vácuo e produtos cárneos que possam produzir deterioração por acidificação (Shaw *et al.*, 1984). Muitos estudos foram desenvolvidos para identificar estas bactérias ácido lácticas, mas na maioria dos casos não foram identificados ao nível de espécie. As linhagens não identificadas foram divididas em 3 grupos: *(i) homofermentativas* que foram referidas como “estreptobactérias atípicas”, como *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus sakei* (Torriani *et al.*, 1996) *(ii) heterofermentativas*, como o *Leuconostoc* e *(iii) com motilidade (Vagococcus)*. Hitchener (1982) fez um estudo detalhado sobre a presença de um cocobacilo heterofermentativo atípico: *Leuconostoc mesenteroides*. Este autor considera o sistema API 50 CH com utilização de meio modificado para lactobacilos (bioMérieux®) é eficiente para a identificação destes micro-organismos.

Sakala e colaboradores (2002) encontraram como um dos organismos predominantes em bifes embalados a vácuo *Lactococcus piscium*, um coco psicrotrófico. Este organismo era antigamente relatado apenas em alimentos marinhos embalados a vácuo.

Para a coleta de amostras em superfícies de equipamentos ou ambientes que entram em contato com alimentos, diferentes técnicas podem

ser aplicadas, como: *swabs*: técnica de *swab* (cotonete) é usada em superfícies com irregularidades, cantos e fendas. É usado também para analisar utensílios. Deve-se umedecer a extremidade cotonosa do *swab* em fluido de diluição apropriado. Após a realização do esfregaço, o *swab* deve ser inserido em um recipiente estéril contendo o mesmo fluido usado anteriormente; *contato com esponja de celulose ou poliuretano livres de preservantes antimicrobianos*: a esponja é umedecida em fluido apropriado de diluição e esfregado na superfície que se quer analisar; *rodac plate– contato com Agar*: este método é recomendado para superfícies regulares. Este disco de Agar é pressionado cuidadosamente sobre uma superfície previamente limpa e sanitizada; *Petrifilm aerobic count method*: essa técnica resume a um método de contato direto que proporciona uma média simples da população bacteriana presentes principalmente em superfícies irregulares, por se tratar de um disco maleável (Evancho *et al.*, 2001)

Nortje e colaboradores (1990) isolaram 1265 linhagens de microorganismos (entre eles, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* e cocos Gram positivos, como o *Staphylococcus* e *Micrococcus*) através do método de contato com agar nos locais envolvidos no ciclo de produção da carne, tais como abatedouros, distribuidores de peças inteiras e supermercados. Além disso, obtiveram isolados a partir de 5 amostras provenientes das mãos, roupas e equipamentos dos funcionários envolvidos na cadeia. Verificaram ainda que as carnes resfriadas e os ambientes dos

abatedouros possuem uma predominância de *Pseudomonas* (51 e 36%, respectivamente). Já nos locais de venda de peças inteiras, a predominância foi de bactérias Gram positivas.

Stiles e Ng (1981) fizeram um importante estudo relacionando a presença de *Enterobacteriaceae* ao manuseio dos trabalhadores de frigoríficos. As amostras foram coletadas nas superfícies de contato da carne com a linha de produção e nas áreas de processamento da carne da indústria estudada pela técnica de contato com o Agar (*Rodac plates*) Foi utilizado para tanto o Violet Red Bile Agar (VRBA). Foram estudadas amostras embaladas a vácuo antes da abertura, pedaços usados para o acondicionamento a vácuo, amostras congeladas e descongeladas. Para a identificação bioquímica, os isolados característicos foram repicados para placas com Agar Nutriente. Um total de 2.343 *Enterobacteriaceae* foram isoladas e identificadas a partir de amostras de carnes e superfícies de trabalho em plantas de embalagens e retalhadoras. *Serratia liquefaciens* e *Escherichia coli* foram detectadas em todos os estágios do manuseio da carne. *Enterobacter* e *S. liquefaciens* foram as *Enterobacteriaceae* predominantes no nível da desossa.

Os resultados mostraram que a contaminação foi maior nas superfícies de manuseio da carne crua, seguindo da superfície de carnes cozidas e superfícies sem o contato com a carne. Vale ressaltar que os resultados foram expressos em porcentagens do total de isolados, não em carga microbiana (escala logarítmica). *Serratia liquefaciens* respondia por 32,1% dos isolados

encontrados em bifés de carne bovina embalados a vácuo enquanto que *E. hafniae* (antiga classificação de *Hafnia alvei*), representava 16,1%. A presença de *Klebsiella pneumoniae* também foi detectada na linha de produção de um dos frigoríficos estudados (Stiles e Ng, 1981).

Zahra e colaboradores (1985) descrevem como micro-organismos predominantes em produtos cárneos egípcios as *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Micrococcus*, assim como *E. coli* e *Lactobacillus plantarum*. Os pesquisadores conseguiram recuperar uma alta contagem de microrganismos (na faixa de  $10^7$ UFC/g) utilizando para contagens de superfície Agar Nutriente (NA). As culturas foram mantidas em caldo nutriente ou em tubos inclinados de NA para estudos futuros. Em adição aos coliformes e aos bastonetes Gram negativos, os cocos constituíram até 85% da flora predominante.

Hanna e colaboradores (1979) conseguiram recuperar em seus estudos até  $4.1 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> de placa de contagem de *H. alvei*, com intensa produção de gás. Contagens similares foram atingidas com *Lactobacillus* sp. ( $9,8 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>).

### **3.3. Caracterização dos principais grupos de micro-organismos relacionados à deterioração de carnes e produtos cárneos**

#### **3.3.1. Cocos Gram positivos**

**Cocos catalase (+).** Incluem os anaeróbicos facultativos do gênero *Staphylococcus* e os gêneros *Micrococcus* e *Deinococcus*. Micrococos são

organismos deterioradores, que assim como as corinebactérias e os lactobacilos são comumente encontrados em carnes curadas e algumas vezes em outros alimentos com atividade de água reduzida. Ao contrário dos micrococcos, a maioria dos estafilococos não cresce a temperaturas abaixo de 7°C e não causarão maiores problemas se armazenados em temperaturas de refrigeração (Mossel *et al.*, 1995).

***Cocos catalase (-)***. Incluem os anaeróbicos facultativos do gênero *Streptococcus*. A árvore evolucionária das bactérias Gram positivas do ramo do *Clostridium*, baseada nas similaridades da sequência 16S rRNA indicam a separação apropriada dos estreptococos em 3 grupos geneticamente distintos: *S. sensu stricto*, *Enterococcus* e *Lactococcus* (Stackebrandt e Teuber, 1988). São bactérias homofermentativas, isto é, produzem ácido láctico como produto final. Os estreptococos são classificados serologicamente nos chamados grupos de Lancefield. A maioria dos tipos do grupo D, renomeadas como gênero *Enterococcus* (Devriese *et al.*, 1993) são importantes como organismos indicadores e também conhecidos pela produção de compostos vasoativos que alteram subitamente a pressão sanguínea.

### *3.3.2. Bastonetes Gram positivos formadores de esporos*

***Bacillus***. Aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, catalase positiva, usualmente encontrados como deterioradores de alimentos tratados termicamente, especialmente alimentos enlatados. A diferenciação entre

espécies de *Bacillus* está no tipo e localização de formação do esporo e algumas características bioquímicas (tabela 2) (Silva *et al.*, 2008; Mossel *et al.*, 1995).

***Clostridium***. Anaeróbicos estritos, catalase negativa, também deterioram alimentos tratados termicamente. Entre as espécies particularmente perigosas estão o *C. botulinum*, produtor de uma neurotoxina mortal em alimentos com pH inferior a 4.6 e o *C. perfringens*, causador de enterite quando presente em alta concentração. Os clostrídios produtores de ácido butírico cujos esporos sobrevivem à pasteurização são capazes de crescer a baixas temperaturas e podem causar deterioração em diversos tipos de alimentos, como queijos, vegetais frescos e carnes (Mossel *et al.*, 1995).

### 3.3.3. Bastonetes Gram negativos

A classificação principal das bactérias Gram negativas reside na reação de oxidase. Quando a citocromo oxidase, a enzima que catalisa a redução do oxigênio molecular, esta presente os organismos são chamados de oxidase positivo. Na ausência da enzima, eles são chamados oxidase negativos (Steel, 1961; Kovacs, 1956).

A maneira de agrupar as bactérias oxidase positiva e negativa depende da forma de utilização da glicose. **Tipo 1:** bactéria não utiliza a glicose; **Tipo 2:** utilizam a glicose oxidativamente; **Tipo 3:** bactéria dissimila a glicose por um caminho fermentativo, mas produz apenas ácidos e não gás

(homofermentativo); **Tipo 4:** utilizam de modo similar ao tipo 3 mas de maneira heterofermentativa; **Tipo 5:** dissimilação anaeróbica estrita (Tabela 2) (Mossel *et al.*, 1995).

❖ Bastonetes Gram negativos e Oxidase negativa

**Não fermentadores:** Aeróbicos não acidúricos, isto é, que não conseguem crescer em pH menor que 4.5, não fermentativos tais como *Acinetobacter* e *Xanthomonas* estão associados como parte da deterioração em alimentos protéicos refrigerados, como, por exemplo, carnes e peixes (Mossel *et al.*, 1995).

**Fermentadores:** Incluem membros das *Enterobacteriaceae* (Tabela 3). São posteriormente divididas naquelas que fermentam a lactose rapidamente (lactose positiva) e aquelas que atacam esse açúcar lentamente ou não atacam. Todas podem ser úteis como organismos indicadores ou marcadores (Mossel, 1982a). Isso significa que sua detecção em alimentos processados pelo calor, pode revelar a presença de micro-organismos não esporulados em *commodities* que não deveriam conter tais bactérias, indicando falha no processamento ou contaminação pós processo. *Enterobacteriaceae* podem ser isolados de quase qualquer alimento não processado. Podem contribuir para a deterioração de alimentos protéicos frescos a temperaturas baixas e intermediárias, tendo como exemplos linhagens de *Citrobacter* e *Enterobacter*, especialmente sob condições anaeróbicas (Mossel *et al.*, 1995).

O gênero *Enterobacter* foi primeiramente proposto por Hormaeche and Edwards (1960) como um substituto para *Aerobacter*. O novo gênero foi então composto por *E. cloacae* e *E. aerogenes*. Em 1963, a comissão julgadora da International Committee on Nomenclature of Bacteria estabeleceu o nome *Enterobacter* na lista de nomes conservados (Judicial Commission, 1963).

*Aerobacter liquefaciens*, então re-classificada para *Enterobacter liquefaciens*, foi transferida para o gênero *Serratia*, tornando-se *S. liquefaciens*. Um grupo de linhagens denominadas de *Hafnia* por Moller (1954) foi incluído como *Enterobacter hafnia*, mas posteriormente foi realocada para um gênero próprio, *Hafnia*, com uma única espécie, *H. alvei*. Membros do gênero *Hafnia* são bastonetes Gram negativos com 1.0µm de diâmetro e até 5µm de comprimento. Possuem motilidade por flagelos peritríquios a 30°C mas linhagens não móteis podem ocorrer. São anaeróbicos facultativos, possuindo tanto o metabolismo respiratório como o metabolismo fermentativo. São geralmente Vermelho de Metila (VM) positivos e sempre Voges Proskauer (VP) positivos (35°C), mas são consistentemente negativos e positivos, respectivamente, quando testados a 22-25°C. Da mesma maneira, o teste de citrato é negativo a 35°C, porém positivo com um atraso de 3 a 4 dias a 22-25°C. A glicose é fermentada com produção de ácido e gás. Não é definida como um organismo produtor de H<sub>2</sub>S. Porém, Moller (1954) e Kauffmann (1954) reportaram linhagens, produzindo H<sub>2</sub>S (colônias negras) em meios como o Peptone Iron Agar (Dfco). A temperatura máxima de crescimento

descrita por esses pesquisadores é 40-42°C, sendo que não há crescimento a 5°C, entretanto Brighwell e colaboradores (2007) reproduziram o defeito de estufamento mediante inoculação de linhagens de *Hafnia alvei* a 4°C, após 21 dias de incubação.

Estes micro-organismos podem ser isolados a partir das fezes de indivíduos aparentemente saudáveis, assim como mamíferos, pássaros e peixes. Podem ser também isolados de variadas fontes ambientais, como solo e água, encontrando-se também em alimentos. Não há meio específico para a recuperação de *Hafnia*, sendo empregados para tanto meios seletivos para *Enterobacteriaceae*, como Eosina Azul de Metila (EMB), Xilose Lisina Deoxicolato (XLD) e Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (McBee e Schauer, 2006). A maioria das linhagens de *H.alvei* são sensíveis a carbenicilina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, cloranfenicol, tetraciclina, polimixina B e ácido naxílico mas são resistentes à ampicilina e cefalotina. Já foi isolada da urina, sangue, exsudato de ferimentos e abscessos e catarro; tem sido implicada como causa de septicemia, endocardite, meningite, peritonite, pneumonia, infecções do trato urinário. Contudo, a maioria dos pacientes com infecções de *Hafnia alvei* possuem outras doenças secundárias (McBee e Schauer, 2006).

Tabela 2. Grupos, em nível de gênero, de bactérias Gram positivas de importância em alimentos. (Mosse *et al.*, 1995)

Morfologia	Bioquímica	Gênero
bastonetes, sem esporos	<i>catalase +</i>	<i>Corynebacterium / Brevibacterium / Arthrobacter / Microbacterium / Brochothrix</i>
	<i>catalase -</i>	<i>Lactobacillus / Carnobacterium</i>
bastonetes, com esporos	<i>catalase +</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>catalase -</i> utilização da glicose tipo 5 ou 1	<i>Clostridium</i>
cocos	<i>catalase +</i> utilização da glicose tipo 1 ou 2 utilização da glicose tipo 3	<i>Micrococcus / Deinococcus / Staphylococcus</i>
	<i>catalase -</i> utilização da glicose tipo 3 utilização da glicose tipo 4	<i>Streptococcus / Leuconostoc</i>

Tabela 3. Revisão das propriedades determinativas de *Enterobacteriaceae*. (Mosse *et al.*, 1995).

	Ni	Mot	Gluc	Lact	$\beta$ -gal	Sac	Ara	X	Du	Sal	Ind	VM	AMC	C
<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	AG	+	+	+/-	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>Hafnia sp.</i>	+	+	AG	-/+	+	-/+	+	+	-	-/+	-	V	V	V
<i>Serratia sp.</i>	+	+	AG+/-	-/+	+	+	-	+/-	-	+	-	-	+/-	+

Legenda:

**Ni** redução do nitrato

**Mot** motilidade

**Gluc** dissimilação da glicose

**Lact** dissimilação da lactose

**$\beta$ -gal** atividade de  $\beta$ -galactosidase

**Sac** dissimilação da sacarose

**Ara** dissimilação da arabinose

**X** dissimilação da xilose

**Du** dissimilação de dulcitol

**Sal** dissimilação de salicina

**Ind** produção de indol

**VM** teste de vermelho de metila

**AMC** produção de acetilmetilcarbinol

**C** assimilação de citrato

**AG** produção de ácido e gás

+/- maioria positivo

-/+ maioria negativo

V resposta variada

Tabela 4. Chave de agrupamento em nível de gênero de bactérias Gram negativas importantes na deterioração de produtos cárneos (*Mossef et al.*, 1995).

Bioquímica	Gênero
Oxidase -	
Utilização da glicose tipo 3 ou 4	
Lactose +	<i>Escherichia</i>
Citrato -	
Citrato +	
Vermelho de metila -	
Com motilidade	<i>Enterobacter</i>
Lactose -	
B – Gal +	
H <sub>2</sub> S -	
LD* +	
Arabinose +	<i>Hafnia</i>
Arabinose -	<i>Serratia</i>

\*produção de lisina descarboxilase

#### 3.3.4. Identificação em nível molecular

A análise da sequência do gene ribossomal de RNA é uma poderosa técnica para determinação de relações filogenéticas e rápida identificação de espécies (Woese, 1987). A análise de rRNA de BAL associadas com a deterioração em carnes resultou na sequência específica de DNA para a descoberta ao nível de gênero e espécie e permitiu a construção de sondas de oligonucleotídeos específicos para a identificação de BAL (Hertel *et al.*, 1991, Brooks 1992, Nissen *et al.*, 1999, Nissen e Dainty 1995).

Tradicionalmente estes oligonucleotídeos são utilizados com técnicas de hibridização direta. Yost e colaboradores (2000) propuseram que esses que esses oligonucleotídeos sejam empregados como *primers* para a identificação das BAL encontradas na carne.

Para identificação genética de *Enterobacteriaceae*, Brightwell e colaboradores (2007) fizeram uso da técnica de análise dos genes 16S rRNA por RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). O DNA genômico total foi isolado de cada *Enterobacteriaceae* psicotolerante usando-se um kit High Pure PCR Template Preparation (Roche Diagnostics). Os procedimentos para amplificação e restrição RFLP foram previamente descritos por Brightwell e colaboradores em 2006.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Caracterização das amostras de cortes bovinos embalados a vácuo

Foram analisadas 12 amostras no total, sendo 7 deterioradas e 5 não deterioradas. O frigorífico parceiro da pesquisa, situado no Estado de São Paulo, contribuiu com 4 amostras deterioradas e 2 não deterioradas. Mais 3 amostras deterioradas foram cedidas por outro frigorífico paulista, enquanto que as outras 3 amostras não deterioradas foram adquiridas em supermercado situado na cidade de Campinas, São Paulo.

Primeiramente as amostras foram analisadas visualmente e sensorialmente (odor) e caracterizadas, seguindo os seguintes pontos:

- procedência, peso e tipo de corte
- data de produção
- data de validade
- cor da superfície da peça
- cor do interior da peça
- textura da superfície
- volume de exsudato
- odor
- pH do exsudato
- pH do interior da carne
- estufamento da embalagem
- presença de H<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub> (análise qualitativa)

#### ***4.2. Coleta das amostras provenientes dos cortes cárneos - Exsudato***

Para a abertura asséptica das embalagens em câmara de fluxo laminar, a superfície externa das embalagens foi desinfecionada com álcool 70% e uma lâmina de aço flambada. O corte foi feito na parte central da peça, preservando a solda. Foi removido todo o exsudato com o auxílio de pipeta estéril, medida a quantidade em proveta estéril e acondicionado em um frasco Schott estéril. Foi transferido 1 mL para 9 mL fluido de diluição (água peptonada 0,1% + solução salina 0,85%) para se iniciar as diluições decimais (Broda *et al.*, 1996b). As diluições foram feitas até  $10^{-7}$ , pois de acordo com a literatura (Hanna *et al.*, 1979; Brightwell *et al.*, 2007), o nível de contaminação por enterobactérias e bactérias lácticas estaria por volta de  $10^6$ - $10^7$ .

#### ***4.3. Coleta das amostras provenientes dos cortes cárneos - Superfície***

Foram analisadas 5 áreas diferentes de 100 cm<sup>2</sup>, com o auxílio de moldes estéreis (10x10cm), e realizado esfregaço mediante *swabs* estéreis umedecidos no fluido de diluição. Foram feitos esfregaços na horizontal, vertical e diagonal, de maneira a ter contato com toda a superfície desejada (Broda *et al.*, 1996a e b).

Os *swabs* foram acondicionados em tubos contendo 9 mL de fluido de diluição, seguindo-se diluição decimal até  $10^{-7}$  pois era estimado que a carga de micro-organismos presentes na superfície da carne, tanto enterobactérias

como bactérias lácticas, estaria por volta de  $10^7$ UFC/cm<sup>2</sup>, de acordo com os achados da pesquisa de Hanna e colaboradores (1979).

#### ***4.4. Enumeração e isolamento de micro-organismos a partir dos cortes bovinos (BAL e enterobactérias)***

Foram utilizadas para contagem e isolamento as 7 amostras deterioradas e as 5 não deterioradas de amostras de cortes bovinos.

O método adotado para a contagem de BAL foi o plaqueamento de diluições em superfície, utilizando-se o meio de Man, Rogosa & Sharpe (MRS, Difco) suplementado com 2% de Agar (Difco). Para plaqueamento, foram utilizadas as 4 últimas diluições (itens 4.2 e 4.3), tanto dos *swabs* da superfície quanto do exsudato. As placas foram acondicionadas em jarras de anaerobiose (Oxoid) e foi gerado um ambiente microaerofílico com o auxílio do gerador de microaerofilia Microaerobac (Probac). O período de incubação dos isolados foi de 4 dias a 25°C em estufa (Hanna *et al.*, 1979).

Após esse período foi avaliada a presença de colônias representativas. As colônias brancas, pequenas (2-3 mm de diâmetro), convexas, crescidas em MRS foram consideradas presuntivamente como bactérias lácticas homofermentativas enquanto que as heterofermentativas são menores, entre 0.5 -1mm (Hanna *et al.*, 1979).

O método adotado para a enumeração das enterobactérias também foi o de plaqueamento de diluições em superfície, utilizando-se o meio Violet Red Bile Agar (VRBA, Oxoid) suplementado de 1% de glicose (Mossel *et al.*, 1962) (Anexo 1). As diluições foram feitas de  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  e a incubação se deu por 4 dias a 25°C (Hanna *et al.*, 1979).

Para as colônias consideradas representativas para enterobactérias (circulares, róseas a vermelhas), foi feita coloração de Gram e teste de oxidase para se confirmar o grupo (Hanna *et al.*, 1979).

#### **4.5. Caracterização dos isolados obtidos (BAL e enterobactérias)**

As culturas consideradas presuntivamente como BAL e enterobactérias foram caracterizadas morfológicamente, tanto macro quanto microscopicamente e quanto ao seu metabolismo.

A caracterização macroscópica foi feita visualmente em relação ao formato, cor, tamanho e arranjo das colônias. Para a análise microscópica, foi feita a coloração de Gram e, no caso das BAL, foi feita a coloração de esporos para diferenciá-los da família *Bacillaceae*.

Para determinar se o isolado considerado BAL possuía uma via oxidativa completa, foi realizado o teste da benzidina, que consiste em determinar a presença / ausência de heme-proteínas. O teste da catalase pode gerar um falso positivo devido à presença da superóxido dismutase (falsa catalase),

fazendo-se necessária a confirmação da heme-proteína. Caso estas estivessem presentes, a catalase também será positiva e então a cadeia respiratória seria completa. Sua ausência implicaria em um micro-organismo cujo aceptor final de elétrons não é o oxigênio, ou seja, seria uma bactéria anaeróbica ou anaeróbica facultativa (podendo ser microaerófila) (Cornell, 1983).

Por fim foi realizado o teste para avaliar se a bactéria possui o metabolismo homo ou heterofermentativo. Micro-organismos homofermentativos têm como produto de seu metabolismo até 85% de ácido láctico, ao passo que os heterofermentativos têm como produtos, além do ácido láctico, CO<sub>2</sub>, ácido fórmico, etanol e em alguns casos H<sub>2</sub>. O teste é feito a partir de uma cultura pura de bactérias lácticas em MRS líquido crescida em um ambiente externo ao tubo contendo uma solução super saturada de hidróxido de bário, a 30°C por 24h. Em caso positivo de heterofermentação, o CO<sub>2</sub> produzido reagirá com o hidróxido de bário formando carbonato de bário, ficando visível na forma de um precipitado branco (Carr *et al.*, 1975).

As colônias morfológicamente e bioquimicamente similares foram agrupadas em uma mesma classe (bastonetes ou cocos, homo ou heterofermentativos). As culturas foram codificadas de acordo com o número da amostra, número do isolado encontrado na placa, meio em que a bactéria foi cultivada e se foi retirada da superfície da carne ou do exsudato. Por exemplo, a cultura C14 I3 MRS EX / SUP foi isolada da carne 14, sendo a 3ª

colônia diferente encontrada, com crescimento em MRS Agar e recuperada tanto na superfície quanto no exsudato da amostra.

No caso dos isolados bastonetes Gram negativos considerados como possíveis enterobactérias, o teste confirmativo para o grupo foi o teste da oxidase. Quando a citocromo oxidase, a enzima que catalisa a redução do oxigênio molecular, está presente, os organismos são chamados de oxidase positivo (bactérias da família *Enterobacteriaceae* são oxidase negativa) (Mossel *et al.*, 1995). Para a realização do teste, uma alçada da cultura estudada foi esfregada em um pedaço de papel filtro. Posteriormente, foram adicionados 2 reagentes para detecção da produção de oxidase: o reagente A (alfa-naftol) e o reagente B (NaOH). Essa reação se processa quando o composto tetrametil-p-fenilenodiamina em presença da enzima citocromo oxidase é oxidado pelo citocromo c (último citocromo da cadeia respiratória), gerando o composto denominado azul de Wurster (tetrametil-p-fenilenodiamina oxidada) (Manual prático de microbiologia, 2010). Testes positivos se dão pelo aparecimento de uma cor azulada sobre o esfregaço.

#### ***4.6. Identificação dos isolados (BAL e enterobactérias)***

As culturas puras foram identificadas em nível de espécie através do sistema API (bioMérieux®). Este sistema consiste na inoculação das culturas em galerias contendo substratos desidratados, dentre eles proteínas e

carboidratos. A leitura é feita a partir da mudança de cor em cada cúpula, devido à fermentação do substrato e evidenciado pelo indicador de pH presente no meio. Pode ser realizada em 24 e 48h (apiweb®). Cada isolado foi inoculado nas galerias correspondentes a cada grupo de bactérias, ou seja, as BAL, previamente repicadas 3 vezes a 30°C/24h, foram inoculadas nas galerias API 50 CH com meio modificado para lactobacilos (Anexo 1) (Hitchener *et al.*, 1982). As enterobactérias, previamente repicadas a 37°C/24h, foram inoculadas nas galerias API 20 E a partir de resuspensão das culturas em solução salina 0,85% estéril (Ling *et al.*, 1988; Holmes *et al.*, 1978).

A galeria do API 50 CH consiste em 50 cúpulas com substratos pertencentes à família dos hidratos de carbono e derivados (heterosídeos, polialcoois e ácidos urônicos) sendo 1 deles o controle negativo (sem princípio ativo) durante o período de incubação, a fermentação traduz-se por uma alteração de cor no tubo, devido a uma produção de ácido em anaerobiose (alcançada com o auxílio de óleo mineral) revelada pelo indicador de pH do meio escolhido (no caso, o púrpura de bromocresol). A leitura é feita após a incubação a 30°C em 24 e 48h (apiweb® v.5.1).

Já o API 20 E consiste em 20 cúpulas de substratos (10 carboidratos, 5 aminoácidos, gelatina, uréia e 3 sais) onde apenas algumas serão completadas inteiramente com a suspensão do micro-organismo (teste do citrato, do Voges-Proskauer e gelatina). Em algumas cúpulas é criado um ambiente anaeróbico com a ajuda de óleo mineral (ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S e URE). Durante a

incubação por 24h a 35°C, o metabolismo produz mudanças na coloração das cúpulas que são espontâneas ou reveladas pela adição de alguns reagentes (TDA, Indol e Voges-Proskauer), permitindo a leitura dos resultados (apiweb® v.4.1). A figura 1 ilustra os testes negativos e positivos dos 2 sistemas de identificação.

Uma vez identificados, os isolados foram encaminhados ao CENA / USP, Piracicaba, para identificação genética posterior, cujos resultados serão incluídos em futura publicação.

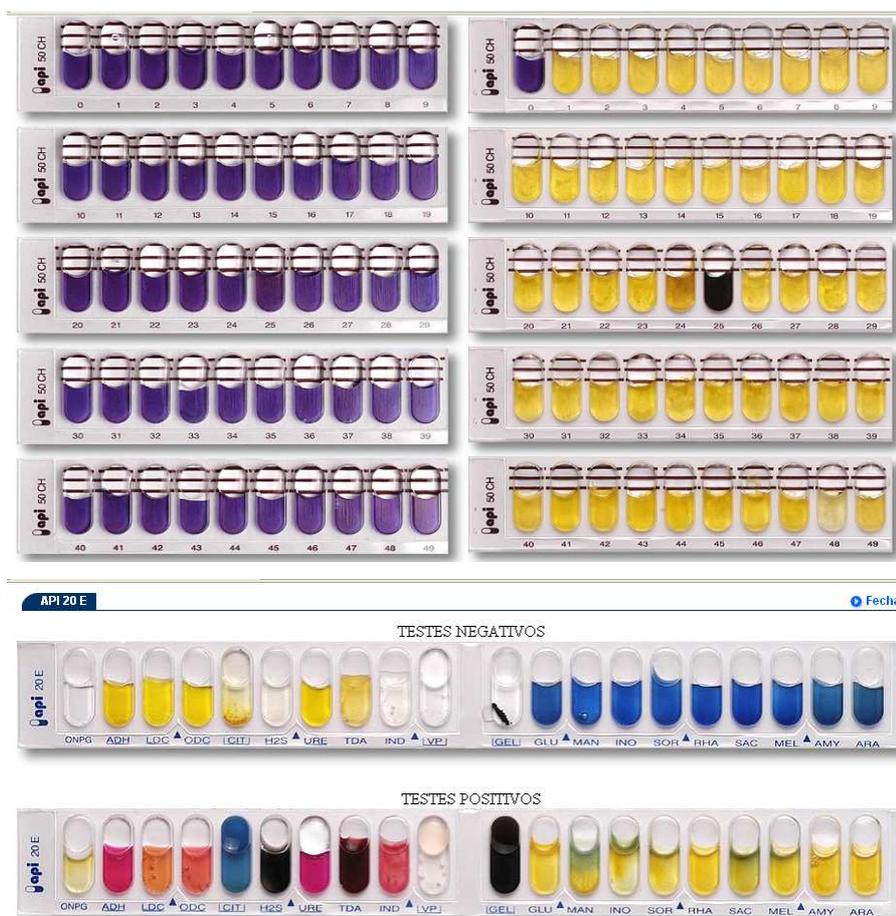


Figura 1. Verificação de cores dos testes positivos e negativos do sistema API 50 CHL (acima) e API 20 E (abaixo).

#### ***4.7. Recuperação de BAL e enterobactérias provenientes da linha de produção do frigorífico parceiro***

Foi analisada a flora bacteriana das fezes, couro e solo (corredor de abate e sala de desossa), assim como a flora das superfícies que entram em contato com a carne na linha de produção do frigorífico parceiro (esteiras de corte e embalagem). Na tabela 5 está apresentada a codificação para cada ponto de coleta analisado, bem como sua caracterização e temperatura medidas no ato da coleta.

Tabela 5. Codificação e temperatura observada nos pontos de coleta.

<i>Amostras</i>	<i>Código</i>	<i>Observação</i>	<i>Pontos de coleta</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
<b>Fezes</b>	F1	Íntegra, marrom esverdeada e úmida	Início do curral	30°C
	F2	Íntegra, marrom esverdeada e úmida	Meio do curral	
	F3	Íntegra, marrom esverdeada e úmida	Fim do curral	
<b>Couro</b>	C1			29°C
	C2	Retirado da pele do pescoço	Sala de sangria	
	C3			
<b>Corredor de atordoamento e sala de sangria</b>	CA1	Porta de ferro	Porta de entrada do Box de atordoamento	29°C
	CA2	Canaleta de aço inox	Canaleta de sangria	
	CA3	Ralo de grelha paralela	Ralo da canaleta de sangria	
<b>Sala de Desossa</b>	SD1	Mesa de aço inox	Mesa de desossa	15°C
	SD2	Chão de cimento	Chão	
	SD3	Ralo de grelha paralela	Ralo da mesa de desossa	
<b>Esteira de corte</b>	EC1		Início	15°C
	EC2	Esteira de transporte	Meio	
	EC3		Fim	
<b>Esteira de embalagem</b>	EE1		Início da esteira	15°C
	EE2	Esteira de transporte	Rampa de acesso ao envase	
	EE3		Esteira de entrada do envase	

Pela Tabela 5 é importante se observar que as temperaturas medidas na sala de desossa, esteira de corte e esteira de embalagem do frigorífico parceiro estão muito acima das indicadas como aceitáveis para estes locais, estabelecida em 7°C (Brasil, 1990). Para Betts & Gaze (1995) aumento na temperatura da carne bovina embalada à vácuo estocada sob refrigeração poderia causar a ativação das células viáveis da flora psicrotrófica, presente na carne, estimulando o crescimento desta população que, ao longo do tempo de estocagem sob refrigeração, ocasionaria a deterioração (estufamento, odor pútrido, digestão da carne e/ou esverdeamento da superfície da peça) do corte cárneo.

Para o levantamento da flora, foi adaptada a metodologia utilizada por Boerema e colaboradores (2003) para a obtenção dos isolados. Foram coletadas 3 amostras de fezes e colocadas em 3 frascos estéreis codificados. No laboratório da empresa, 2 *swabs* estéreis, por amostra, foram esfregados nas fezes bovinas e colocados, individualmente, em tubos 25x200mm contendo 20 mL de MRS caldo lactobacilli (Difco) para tentativa de recuperação de BAL e colocados em jarra com ambiente de microaerofilia gerado, e 20 mL de caldo lactosado (Oxoid) para enterobactérias (Kornacki *et al.*, 2001). Foram então incubados por 24h no laboratório da Unicamp para enriquecimento e posterior esgotamento em meio MRS Agar para BAL e VRBA modificado para enterobactérias.

A partir de cada uma de 3 amostras de couro de um bovino abatido foram separadas 2 sub amostras de 2 cm<sup>2</sup>. As amostras foram homogeneizadas em Stomacher por 30 segundos. Cada sub-amostra codificada foi transferida para frascos Schott, contendo 75mL de MRS caldo lactobacilli (Difco) e 75mL de caldo lactosado (para os respectivos micro-organismos).

Para as amostras de solo, foram coletadas com o auxílio de *swabs* estéreis, 3 amostras em duplicata, por *swabs* estéreis, entre o corredor de atordoamento e a sala de sangria e mais 3 amostras da sala de desossa. Cada uma das 9 amostras foi inoculada, individualmente, em tubos 25x200mm contendo 20mL de MRS caldo lactobacilli (Difco) e 20mL de caldo lactosado (Oxoid). Nas superfícies por onde o corte cárneo segue caminho até o acondicionamento, 2 *swabs* úmidos para cada um dos 3 pontos da esteira de corte (início, meio e fim) e mais 3 pontos da superfície da esteira de embalagem (início, rampa de acesso ao envase e envase), foram esfregados conforme metodologia de Sveum e colaboradores (1992). Os *swabs* foram então acondicionados em tubos 25x200mm contendo 20mL de MRS caldo lactobacilli (Difco) e 20mL de caldo lactosado (Oxoid).

Após o isolamento, foi feito enriquecimento das culturas por 24h a 30°C para BAL e a 37°C para enterobactérias. A identificação se procedeu da mesma maneira dos itens 4.5 e 4.6.

A temperatura de todas as salas e ambientes envolvidos na linha de produção foi medida, para se avaliar a correlação entre o ambiente e os micro-organismos encontrados.

#### ***4.8. Manutenção das culturas obtidas a partir das amostras de carne e da linha de produção do frigorífico parceiro***

A manutenção das culturas lácticas foi feita em 2 meios diferentes: MRS caldo (Difco) para as bactérias homofermentativas e o APT caldo (Difco) para as heterofermentativas, todas a 4°C (Hanna *et al.*, 1979).

As culturas identificadas como membros da família *Enterobacteriaceae* estão sendo mantidas em Columbia Blood Agar (CBA, Oxoid), acrescido de 5% de sangue desfibrinado estéril de ovino (Anexo 1), a 4°C, em tubos inclinados (Brighthwell *et al.*, 2007).

#### ***4.9. Teste de reprodução do defeito de estufamento das embalagens***

Para realização deste teste, foram selecionadas 6 das culturas de enterobactérias, 4 de BAL e 1 *Pseudomonas* sp. Para tanto, 3 peças de contrafilé frescas embaladas a vácuo foram adquiridas em mercado da região (dados e características já citadas no item 4.1) e abertas assepticamente no interior de câmara de fluxo laminar. Com o auxílio de uma faca própria para o corte de carnes (esterilizada de acordo com norma da RISPOA decreto 1812 de 1996),

cada peça foi dividida em 2 partes iguais. A gordura excedente foi retirada. Realizou-se a eliminação da flora superficial utilizando-se um ferro comum de passar aquecido e que teve sua chapa de aço previamente desinfecionada com álcool 70%.



Figura 2. Retirada da camada excedente de gordura (esquerda) e eliminação da flora da superfície do corte com o auxílio de ferro de passar comum (direita).

A superfície da carne foi considerada livre de contaminação quando sua temperatura atingiu 80°C medidos em termômetro de inserção (Multi-Thermometer). Após esta etapa, foram retiradas as camadas tostadas das superfícies, novamente com o auxílio da faca estéril, objetivando-se deste modo trabalhar com uma superfície com um nível de contaminação mais reduzido possível (Broda *et al.*, 1996a). Em seguida foram cortados os bifes em sentido transversal, com medidas definidas em 10x5x2cm e os mesmos foram inseridos em embalagens EVA multicamadas de 26x21cm (BB2800 permeabilidade máxima ao oxigênio 25 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/dia) (Ref. Cryovac 2009, contato pessoal).

As suspensões bacterianas foram previamente ajustadas ( $6 \times 10^8$  UFC/mL) utilizando o aparelho Densimatic (bioMérieux®) e foram então espalhadas sobre toda a superfície do bife com o auxílio de pipeta de 1 mL estéril. Para determinar o nível de inóculo foi feita quantificação mediante *swabs* da superfície e estriados posteriormente em meio seletivo adequado a cada tipo de micro-organismo estudado (MRS Agar para BAL e VRBA modificado para enterobactérias). A partir destas contagens foi obtido um nível de inóculo efetivo de  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>.



Figura 3. Inoculação da suspensão bacteriana ajustada em  $10^8$  UFC/mL na superfície do bife.

Após a inoculação, foi feito o acondicionamento a vácuo das amostras em filme EVA multicamadas cedido por empresa parceira em uma seladora Selovac (CV18) também cedida pelo parceiro e previamente calibrada para condição de vácuo de 6mBar, praticada pela indústria (vacuometro VC-01,

Instrutherm). Seguido do acondicionamento a vácuo, foi feito o termo-  
encolhimento por 4 segundos em banho ajustado previamente em 83°C  
(Brightwell *et al.*, 2007). As culturas foram inoculadas em duplicata para  
incubação em cada uma das 2 temperaturas de estudo (4° e 15°C), totalizando  
46 bifés (10x5x2cm), sendo que 2 deles como controle (sem inóculo).



Figura 4. Bife já inoculado e envolto por embalagem EVA multicamada no interior da seladora (esquerda) e banho ajustado em 83°C para realização do termo-  
encolhimento (direita).

As amostras foram codificadas e encaminhadas para incubação. As  
temperaturas escolhidas foram 4°C e 15°C. A temperatura de 4°C representa a  
condição mínima necessária para o transporte e armazenamento das carnes  
embaladas a vácuo, já 15°C simula o possível abuso de temperatura sofrido  
pelo produto ao longo de sua cadeia produtiva. Esta condição é propícia para o  
aparecimento de micro-organismos psicrotróficos deteriorantes (dentre eles,  
espécies de *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* e BAL).



Figura 5. Bife embalado a vácuo e termoencolhido, já codificado, pronto para a incubação (esquerda) e bandeja com embalagens usadas em parte do estudo (direita).

Na Tabela 6 está apresentada a classificação dos isolados, condições e tempos de incubação para as enterobactérias, BAL e *Pseudomonas* utilizadas no teste de reprodução de defeito.

Tabela 6. Condições e tempos de incubação para os isolados provenientes de cortes bovinos e do frigorífico parceiro de enterobactérias, BAL e *Pseudomonas* utilizados para teste de reprodução de defeito.

<i>Isolados</i>	<i>Identificação dos isolados</i>	<i>Condição de incubação</i>	<i>Tempo de incubação</i>
<i>Enterobactérias – isoladas de cortes cárneos</i>			
C8 I 15 VRBA EX	<i>Hafnia alvei</i>		
C 10 I 16 VRBA EX	<i>Serratia marcescens</i>		
C 11 I 25 VRBA SUP	<i>Yersinia enterocolitica</i>	4 e 15°C (duplicata)	4 semanas
C 14 I 31 VRBA SUP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Enterobactérias – isoladas do frigorífico parceiro</i>			
EE 1 VRBA	<i>Escherichia coli</i>		
SD 3 VRBA	<i>Ewingella americana</i>	4 e 15°C (duplicata)	4 semanas
<i>BAL – isoladas de cortes cárneos</i>			
C7 MRS EX/SUP – Grupo 1	<i>Lactobacillus brevis</i>		
C 7/C9/C11 MRS EX/SUP – Grupo 2	<i>Lactococcus lactis</i>		
C14/C15 MRS EX/SUP – Grupo 3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4 e 15°C (duplicata)	4 semanas
C16 MRS EX/SUP Grupo 4	<i>Lactobacillus pentosus</i>		
<i>BAL – isoladas do frigorífico parceiro</i>			
SD 2 MRS	<i>Lactococcus lactis</i>		
EC 3 MRS	<i>Lactococcus lactis</i>	4 e 15°C (duplicata)	4 semanas
EE 1 MRS	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
<i>Pseudomonas – isolada de cortes cárneos</i>			
C11 I 27 VRBA SUP	<i>Pseudomonas sp.</i>	4 e 15°C (duplicata)	4 semanas

As amostras foram analisadas visualmente diariamente, durante 1 mês, para verificação do aparecimento do defeito (exsudação, perda de vácuo, alteração de coloração, distensão e estufamento das embalagens). Decorrido o tempo de incubação, foi medido o pH das amostras e realizada a contagem dos

micro-organismos inoculados, em meios seletivos (MRS Agar e VRBA modificado), por meio de *swabs* de superfície e diluição do exsudato seguida de identificação pelo sistema API 50CH com meio modificado para lactobacilos e API 20E, para BAL e enterobactérias, respectivamente (Brighthwell *et al.*, 2007).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas tabelas 7 e 8 estão apresentadas as características das carnes analisadas.

Tabela 7. Caracterização das amostras deterioradas de cortes bovinos

	procedência	peso, corte	Produção/Validade (-18°C)	Tempo de estocagem a -10°C até análise	Tipo da embalagem	Cor da superfície	Cor do interior	Textura da superfície	Quantidade de exsudato	odor	pH do exsudato / superfície	Estufamento da embalagem	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (análise qualitativa)
C7	Frigorífico parceiro	5-6Kg, contra-filé	27/06/2009 27/06/2010	1 mês	Cryovac	Vermelho esverdeada	Vermelho vivo	quebradiça	+++++	“putrefativo”	7.0 / 6.5	+++++	+ / +
C8	Frigorífico terceiro	500g, contra-filé	12/11/2007 12/11/2008	6 meses	Itap	Vermelho esverdeada	Vermelho vivo	íntegra	+++++	“butírico”	7.0 / 6.5	+++	+ / +
C9	Frigorífico terceiro	1-2Kg, cupim	26/08/2008 26/08/2009	4 meses	Cryovac	Vermelho esverdeada	Vermelho vivo	íntegra	+++++	“putrefativo”	6.2 / 6.0	++	- / -
C10	Frigorífico parceiro	5-6Kg, contra-filé	10/01/2009 10/01/2010	4 meses	Cryovac	Vermelho escuro	Vermelho vivo	íntegra	+++	“sulfídrico”	6.2 / 6.0	+++++	- / +
C11	Frigorífico parceiro	5-6Kg, contra-filé	10/01/2009 10/01/2010	4 meses	Cryovac	Vermelho normal	Vermelho vivo	íntegra	++	“putrefativo”	6.2 / 6.0	+++++	+ / +
C14	Frigorífico parceiro	1,5Kg, picanha	02/04/2009 02/04/2010	4 meses	Itap	Vermelho esverdeada	Vermelho pálido	íntegra	++	“Cheese”	5.9 / 5.5	++++	+ / +
C15	Frigorífico terceiro	5-6Kg, contra-filé	03/01/09 03/01/2010	6 meses	Itap	Vermelho esverdeada	Vermelho pálido	íntegra	+++	“putrefativo”	5.5 / 5.4	+++++	+ / +

Tabela 8. Caracterização das amostras não deterioradas de cortes bovinos

	procedência	peso, corte	Produção/Validade (-18°C)	Tempo de estocagem a -10°C até análise	Tipo da embalagem	Cor da superfície	Cor do interior	Textura da superfície	Quantidade de exsudato	odor	pH do exsudato / superfície	Estufamento da embalagem	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (análise qualitativa)
C12	Frigorífico parceiro	5-6Kg, contra-filé	30/06/2008	14 meses*	Cryovac	Vermelho vivo	Vermelho vivo	íntegra	+	“carne fresca”	5.7 / 5.5	-	- / -
			30/06/2009										
C13	Frigorífico parceiro	5-6Kg, contra-filé	30/08/2008	12 meses	Cryovac	Vermelho vivo	Vermelho vivo	íntegra	+	“carne fresca”	5.7 / 5.5	-	- / -
			30/08/2009										
C16	Mercado de Campinas	5-6Kg, contra-filé	30/11/2009	Análise imediata após compra (11/12/09)	Cryovac	Vermelho vivo	Vermelho vivo	íntegra	+	“carne fresca”	5.8 / 5.5	-	- / -
			30/11/2010										
C17	Mercado de Campinas	5-6Kg, contra-filé	01/12/2009	Análise imediata após compra (11/12/09)	Cryovac	Vermelho vivo	Vermelho vivo	íntegra	+	“carne fresca”	5.8 / 5.5	-	- / -
			01/12/2010										
C18	Mercado de Campinas	5-6Kg, contra-filé	01/12/2009	Análise imediata após compra (11/12/09)	Cryovac	Vermelho vivo	Vermelho vivo	íntegra	+	“carne fresca”	5.8 / 5.5	-	- / -
			01/12/2010										

\*sem deterioração aparente mesmo após término do prazo de validade (analisada em 04.08.2009)

### 5.1. Enumeração de bactérias ácido lácticas (BAL)

Na Tabela 9 são apresentados os resultados da enumeração das bactérias ácido lácticas provenientes do exsudato e da superfície das amostras de carne bovina analisadas.

Tabela 9. Enumeração de BAL em amostras de cortes bovinos embalados a vácuo

Número da amostra	Exsudato (UFC/mL)	Superfície (UFC/100cm <sup>2</sup> )
C7	3,45x10 <sup>6</sup>	8,4x10 <sup>4</sup>
C8	2x10 <sup>9</sup>	2.7x10 <sup>8</sup>
C9	2.3x10 <sup>8</sup>	5.4x10 <sup>6</sup>
C10	6,8x10 <sup>8</sup>	3x10 <sup>7</sup>
C11	9,6x10 <sup>8</sup>	4x10 <sup>7</sup>
C12*	3,12x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>4</sup>
C13*	2,1x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>2</sup>
C14	2,8x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>6</sup>
C15	8,2x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>7</sup>
C16*	1,2x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>4</sup>
C17*	1,7x10 <sup>7</sup>	1,6x10 <sup>5</sup>
C18*	2,4x10 <sup>8</sup>	8,7x10 <sup>5</sup>
<b>Média deterioradas</b>	<b>5,69x10<sup>8a</sup>**</b>	<b>4,97x10<sup>7c</sup></b>
<b>Média não deterioradas</b>	<b>5,4x10<sup>7b</sup></b>	<b>2,1x10<sup>5d</sup></b>

\* amostras não deterioradas; \*\* letras diferentes indicam diferenças significativas a  $p < 0.01$ .

Observando-se as médias das contagens obtidas para o exsudato das amostras deterioradas e não deterioradas nota-se diferença significativa a  $p < 0.01$  e de forma similar, para a superfície do corte cárneo. Este nível de significância está acima do geralmente adotado para alimentos (90%) por se tratar de um ambiente muito variável. Silva e colaboradores (2009a) detectaram diferenças significativas a 90% de probabilidade entre contagens de micro-

organismos esporulados anaeróbios recuperados a partir do exsudato de carnes deterioradas e não deterioradas.

Nos gráficos 1 e 2 estão apresentados os valores obtidos nas contagens das amostras deterioradas, não deterioradas e as médias para BAL.

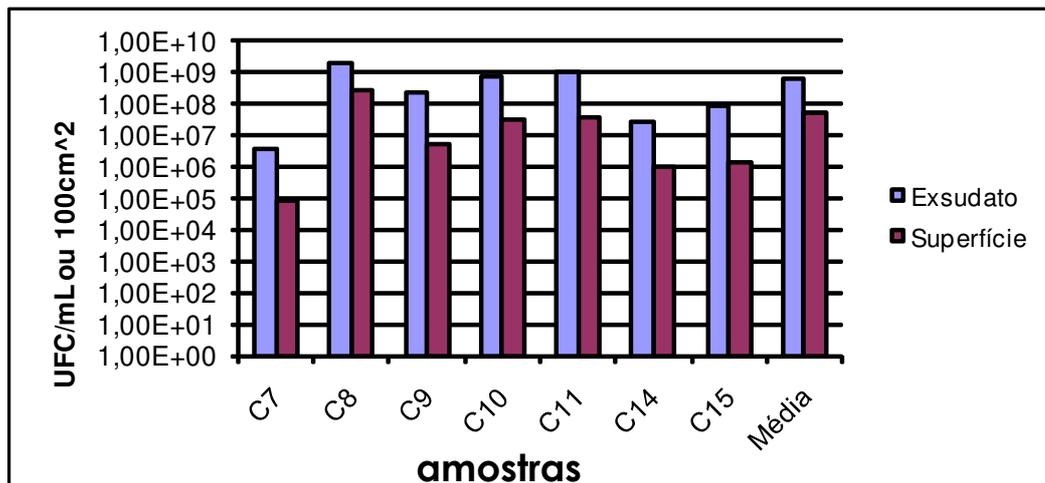


Gráfico 1. Comparação da contaminação por BAL provenientes de amostras deterioradas de cortes bovinos embalados a vácuo.

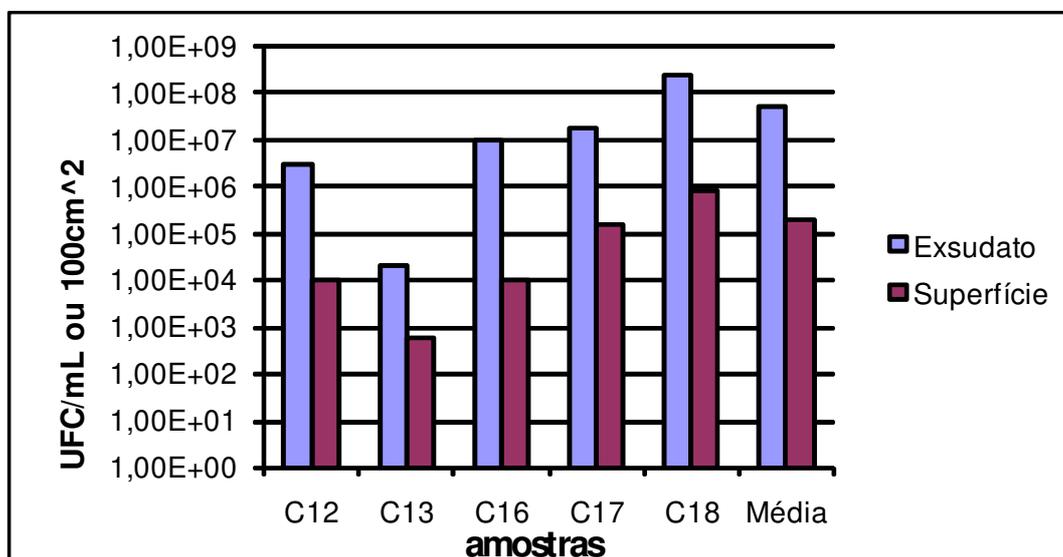


Gráfico 2. Comparação da contaminação por BAL provenientes de amostras não deterioradas de cortes bovinos embalados a vácuo.

De acordo com as Tabela 9 e com os gráficos 1 e 2, nota-se que carga de micro-organismos é sempre maior no exsudato em relação à superfície. Considerando-se a média das amostras deterioradas, observa-se que existe diferença de 1 ciclo log entre exsudato e superfície. Já para as amostras não deterioradas esta diferença atinge 2 ciclos log. Esses números estão de acordo com o que foi reportado por Hanna e colaboradores (1979), onde a contaminação no exsudato (meio mais rico para o desenvolvimento de micro-organismos, maior atividade de água) é sempre maior que a da superfície de cortes bovinos embalados a vácuo.

Outro dado importante é o valor da contagem (valores de até  $10^8$ UFC/mL). Jones e colaboradores (2008) encontraram valores similares quando estudaram a atividade inibitória de BAL frente organismos deterioradores de carnes frescas, tais como *Clostridium estertheticum*. Estes autores indicaram que concentrações de  $10^7$ UFC/mL de BAL, como por exemplo, *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus sakei*, são suficientes para inibir totalmente a populações de  $10^3$ UFC/mL de *C. estertheticum*, devido à produção de bacteriocinas.

Outro aspecto importante é a diferença de 1 ciclo log observada na média de BAL para o exsudato entre as carnes deterioradas e não deterioradas. Apesar da média ser maior para carne deteriorada isto não implica no fato de BAL serem necessariamente a fonte da deterioração já que a amostra C18, não deteriorada, apresenta a mesma concentração de BAL que a

amostra C9 deteriorada e, no entanto, a diferença de pH entre essas amostras sugere atividade microbiana excedente com produção de ácido.

A condição primordial para se considerar uma amostra como sendo deteriorada, neste estudo, é o estufamento das embalagens e não apenas a enumeração de micro-organismos, pois estes podem estar presentes, mas não causar o defeito do estufamento, como é o caso de bactérias homofermentativas, por exemplo. De acordo com as contagens aqui detectadas, podemos supor que o defeito, pelo menos em sua maior parte, nas amostras analisadas, não esteja relacionado com a presença de bactérias lácticas heterofermentativas. As altas contagens podem ser derivadas de BAL homofermentativas, que não produzem gás como metabólito final principal. Essas considerações serão abordadas novamente mais adiante.

## 5.2. Enumeração de enterobactérias

Na Tabela 10 são apresentadas as contagens de enterobactérias encontradas nos cortes bovinos embalados a vácuo.

Tabela 10. Contagens de enterobactérias em cortes bovinos, deteriorados e não deteriorados, embalados a vácuo

Número da amostra	Exsudato (UFC/mL)	Superfície (UFC/100cm <sup>2</sup> )
C7	2x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>2</sup>
C8	5,6x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>1</sup>
C9	2,1x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>
C10	7,1x10 <sup>6</sup>	5,4x10 <sup>4</sup>
C11	1,56x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>
C12*	3,1x10 <sup>3</sup>	<1
C13*	3x10 <sup>2</sup>	<1
C14	4,4x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>3</sup>
C15	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>5</sup>
C16*	<1	1x10 <sup>3</sup>
C17*	<1	<1
C18*	<1	<1
<b>Média deterioradas</b>	<b>3,76x10<sup>6a**</sup></b>	<b>2,45x10<sup>4c</sup></b>
<b>Média não deterioradas</b>	<b>6,8x10<sup>2b</sup></b>	<b>2x10<sup>2b</sup></b>

\* amostras não deterioradas; \*\* letras diferentes indicam diferenças significativas a p<0.01

Ao se comparar os resultados médios das contagens das amostras deterioradas observou-se que ocorreu uma redução. Por outro lado, quando foram comparadas as médias das carnes deterioradas x carnes não deterioradas, observou-se diferenças significativas (p<0.01) tanto para o exsudato quanto para a superfície.

Os gráficos a seguir apresentam os valores da comparação das contagens em amostras deterioradas e não deterioradas.

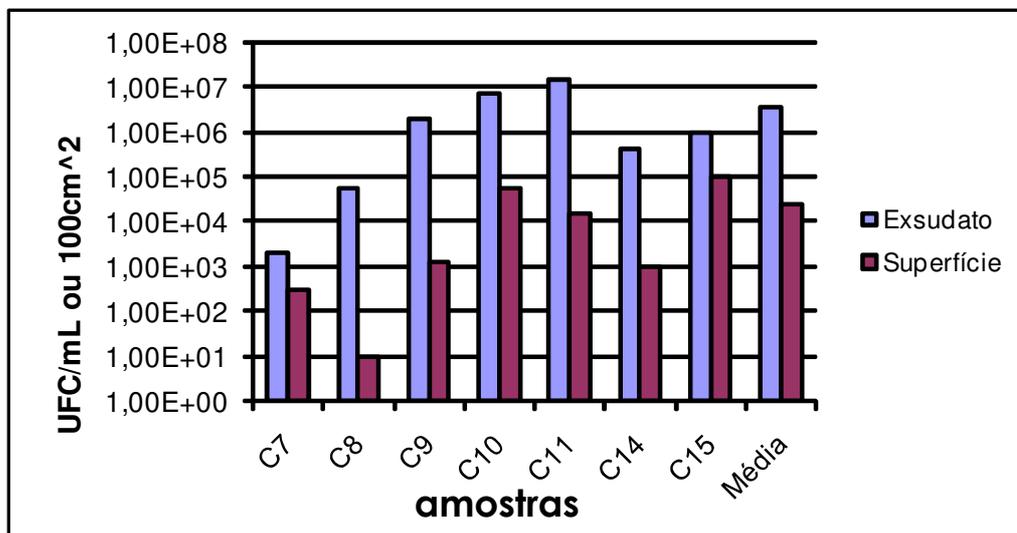


Gráfico 3. Contagem de enterobactérias provenientes de amostras deterioradas.

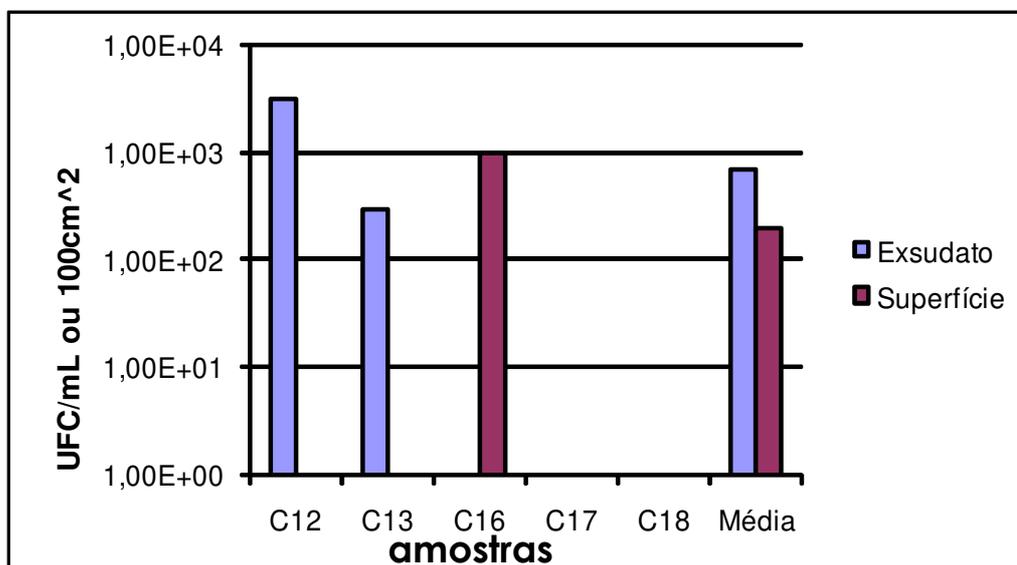


Gráfico 4. Contagem de enterobactérias provenientes de amostras não deterioradas.

A partir da análise dos dados contidos na tabela 8 e nos gráficos 3 e 4, pode-se novamente observar que as contagens mais altas encontram-se no exsudato. Exceção é feita à amostra C16 (carne não deteriorada), onde foi recuperado  $1 \times 10^3$  UFC/mL na superfície, ao passo que no exsudato não foi recuperada nenhuma colônia ( $<1$ ). Já Broda e colaboradores (1996a e b) não recuperam enterobactérias a partir da superfície de amostras de carne vermelha deterioradas e em amostras não deterioradas estes micro-organismos não são recuperados nem na superfície nem no exsudato.

Brigthwell e colaboradores (2007) detectaram que uma carne contaminada com  $10^4$  UFC/mL de enterobactérias é suficiente para que haja o estufamento de embalagens de cortes cárneos acondicionados a vácuo. Broda et al. (1996 a e b), recuperaram  $10^4$  de enterobactérias a partir das amostras analisadas de carne de cordeiro deteriorada. Hanna e colaboradores (1979) encontraram por volta de  $10^5$  UFC/mL enterobactérias em seus estudos de reprodução de defeito. Nesta pesquisa foram recuperados micro-organismos na ordem de até  $10^7$  UFC/mL (amostra C11 exsudato), sendo que a média geral ficou em  $10^6$  UFC/mL. Cabe ressaltar que estas diferenças nos nível de contaminação também podem ser fruto de um ambiente de clima tropical, com microbiota mais abundante, enquanto que as demais pesquisas citadas foram conduzidas em ambientes de clima temperado. A falta de preparo e cuidado no manuseio das carnes por parte dos trabalhadores da área também pode ocasionar em contaminação cruzada do produto.

A temperatura ao longo de toda a cadeia de produção dos produtos cárneos também é de extrema importância. A temperatura mínima de desenvolvimento de enterobactérias citada na literatura é de 4°C (Brighwell *et al.*, 2007), sendo que o ótimo de crescimento do grupo está entre 35 – 37°C (Brenner, 1984). O ambiente adequado para o manejo da carne nos diversos ambientes do matadouro, de forma a inibir o desenvolvimento de micro-organismos deterioradores e/ou patógenos, não pode ultrapassar 7°C (Brasil, 1990). No entanto, na prática, a temperatura medida no frigorífico parceiro foi de 15°C (na sala de desossa e na sala das esteiras de corte e embalagem). Este abuso é determinante para o desenvolvimento da flora de diversas espécies bacterianas psicotolerantes, entre elas as enterobactérias. É sabido também que dificilmente as carnes permanecem a temperaturas adequadas durante o transporte e armazenamento nas casas de distribuição e mercados. A presença de 10<sup>3</sup>UFC/mL de enterobactérias na amostra C16, adquirida no comércio da cidade de Campinas, pode ser devida à contaminação inicial na linha de produção e subsequente abuso de temperatura. No entanto, não podemos afirmar com precisão pois a história térmica do produto não é conhecida.

Avaliando-se as amostras não deterioradas, os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que é indesejável a presença de membros da família *Enterobacteriaceae* em carnes frescas. Não foram feitas contagens para os isolados recuperados a partir da linha de produção do frigorífico parceiro pois

como se tratava de uma microflora possivelmente injuriada, optou-se por realizar o enriquecimento das amostras coletadas, o que inviabilizou a contagem.

### ***5.3. Caracterização das culturas de BAL e enterobactérias isoladas a partir dos cortes cárneos deteriorados e não deteriorados analisados e a partir de levantamento na linha de produção do frigorífico***

Os resultados da caracterização dos isolados estão apresentados nas Tabelas 11 e 12, sendo que os mesmos foram separados em 4 grupos em função de suas características similares, tanto morfológicas como bioquímicas (item 4.5). Além da coloração de Gram, a coloração de esporos foi realizada para poder diferenciá-los de membros da família *Bacillaceae*.

Tabela 11. Caracterização morfológica e microscópica dos isolados provenientes de MRS Agar em cortes bovinos deteriorados.

Isolado	Procedência	Macroscopia	Microscopia	Benzidina	Metabolismo
(GRUPO 1)					
C7 I1 MRS EX/SUP	EX / SUP MRS C7	Circular, branca neve, elevada, borda lisa regular, aproximadamente 1mm	Bastonete, G(+), pequeno, sem arranjo característico, sem endosporo	Negativo	Heterofermentativo
C8 I5 MRS EX/SUP	EX / SUP MRS C8				
C9 I8 MRS EX/SUP	EX / SUP MRS C9				
C10 I10 MRS EX/SUP	EX / SUP MRS C10				
C11 I11 MRS EX/SUP	EX / SUP MRS C11				
(GRUPO 2)					
C7 I2 MRS EX / SUP	EX / SUP MRS C7 EX / SUP MRS C9	Circular, branca opaca, elevada, borda lisa regular, aproximadamente 2mm	Coco G(+), cadeias pelos extremos, sem arranjo	Negativo	Homofermentativo
C9 I9 MRS EX / SUP					
C11 I12 MRS EX / SUP					
(GRUPO 3)					
C14 I3 MRS EX / SUP	EX / SUP MRS C14 EX / SUP MRS C15	Circular, plana, borda lisa regular, transparente / opaca Aproximadamente 1mm	Coco G(+), 2 a 2.	Negativo	Heterofermentativo
C15 I7 MRS EX / SUP					

EX: isolado proveniente do exsudato

SUP: isolado proveniente de swab da superfície

**Tabela 12. Caracterização morfológica e microscópica dos isolados provenientes de MRS Agar em cortes bovinos não deteriorados**

Isolado	Procedência	Macroscopia	Microscopia	Benzidina	Metabolismo
(GRUPO 4)					
C12 I13 MRS EX / SUP	EX / SUP MRS C12	Circular, branca opaca, elevada, borda lisa regular, aproximadamente 2mm	Bastonete, G(+), pequeno, cadeias pelos extremos, sem endosporo	Negativo	Homofermentativo
C16 I14 MRS EX / SUP	EX / SUP MRS C16				
C13 I4 MRS EX / SUP*	EX / SUP MRS C13	Circular, enrugada, branca opaca, aproximadamente 5mm	Bastonete, G(+), pequeno, sem arranjo característico, sem endósporo e Cocos G(+), 2 a 2	N.R.	N.R.

\*cultura mista ; N.R. testes não realizados

Não foi possível a separação de espécies na amostra C13, sendo que cocos e bastonetes Gram positivos apareciam juntos na visualização microscópica. Talvez o MRS Agar não tenha sido suficientemente seletivo para contagens abaixo de  $10^4$ UFC/mL.

Nas tabelas 13 e 14 estão apresentadas as características dos isolados classificados previamente como enterobactérias.

**Tabela 13. Caracterização morfológica e microscópica dos isolados provenientes de VRBA modificado em cortes bovinos deteriorados**

<b>Isolado</b>	<b>Procedência</b>	<b>Macroscopia</b>	<b>Microscopia</b>	<b>Oxidase</b>	<b>Observação</b>
C7 I1 VRBA EX	EX VRBA C7	Circular, borda irregular, centro elevado amarelado, gomosa, porcelanosa. Não acidifica o meio	Bastonete, G(-), pequeno, isolado	negativa	puro
C7 I2 VRBA SUP	EX VRBA C7	Circular, pequena, violeta, com halo de acidificação.	Bastonetes G(-), pequenos, isolado	negativa	puro
C9 I10 VRBA EX	EX VRBA C9	Circular, borda lisa regular, centro laranja, halo rosa pouco elevado. Acidifica o meio	Bastonete, G(-), pequeno, isolado	negativa	puro
C9 I14 VRBA EX	EX VRBA C9	Circular, rosa, borda lisa regular, halo de acidificação bem definido, plana, porcelanosa	Bastonete, G(-), pequeno, isolado	negativa	puro

C10 I16 VRBA EX	EX VRBA C10	Circular, borda lisa regular, halo violeta, centro laranja, pouco elevada, porcelanosa. Acidifica o meio	Bastonete, G(-), pequeno sem arranjo	negativa	Puro
C8 I15 VRBA EX C10 I20 VRBA EX C10 I21 VRBA SUP C11 I23 VRBA EX C11 I26 VRBA SUP	EX VRBA C8 EX VRBA C10 SUP VRBA C10 EX VRBA C11 SUP VRBA C11	Circular, borda lisa regular, halo violeta claro, centro amarelo, elevada, porcelanosa. Acidifica o meio	Bastonete, G(-), pequeno sem arranjo	negativa	puro
C10 I22 VRBA SUP C11 I25 VRBA SUP	SUP VRBA C10 SUP VRBA C11	Circular, pequena, borda lisa regular, halo violeta escuro, sulcada, opaca. Não acidifica o meio	Bastonete, G(-), pequeno sem arranjo	negativa	puro
C11 I24 VRBA EX	EX VRBA C11	Circular, borda lisa regular, halo transparente, centro vermelho, pouco elevada. Acidifica o meio	Bastonete, G(-), pequeno sem arranjo	negativa	puro
C11 I27 VRBA SUP	SUP VRBA C11	Pontual, transparente, circular, borda lisa regular. Acidifica o meio	Bastonete, G(-), pequeno sem arranjo	POSITIVA**	puro
C14 I31 VRBA EX	EX VRBA C14	Circular, borda lisa regular, halo transparente, centro vermelho, pouco elevada. Acidifica o meio	Bastonete, G(-), pequeno sem arranjo	negativa	puro
C15 I32 VRBA EX	EX VRBA C15	Circular, borda lisa regular, halo transparente, centro vermelho, pouco elevada. Acidifica o meio	Bastonete, G(-), pequeno sem arranjo	negativa	puro

\*\* estriada posteriormente para meio seletivo para *Pseudomonas* (TFT).

**Tabela 14. Caracterização morfológica e microscópica dos isolados provenientes de VRBA modificado em cortes bovinos não deteriorados**

Isolado	Procedência	Macroscopia	Microscopia	Oxidase	Observação
C12 I28 VRBA EX C13 I30 VRBA SUP	EX VRBA C12 SUP VRBA C13	Circular, borda lisa regular, halo violeta claro, centro amarelo, elevada, porcelanosa. Acidifica o meio	Bastonetes G(+), sem esporos, médios e G(-) pequenos	N.R	cultura mista
C13 I29 VRBA EX C16 I33 VRBA SUP	EX VRBA C13 SUP VRBA C16	Circular, centro vermelho, elevado, halo rosa, intermediário violeta, porcelanosa. Acidifica o meio	Bastonetes G(+), sem esporos, médios e G(-) pequenos	N.R	cultura mista

Com relação às carnes não deterioradas, não foi possível separar as bactérias Gram positivas das Gram negativas presentes no meio VRBA modificado, já que o meio em questão não foi seletivo suficiente para baixas concentrações de enterobactérias; não sendo realizado, portanto o teste da oxidase.

Na tabela 15, está apresentada a caracterização dos isolados encontrados ao longo da linha de produção do frigorífico parceiro, divididas por pontos. Estão incluídas tanto as BAL como as enterobactérias.

**Tabela 15. Caracterização dos isolados provenientes da linha de produção do frigorífico juntamente com as temperaturas encontradas em cada ponto**

Isolado	Procedência	Macroscopia	Microscopia	Oxidase	Benzidina
F1 VRBA	Fezes	Circular, borda lisa regular, violeta	Bastonetes G(-), pequenos, sem arranjo	negativa	N.R.
F3 VRBA	Fezes	Circular, borda pouco irregular, avermelhada	Bastonetes G(-), médios, sem arranjo	negativa	N.R.
CA1 VRBA	Corredor de abate (porta)	Circular, borda lisa regular, violeta	Bastonetes G(-), pequenos, sem arranjo	negativa	N.R.
CA2 VRBA	Corredor de abate (canaleta)	Circular, borda lisa regular, violeta	Bastonetes G(-), pequenos, sem arranjo	negativa	N.R.
SD1 VRBA	Sala de desossa (mesa)	Circular, pontual, vermelho escuro	Bastonetes G(-), pequenos, sem arranjo	negativa	N.R.
SD2 MRS	Sala de desossa (chão)	Circular, médias, branca, isoladas	Cocos G(+), cadeia pelos extremos	N.R.	negativa
SD3.1	Sala de desossa (ralo)	Circular, borda lisa regular, violeta	Bastonetes G(-), pequenos, sem arranjo	negativa	N.R.
SD3.2	Sala de desossa (ralo)	Circular, borda lisa regular, violeta	Bastonetes G(-), pequenos, sem arranjo	negativa	N.R.
EC1 VRBA	Esteira de corte (início)	Circular, borda lisa regular, violeta	Bastonetes G(-), pequenos, sem arranjo	negativa	N.R.
EC2 VRBA	Esteira de corte (meio)	Circular, borda lisa regular, violeta	Bastonetes G(-), pequenos, sem arranjo	negativa	N.R.
EC3 VRBA	Esteira de corte (fim)	Circular, borda lisa regular, violeta	Bastonetes G(-), médios, sem arranjo	negativa	N.R.
EC3 MRS	Esteira de corte (fim)	Circular, médias, branca, isoladas	Cocos G(+), cadeia pelos extremos	N.R.	negativa
EE1 VRBA	Esteira de embalagem (início)	Circular, borda lisa regular, violeta	Bastonetes G(-), pequenos, sem arranjo	negativa	N.R.
EE1 MRS	Esteira de embalagem (início)	Circular, pequenas, brancas, isoladas	Cocos G(+), achatados, 2 a 2	N.R.	negativa

É preocupante se notar as altas temperaturas encontradas ao longo da linha, muito acima dos 7°C preconizados por Brasil (1990). Não há como se realizar um controle térmico na área do curral / confinamento nem no caminho que leva ao corredor de abate. Porém, no ambiente interno do frigorífico este controle deveria ser mais rígido. A temperatura de 15°C é ótima para o crescimento de micro-organismos psicrotróficos, como por exemplo *Clostridium* e enterobactérias. Houve também o crescimento de BAL na sala de desossa e nas esteiras de corte e embalagem.

#### ***5.4. Identificação dos isolados***

##### *5.4.1. Bactérias ácido lácticas*

Nas tabelas 16 são apresentadas as porcentagens de convergência e as espécies correspondentes dos isolados identificados como BAL pelo sistema API (bioMérieux®) (micro-organismos recuperados das amostras de carnes, bem como da linha de produção do frigorífico parceiro). No Anexo 2 estão caracterizados os perfis bioquímicos (fermentação anaeróbica de carboidratos) dos isolados.

Tabela 16. Espécies de BAL provenientes das amostras bovinas (deterioradas e não deterioradas) e da linha de produção do frigorífico parceiro

Isolado	Espécie	Convergência (%)
Grupo 1	<i>Lactobacillus brevis</i>	97.5%(boa identificação)
Grupo 2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp 1	84% (aceitável)
Grupo 3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.9% (excelente)
Grupo 4	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99.6% (boa identificação)
EC3 MRS*	<i>Lactococcus lactis</i> ssp 1	80.3% (muito boa identificação no gênero)
EE1 MRS**	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	93% (boa identificação)
SD2 MRS***	<i>Lactococcus lactis</i> ssp 1	93.8% (boa identificação)

\*fim da esteira de corte, \*\*início esteira de embalagem, \*\*\*chão da sala de desossa

Para se confirmar as espécies com baixa convergência, testes adicionais foram realizados. Para os lactococos do grupo 2 e provenientes de EC3, foi feito crescimento a 15°C em MRS Agar. Esta temperatura foi selecionada, pois o *L. lactis* consegue proliferar a essa temperatura, ao passo que o *Lactobacillus* sp. não é capaz.

Interessante notar que foram recuperadas 2 espécies de BAL homofermentativas, como: *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus pentosus*, e 2 espécies heterofermentativas, como: *Lactobacillus brevis* e *Leuconostoc mesenteroides* nos casos de estufamento das embalagens, pois estes últimos têm

como produto final de seu metabolismo, além do ácido láctico, o CO<sub>2</sub> (Jones *et al.*, 2008). Em contrapartida, apesar do *L. pentosus* possuir o metabolismo homofermentativo, em condições reduzidas de glicose no meio de crescimento, este micro-organismo é capaz de alternar sua via de obtenção de energia para a via pentose-fosfato ou heteroláctica, alterando assim as características do meio de cultivo, no caso estufando a embalagem (Borch *et al.*, 1991).

Em adição, Jones e colaboradores (2009) citam que a presença de *Lactococcus lactis* em concentrações de 10<sup>7</sup>UFC/mL são capazes de inibir totalmente o crescimento de *Clostridium estertheticum* em carnes frescas embaladas a vácuo, em decorrência de sua produção de bacteriocinas. Resultados similares desta inibição foram obtidos por Silva e colaboradores (2009a), onde nas amostras com contagens de BAL maiores que 10<sup>8</sup>UFC/mL de exsudato não foram recuperadas espécies de *Clostridium*.

#### 5.4.2. Enterobactérias

Na Tabela 17 são apresentadas as porcentagens de convergências obtidas para identificação das espécies de enterobactérias isoladas a partir das amostras deterioradas e não deterioradas analisadas.

Tabela 17. Espécies de enterobactérias provenientes das amostras bovinas (deterioradas e não deterioradas)

Isolado	Espécie	Convergência (%)
C7 I1 VRBA EX	<i>Hafnia alvei</i>	99.7% (excelente)
C9 I10 VRBA EX	<i>Hafnia alvei</i>	99.9% (excelente)
C8 I15 VRBA EX	<i>Hafnia alvei</i>	99.9% (excelente)
C10 I16 VRBA EX	<i>Serratia marcescens</i>	89.2% (muito boa identificação no gênero)
C11 I25 VRBA SUP	<i>Yersinia enterocolitica</i>	99.2% (muito boa)
C14 I31 VRBA EX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97.6% (boa)

Todas as culturas analisadas obtiveram altos índices de convergência na análise do perfil de fermentação dos carboidratos. A espécie *Hafnia alvei* representou 50% das bactérias identificadas. Estes resultados corroboram com pesquisas anteriores (Brightwell *et al.*, 2007; Hanna *et al.*, 1979) quando experimentos demonstraram que o micro-organismo em questão é grande produtor de gás e está envolvido em episódios de estufamento de embalagens de produtos embalados a vácuo em decorrência de grandes quantidades de H<sub>2</sub>S (Hanna *et al.*, 1979). A temperatura máxima de crescimento descrita por Moller e Kaufman (1954) é 40-42°C, sendo que não há crescimento 5°C, entretanto

Brighthwell e colaboradores (2007) reproduziram o defeito de estufamento mediante inoculação de linhagens de *Hafnia alvei* a 4°C, após 21 dias de incubação. Quando se considera os valores de pH para este micro-organismo, Hanna e colaboradores (1979) citam Patterson e Gibbs (1977) que reportam a *H. alvei* inoculada em carnes com alto pH (6.15) e estocadas a 4°C proporcionando odor “*queijo cottage*” a este produto; entretanto quando esta inoculação ocorre em carnes com pH normal (5.4 – 5.5), em condições similares de estocagem, não se observou alteração no odor do produto.

A presença da *H. alvei* em amostras de alimentos é preocupante, pois ela pode ser implicada em casos de endocardites, meningites e infecções do trato urinário (McBee e Schauer, 2006).

Além da carne bovina, este micro-organismo também está relacionado a outros alimentos, como peixes e produtos lácteos (Harrigan, 1998).

Além da *H.alvei*, a presença de outras espécies patogênicas nas amostras bovinas denota uma qualidade inferior da carne e um potencial risco à saúde da população, tais como a *Klebsiella pneumoniae* e a *Yersinia enterocolitica*.

A espécie *Klebsiella pneumoniae* (enterobactéria, bastonete Gram negativo) é frequentemente tida como *Enterobacteriaceae* dominante em carnes e superfícies de manuseio na sala de embalagem mas não na sala de desossa. Essa observação foi confirmada por dados de Cox e Mercuri (1978) em seus

estudos de enterobactérias em carnes já cortadas, sendo que Newton e colaboradores (1977) encontraram 21.5% de *Enterobacteriaceae* encontradas no couro dos animais e na planta de embalagem foi *K. pneumoniae*.

Estes resultados sugerem que este organismo tem um tempo de sobrevivência em carnes curto, portanto sua detecção no nível da desossa poderia indicar contaminação pós processo (abate, desossa), que por sua vez poderia indicar falta de condições higiênico-sanitárias no manuseio por parte dos trabalhadores.

*Klebsiella* sp. pode ser encontrado em amostras ambientais assim como na superfície de mucosas de mamíferos. Certas espécies, como por exemplo a *K. pneumoniae ssp. pneumoniae*, são patógenos oportunistas e estão associadas com doenças respiratórias e infecções no trato urinário em humanos (Podschun e Ullman, 1998).

Outra espécie patogênica identificada foi a *Yersinia enterocolitica*. Muitas linhagens virulentas podem ser encontradas em mamíferos, principalmente em porcos, porém já foi isolada de carne bovina, carne de cordeiro, vegetais, produtos lácteos e ovos (Fukushima, 1985). Assim como as outras espécies da família das *Enterobacteriaceae*, *Y. enterocolitica* é um bastonete Gram negativo, anaeróbico facultativo. Possuem algumas particularidades que as diferem das outras espécies da família, como: motilidade apenas a temperaturas inferiores a 30°C; formam

colônias em 48h ao invés de 24h; tem temperatura ótima de crescimento em 30°C e são capazes de crescer a 4°C (Carniel, 2006).

Casos clínicos são geralmente associados com fortes dores abdominais e diarreia. A transmissão pode se dar de pessoa para pessoa, através das mãos.

Na tabela 18 está apresentada a identificação das enterobactérias provenientes da linha de produção do frigorífico parceiro.

**Tabela 18. Identificação de enterobactérias provenientes da linha de processamento do frigorífico parceiro**

<b>Isolado</b>	<b>Espécie</b>	<b>Convergência (%)</b>	<b>Procedência</b>
<b>F1 VRBA</b>	<i>Escherichia coli</i>	99.9% (excelente)	Fezes
<b>F3 VRBA</b>	<i>Serratia odorifera</i>	99.9% (excelente)	
<b>CA1 VRBA</b>	<i>Escherichia coli</i>	98.6% (muito boa)	Corredor de abate (início e meio)
<b>CA2 VRBA</b>	<i>Escherichia coli</i>	99.7% (muito boa)	
<b>SD1 VRBA</b>	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	97.1% (boa identificação)	Sala de desossa (início e fim)
<b>SD3.1 VRBA</b>	<i>Ewingella americana</i>	99.9% (excelente)	
<b>SD3.2 VRBA</b>	<i>Buttiauxella agrestis</i>	93.6% (duvidoso)	
<b>EC1 VRBA</b>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	97.8% (muito boa)	Esteira de corte (início, meio e fim)
<b>EC2 VRBA</b>	<i>Hafnia alvei</i>	99.9% (excelente)	
<b>EC3 VRBA</b>	<i>Serratia marcescens</i>	94.9% (boa)	
<b>EE1 VRBA</b>	<i>Escherichia coli</i>	99.9% (excelente)	Início esteira de embalagem

O aparecimento de enterobactérias, tais como a *Escherichia coli*, é comum nas fezes dos animais e áreas de contato destas fezes, pois estes microorganismos são constituintes naturais da flora bacteriana do trato gastro-intestinal.

Porém, a recuperação destes isolados no corredor de abate e nas esteiras de corte e embalagem é preocupante. Em pesquisa conduzida por Stiles e Ng (1981) a *E. coli* foi recuperada a partir da pele e couro dos animais durante o processo de abate e estes pesquisadores citam que se o micro-organismo estiver na fase estacionária do crescimento nestes pontos, pode sobreviver às condições de acondicionamento e temperatura de estocagem durante a vida de prateleira do produto.

O corredor de abate é precedido pela sala de atordoamento. A presença de bactérias nesta etapa indica que os animais não sofreram uma higienização adequada durante o caminho percorrido pelos bois (*sprays* de água não atingem o corpo do animal de maneira uniforme, arrastando para a linha fezes contaminadas). O sistema de lavagem da linha (CIP) também pode estar comprometido.

A *E. coli* é o principal indicador de contaminação fecal, devido às suas características, entre elas, estar associada à matéria fecal e/ou patógenos intestinais, estar sempre presente e em grandes quantidades em matéria fecal ( $10^9$ UFC/g), não ser um contaminante natural, ser facilmente cultivado em meios de laboratório e de fácil diferenciação dos demais micro-organismos, se desenvolver e subsistir às mesmas condições de temperatura que o patógeno e não crescer a temperaturas inferiores às de conservação do alimento. Sua

presença nas esteiras pode indicar falta de higiene por parte dos trabalhadores deste setor ou o arraste destes micro-organismos ao longo de toda a linha de produção. Apesar de não existirem relatos da *E. coli* enteropatogênica no Brasil, a O:157 H:7 é causadora de quadro agudo de colite hemorrágica, levando anualmente a óbito cerca de 61 pessoas a partir de 73.000 casos relatados nos Estados Unidos (SESP, 2000).

A *Pseudomonas oryzihabitans* é a antiga denominação de *Flavimonas oryzihabitans*. Diferentemente das pseudomonas comuns, esta espécie é oxidase negativa. *F. oryzihabitans* já foi relacionada em quadros clínicos em pacientes com visão turva e embaçada (Tsai *et al.*, 2004). Na ocasião o paciente trabalhava como carregador de grãos provenientes do solo. Sua presença na sala de desossa pode indicar contaminação por parte dos trabalhadores, através de suas botas, demonstrando falta de barreiras higiênico-sanitárias. Espécies de *Pseudomonas* foram recuperadas a partir de bifes de carnes acondicionadas em embalagens a vácuo e estocadas por 9 semanas a 0-2°C. Essas espécies foram relacionadas ao esverdeamento e a presença de odor putrefativo em decorrência da degradação dos aminoácidos presentes na carne (Sutherland, 1975).

Foram identificadas 2 espécies consideradas “novos membros” da família *Enterobacteriaceae*. São elas: *Ewingella americana* e *Buttiauxella agrestis*.

A *E. americana* é uma enterobactéria típica (bastonete Gram negativo), 1,0 – 1,8 µm de comprimento com flagelos peritríquios e crescimento entre 15-37°C mas não a 40°C. Está distribuída no solo e na água e em animais inferiores, como mosquitos. Parece ser um patógeno humano raro, estando associada a septicemias e bacteremias em ambientes hospitalares (Janda, 2006).

A *B. agrestis* tem uma ampla faixa de crescimento (4-37°C), sendo que o ótimo está por volta de 36°C. O *habitat* primário seriam os moluscos, o solo e a água. Apenas uma espécie, *B. noackie*, foi recuperada de um caso clínico e encontrada também em alimentos (Janda, 2006). Mais uma vez, a presença de micro-organismos originários do solo na sala de desossa pode indicar falta de asseio por parte dos trabalhadores da área. A água acumulada no chão do ambiente também pode servir como reservatório destas espécies.

##### **5.5. Reprodução do defeito de estufamento das embalagens**

Em princípio, as amostras foram incubadas por até 4 semanas (nas 2 temperaturas de estudo, 4 e 15°C) para avaliação do potencial de estufamento dos isolados inoculados. A 4°C não foi observada alterações aparentes na embalagem ou no produto, sendo assim, pode-se considerar que todos os micro-organismos testados não conseguiram transpor a barreira da temperatura baixa, durante 4 semanas de incubação. Entretanto, a partir da 6ª semana, as

embalagens embaladas com *Hafnia alvei* apresentaram elevação no nível de exsudato, com formação de bolhas, e um estufamento incipiente. Moller (1954), ao descrever a espécie, disse que as linhagens de *Hafnia alvei* não seriam capazes crescer a temperaturas inferiores a 5°C, contudo, Brighthwell e colaboradores (2007), também conseguiram reproduzir o defeito de estufamento com linhagens da bactéria em questão. Todas as amostras incubadas a 4°C estão sendo mantidas para observações e estudos futuros.

Na tabela 19 é apresentado o grau de deterioração alcançado, após incubação a 15°C por 4 semanas.

Tabela 19. Resultados do teste de reprodução de defeito a partir de inoculação em bifes de contra-filé, para os isolados de enterobactérias e BAL, e leitura de pH do exsudato após abertura

Isolados	Condição / tempo de incubação	Resultados após incubação a 15°C			
		7 dias	14 dias	21 dias	30 dias / pH
Controle negativo	15°C (duplicata) / 4 semanas	- / -	- / -	+ / +	+ / + / 5.5
<i>Enterobactérias – isoladas de cortes cárneos</i>					
<i>Hafnia alvei</i>		+ / +	++ / ++	++++ / +++++	++++ / +++++ / 7.0
<i>Serratia marcescens</i>	15°C (duplicata) / 4 semanas	- / -	++ / ++	++ / ++	++ / ++ / 6.0
<i>Yersinia enterocolitica</i>		- / -	++ / ++	++ / ++	+++ / +++ / 7.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		- / -	++ / ++	+++ / +++	++++ / +++++ / 6.5
<i>Enterobactérias – isoladas do frigorífico parceiro</i>					
<i>Escherichia coli</i>	15°C (duplicata) / 4 semanas	- / -	++ / +	++ / ++	++ / ++ / 4.5
<i>Ewingella americana</i>		- / -	- / -	+ / -	++ / + / 4.5
<i>BAL – isoladas de cortes cárneos</i>					
<i>Lactobacillus brevis</i>		- / -	++ / ++	+++ / +++	+++ / +++ / 4.5
<i>Lactococcus lactis</i>	15°C (duplicata) / 4 semanas	- / -	+ / -	+ / -	+ / + / 5.5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		- / -	++ / +	+++ / ++	+++ / +++ / 4.9
<i>Lactobacillus pentosus</i>		- / -	+ / -	+ / ++	+++ / +++ / 5.5
<i>BAL – isoladas do frigorífico parceiro</i>					
<i>Lactococcus lactis</i>		- / -	+ / -	+ / -	+ / + / 5.5
<i>Lactococcus lactis</i>	15°C (duplicata) / 4 semanas	- / -	+ / +	+ / ++	++ / ++ / 5.5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		- / -	+ / -	++ / +	++ / ++ / 4.9
<i>Pseudomonas – isolada de cortes cárneos</i>					
<i>Pseudomonas sp.</i>	15°C (duplicata) / 4 semanas	- / -	+ / +	+ / + (esverdeamento)	+ / + / 6.5

- sem alteração
- + perda de vácuo
- ++ estufamento leve
- +++ grau moderado de estufamento
- ++++ estufamento forte

A tabela 19 mostra a avaliação visual semanal dos cortes embalados a vácuo incubados a 15°C. Houve inclusive perda de vácuo no controle após o 21° dia.

Decorridas as 4 semanas, uma das amostras em duplicata de cada isolado foi aberta assepticamente em fluxo laminar para verificar se o micro-organismo recuperado condizia com a espécie que foi inoculada e medição do pH; além disso foi feita a enumeração dos isolados, de acordo com o item 4.4.

A tabela 20 mostra as contagens obtidas, assim como a identificação dos isolados recuperados a partir do meio VRBA modificado após 4 dias de incubação a 37°C. A tabela 21 é similar a tabela 20 mas contém os isolados recuperados a partir do MRS Agar incubado em ambiente de microaerofilia a 30°C.

**Tabela 20. Enumeração e identificação de enterobactérias em VRBA modificado a partir de amostras provenientes de 4 semanas de ensaio de reprodução do defeito a 15°C**

<b>Isolado</b>	<b>Convergência em API 20E</b>	<b>Exsudato (UFC/mL)</b>	<b>Superfície (UFC/100cm<sup>2</sup>)</b>
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	1,75x10 <sup>4</sup>	<1
<i>Serratia marcescens</i>	95% (boa identificação)	2x10 <sup>6</sup>	1,16x10 <sup>4</sup>
<i>Hafnia alvei</i>	99.9% (excelente)	<1	3x10 <sup>5</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97.6% (boa identificação)	1,4x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	90% (boa identificação)	3x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>5</sup>
<i>Escherichia coli</i>	99.9% (excelente)	2x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>3</sup>
<i>Ewingella americana</i>	99.9% (excelente)	3x10 <sup>6</sup>	<1
<b>médias</b>		1,35x10 <sup>6</sup>	8,8x10 <sup>4</sup>

- API não realizado. Crescimento em meio seletivo para *Pseudomonas* TFT.

Tabela 21. Enumeração de BAL em MRS agar após 4 dias de incubação a 30°C em ambiente microaerófilico, a partir de micro-organismos provenientes de 4 semanas de ensaio de reprodução do defeito a 15°C.

isolado	Convergência em API 50 CHL	Exsudato (UFC/mL)	Superfície (UFC/100cm <sup>2</sup> )
<i>Lactobacillus pentosus</i> (controle)	99.4% (boa)	1,4x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>1</sup>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	99.6% (boa)	<1	2,73x10 <sup>7</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>	94.6% (boa)	<1	3,6x10 <sup>6</sup>
<i>Lactococcus lactis</i>	84% (muito boa no gênero)	1,47x10 <sup>8</sup>	<1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	90% (muito boa no gênero)	2,19x10 <sup>8</sup>	<1
<i>Lactococcus lactis</i>	95% (boa)	<1	3x10 <sup>7</sup>
<b>médias</b>		6,1x10 <sup>7</sup>	1,02x10 <sup>7</sup>

Vale lembrar que o controle presente na tabela 20 é referente aos 2 tipos de bactérias estudadas, tanto enterobactérias como BAL. Os controles negativos foram incubados nas 2 temperaturas de estudo porém só houve crescimento aparente a 15°C em MRS agar.

Comparando-se as médias encontradas, tanto para enterobactérias como para BAL, é interessante notar que houve diferença de até 3 ciclos log com relação à população encontrada na superfície do bife (as BAL são mais numerosas)

O micro-organismo recuperado do controle foi identificado como *Lactobacillus pentosus*, uma bactéria homofermentativa. Entretanto, Borch e

colaboradores (1991) afirma que esta espécie é capaz de produzir pequenas quantidades de CO<sub>2</sub>. A produção deste gás pode explicar o estufamento leve da embalagem, além da mudança da via homo para a heteroláctica de fermentação devido à depleção de glicose. Outro fato a se destacar é o tamanho da população encontrada. As contagens feitas a partir do exsudato atingiram 4 ciclos log, ao passo que as contagens da superfície atingiram 1 ciclo log, sendo no líquido o crescimento mais abundante.

Esta identificação do micro-organismo isolado na amostra concorda com a identificação do isolado C 16 I14 MRS EX / SUP, que teve como resultado o mesmo *Lactobacillus pentosus*. Porém, no corte embalado a vácuo inoculado com o micro-organismo em questão, a população atingiu 2,73x10<sup>7</sup> UFC/mL e obteve um grau de estufamento maior do que o observado no controle (estufamento moderado +++ vs. estufamento baixo ++ do controle).

Algo similar ocorre com o *Lactococcus lactis*. Apesar de ser uma espécie de BAL homofermentativa, após 30 dias de incubação notou-se a perda de vácuo na embalagem, embora não tenha havido o estufamento propriamente dito. É possível que com um tempo maior de incubação o defeito possa ser reproduzido.

As espécies heterofermentativas de BAL recuperadas (*Lactobacillus brevis* e *Leuconostoc mesenteroides*) obtiveram graus de estufamento moderados (+++) semelhantes ao grau encontrado no envelope com o isolado

homofermentativo (*L. pentosus*). Este dado demonstra que populações de BAL a partir de  $10^4$  UFC/mL, mesmo sendo homofermentativas, podem causar episódios de estufamento de embalagens em carnes embaladas a vácuo. Quando as populações atingem contagens na ordem de  $10^6$ UFC/mL ou /100cm<sup>2</sup> ou mais, o nível de estufamento é aumentado e reproduzido mais rapidamente.

Em adição, o fato de o defeito ser reproduzido a 15°C em menos de 1 mês comprova a importância de se evitar as temperaturas de abuso para carnes embaladas a vácuo. Não apenas para se evitar o desenvolvimento do *Clostridium* mas também BAL e enterobactérias.

Correlacionando-se os valores de pH com o nível de estufamento produzido pelas bactérias lácticas, observa-se que no geral as BAL com caráter homofermentativo produziram maiores reduções de pH (pH 5.5 carne normal – pH 4.5 carne inoculada com BAL homofermentativa). Esta queda de pH pode ser explicada quando se considera a acentuada produção ácidos produtos do metabolismo destas bactérias, dentre eles, ácido láctico e ácido acético (Jones *et al.*, 2004). Além disso, estas bactérias produziram perda do vácuo mas o estufamento notado foi pequeno, com exceção do *Lactobacillus pentosus*, que apresentou estufamento moderado, conforme descrito anteriormente.

Por outro lado, considerando-se as BAL heterofermentativas, apesar do alto nível de estufamento nas embalagens (comparando-se apenas as BAL),

notou-se que o pH continuou similar ao da carne antes da inoculação. Resultados similares foram obtidos por Jones e colaboradores (2004), em pesquisa na qual as amostras contaminadas com *L. mesenteroides* após 4 semanas de incubação apresentaram valores de pH levemente superiores ao inicial (de 5.44 para 5.53).

Comparando-se por fim, os valores de pH obtidos após a abertura das amostras inoculadas com linhagens de enterobactérias, verificou-se que no geral para os isolados provenientes das amostras de carne o pH após 4 semanas de incubação foi acima de 6. Já para os isolados provenientes do frigorífico parceiro esses valores tenderam para a acidez (pH 4.5 para *E. coli*). Este fato é facilmente explicado quando se considera o tipo de metabolismo envolvido em cada um dos grupos, por exemplo: no caso dos micro-organismos recuperados a partir dos cortes cárneos, a rota metabólica envolvida na obtenção de energia destas espécies é a rota do butileno-glicol. Nesta rota, no início do processo os micro-organismos produzem ácido a partir dos carboidratos presentes no meio, entretanto após certo ponto (pH ao redor de 6.5 ou 6.0) esta via cessa se iniciando a conversão do acetil em butileno-glicol, que possui caráter mais básico, não acidificando mais o meio. Por outro lado, no caso das superfícies do frigorífico, onde a *E.coli* foi predominante representando 36.4% dos isolados recuperados, ocorreu o metabolismo dos ácidos mistos, característico da espécie, que converte os carboidratos

presentes no meio em ácidos, podendo chegar até a valores de pH próximos a 4 (Welch, 2006).

Considerando-se os graus de estufamento é notório que a *Hafnia alvei* foi o isolado que proporcionou os maiores níveis dentre todos os micro-organismos testados (Figura 6). Resultados similares foram obtidos por Brighthwell e colaboradores (2007) e Hanna e colaboradores (1979).



**Figura 6. Distensão da embalagem após 4 semanas a 15°C em amostra inoculada com *Hafnia alvei*.**

## 6. CONCLUSÕES

Por meio desta pesquisa pode-se concluir que:

- ❖ A enumeração tanto de bactérias ácido lácticas (BAL) quanto de enterobactérias foi conduzida com êxito;
- ❖ Para as BAL os maiores valores de contagens foram recuperados para o exsudato, sendo em média,  $10^8$ UFC/mL para as amostras deterioradas e  $10^7$ UFC/mL para as não deterioradas, diferindo significativamente a  $p < 0.01$ ;
- ❖ Considerando-se a superfície do corte cárneo, obteve-se em média  $10^7$ UFC/100cm<sup>2</sup> para as amostras deterioradas e  $10^5$ UFC/100cm<sup>2</sup> para as amostras não deterioradas, valores que diferiram significativamente a  $p < 0.01$ ;
- ❖ Quando se comparou as contagens de BAL do exsudato com a superfície observou-se diferenças significativas a  $p < 0.01$ , estas diminuiram de 1 a 2 ciclos log;
- ❖ Para as enterobactérias, no exsudato das carnes deterioradas foram recuperadas populações de  $10^6$ UFC/mL e no das carnes não deterioradas,  $10^2$ UFC/mL, sendo estes resultados significativamente diferentes a  $p < 0.01$ ;

- ❖ Já, considerando-se a contaminação por enterobactérias na superfície, recuperou-se  $10^4$ UFC/100cm<sup>2</sup> para as amostras deterioradas e  $10^2$ UFC/100cm<sup>2</sup> para as não deterioradas, sendo estes resultados significativamente diferentes a  $p < 0.01$ ;
- ❖ Da enumeração de BAL em amostras de carne embalada a vácuo, foram isoladas 4 espécies diferenciadas: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus pentosus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus brevis*, destas, a de maior incidência foi *Lactococcus lactis*;
- ❖ Da enumeração de enterobactérias em amostras de carne embalada a vácuo, foram isoladas 4 espécies diferenciadas: *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica* e *Klebsiella pneumoniae*, destas, a *Hafnia alvei* correspondeu a 50% dos isolados;
- ❖ No levantamento realizado na linha de produção do frigorífico, observou-se uma temperatura abusiva nas salas de desossa e embalagem (15°C). Esta temperatura pode favorecer o enriquecimento da flora microbiana, diminuindo a eficiência do vácuo como barreira ao crescimento dos microrganismos;
- ❖ Ainda a partir da linha do frigorífico, foram recuperados **2 linhagens diferentes de BAL**, identificadas como: *Lactococcus lactis* (sala de desossa e esteira de corte) e *Leuconostoc mesenteroides* (esteira de embalagem); **8 linhagens de enterobactérias**, identificadas como:

*Escheria coli* (fezes, corredor de atordoamento e esteira de embalagem), *Serratia odorífera* (fezes), *Serratia marcescens* (esteira de corte), *Flavimonas oryzihibitans* (sala de desossa), *Ewingella americana* (sala de desossa), *Buttiauxella agrestis* (sala de desossa), *Enterobacter sakazakii* (esteira de corte) e *Hafnia alvei* (esteira de corte);

- ❖ A presença de *E.coli* na esteira de embalagem é preocupante, pois é um indicativo de má qualidade higiênico sanitária por parte dos operadores ou até mesmo um arraste de contaminação ao longo da linha de produção;
- ❖ No teste de reprodução do defeito o isolado que melhor desenvolveu as características de estufamento foi a *Hafnia alvei*; além disso, o estufamento se iniciou com 7 dias de incubação a 15°C (1 semana) ao passo que a 4°C demorou 42 dias (6 semanas) para ocorrer a formação de bolhas no exsudato e início da perda do vácuo.
- ❖ Apesar de que, de acordo com a literatura, os *Clostridium* psicrotróficos estão envolvidos nos episódios de estufamento de embalagens, nesta pesquisa concluímos que linhagens de BAL (homo e heterofermentativas) e enterobactérias também causam este defeito. Além disso, se os frigoríficos não se atentarem a manutenção de temperatura nas salas de desossa e embalagem da carne, bem como não melhorarem as condições higiênico sanitárias, o vácuo utilizado como

a barreira ao crescimento dos frequentes deterioradores de carnes não será eficiente, pois a carga inicial de micro-organismos será muito alta, decorrente tanto do ambiente tropical quanto nas falhas notadas em toda linha de produção.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). Disponível em: <http://www.abiec.com.br>. Acesso em 10/02/2010.
2. BENNETT, E. W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: Downs, F.P., Ito, K. (Eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association, Washington, DC, pp. 311–316. 2003.
3. BIOMÉRIEUX S. A. Manual API 50 CH ref 50 300, manual API 20 E ref 20 100. 2009.
4. 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**, 34, 271-275. 2001.
5. BOEREMA, J. A.; BRODA, D. M.; BELL, R. G.. Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures. **Letters in Applied Microbiology**, 36, 406-411. 2003.
6. BORCH, E.; BERG, H.; HOLST, O. Heterolactic fermentation by a homofermentative *Lactobacillus* sp. during glucose limitation in anaerobic continuous culture with complete cell recycle. **Journal of Applied Bacteriology**, 71, 265-269. 1991.

7. BRENNER, D.J. Enterobacteriaceae. *In: Bergey's manual of systematic bacteriology*. Eds.; Williams & Wilkins: London. Vol.1 p. 409-505. 1984.
8. BRIGHTWELL, G.; BOEREMA, J.; MILLS, J.; MOWAT, E.; PULFORD, D. Identifying the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by a culture-dependent and culture-independent 16S rRNA sequence analysis. **Int. J. of Food Microbiol.** **109**, 47 – 53. 2006.
9. BRIGHTWELL, G.; CLEMENS, R.; URLICH, S.; BOEREMA, J. Possible involvement of psychrotolerant *Enterobacteriaceae* in blow Pack spoilage of vacuum packaged raw meats. **Int. J. Food Microbiol.**, 2007
10. 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. **J. Appl. Microbiol.**, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04193.x. 2009.
11. BRODA, D.M.; BOEREMA, J.A.; BELL, R. G. PCR-detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing “blow Pack” spoilage of vacuum – packaged chilled meats. **J. Appl. Microbiol.**, **94**: 515-522, 2003.
12. BRODA, D.M.; LAWSON, P.A.; BELL, R.G. MUSGRAVE, D.R. *Clostridium frigicarnis* SP. Nov., a psychrotolerant bacterium associated with “blow Pack” spoilage of vacuum-packaged meats. **Int. J. Sys. Bacteriol.** , 49, 1539-1550, 1999.

13. BRODA, D. M.; LACY, K. M.; COOK, R. L.; BELL, R. G. Prevalence of cold-tolerant clostridia associated with vacuum-packed beef and lamb stored at abusive and chill temperatures. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 40, p. 93-98, 1997.
14. BRODA, D.M.; De LACY, K.M.; BELL, R.G.; BRAGGINS, T.J. COOK, R.L. Psychrotrophic *Clostridium* spp. Associated with "blown pack" spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.335-352. 1996a.
15. BRODA, D.M.; De LACY, K.M.; BELL, R.G.; PENNY N. Association of psychrotrophic *Clostridium* spp. with deep tissue spoilage of chilled vacuum-packed lamb. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.371-378. 1996b.
16. BRODY, A. L. Microbiological safety of modified/controlled atmosphere/vacuum packaged foods. In: Brody, A. L., Ed., **Controlled/Modified Atmosphere Vacuum Packaging of Foods**. Trumbull, CT: Food & Nutrition. Press, Inc., p. 159–174.1989.
17. BROOKS, J. L.; MOORE, A. S.; PATCHETT, R. A.; COLLINS, M. D.; KROLL, R. G. Use of the polymerase chain reaction and oligonucleotides probes for the rapid identification of *Carnobacterium* species from meat. **J. Appl. Microbiol**, 72, p. 294-301.1992

18. BROWN, W.E. **Plastics in food packaging: properties, design and fabrication.** Marcel Dekker ed., Nova York, Nova York. 1992.
19. CARNIEL, E. *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. In: **The Prokaryotes**, 6, p. 270-398. 2006.
20. CARR, J.G.; CUTTING, C.V.; WHITING, G.C. **Lactic acid bacteria in Beverages and food.** Academic Press, London p. 245-261. 1975.
21. CHEUN, H. I.; MAKINO S. I.; WATARAI, M.; SHIRAHATA, T.; UCHIDA, I.; TAKESHI, K. A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue. **J. Appl. Microbiol**, 91, pp 421 – 426. 2001.
22. COLLINS, M. D. ; FARROW, J. A. E. ; PHILLIPS, B. A. ; FERUSU, S. ; JONES, D. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, Rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. **Int. J. of Sys. Bact.**, 37: 310-316. 1987.
23. CORNELL UNIVERSITY. **Food Microbiology Laboratory Exercises Manual.** Ithaca, Nova York. 1983.
24. COX, N.A.; MERCURI, J.A. Comparison of two mini-kits (API and R-B) for identification of *Enterobacteriaceae* isolated from poultry and meat products. **J. Food. Prot.**, 41, p. 107-110. 1978.

25. DAINTY, R.H. Biochemistry of undesirable effects attributed to microbial growth on proteinaceous products at chill temperatures. **Food Chem.**, **9**, 103-113. 1982.
26. DAINTY, R.H.; MACKEY, B.M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilages processes. **J. Appl. Bacteriol.**, Symp. Suppl.**73**, 103S-14S. 1992.
27. DAVIES, A. R. Advances in modified-atmosphere packaging. **In: Gould, G. W., Ed. New Methods of Food Preservation.** New York: Blackie Academic & Professional, p. 304–320. 1995.
28. DEVRIESE, L. A.; POT, B.; COLLINS, M.D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. **J. Appl. Microbiol**, **75**, 399-408. 1993.
29. EGAN, A.F.; ROBERTS, T.A. Microbiology of meat and meat products. **In: Essays in Agricultural and Food Microbiology.** Wiley, Nova York. p. 167-197. 1987.
30. EGAN, A. F. Lactic acid bacteria of meat and meat products. **Ant. v. Leeuwenhoek** 49:327–336. 1983

31. EVANCHO, G.M.; SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; FRANK, J.F.  
Microbiological monitoring of the food processing environment. *In:*  
**Compendium of methods for microbiological examination of foods**, 4ed.  
P.25-35. 2001.
32. FRANZ C. M. A. P.; VON HOLY A. Bacterial populations associated with  
pasteurized vacuum-packed Vienna sausages. **Food Microbiology**, **13**:  
**165-174**. 1996.
33. FUKUSHIMA, H. Direct Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia*  
*pseudotuberculosis* from meat. **Applied and Environmental Microbiology**,  
50, 710-712. 1985.
34. GILL, A. O.; GILL, C.O. Preservative packaging for fresh meats, poultry  
and fin fish. **In: Innovations in Food Packaging**. J.H.Han (Ed). Elsevier Ltd,  
New York, 204-226. 2005.
35. GILL, C.O. Extending the storage life of raw chilled meats. **Meat Science**,  
**43**, p.99-109. 1996.
36. GILL, C.O.; PENNEY, N. Packaging conditions for extend storage of  
chilled dark, firm, dry beef. **Meat Science**, **18**, p. 41-53. 1986.
37. JANDA, J.M. New members of the family Enterobacteriaceae. **In: The**  
**Prokaryotes**, v.6, 5-40. 2006.

38. JUDICIAL COMMISSION. Opinion 28. Rejection of the bacterial generic name *Cloaca* Castellani and Chalmers and acceptance of *Enterobacter* Hormaeche and Edwards as a bacterial generic name with type species *Enterobacter cloacae* (Jordan) Hormaeche and Edwards. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**. 13:38. 1963.
39. HAMMES, W.P.; HERTEL, C. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. **In: The Prokaryotes**. 4, p. 320-404. 2006.
40. HORMAECHE, E.; EDWARDS, P. R. A proposal genus *Enterobacter*. **Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon**, 10, p. 71-74. 1960.
41. KALCHAYANAND, N.; RAY, B.; FIELD, R.A. Characteristics of psychrotrophic *Clostridium laramie* causing spoilage of vacuum-packaged refrigerated fresh and roasted beef. **Journal of food Protection**, v.56, p.13-17. 1993.
42. KALCHAYANAND, N.; RAY, B.; JOHNSON, M.C. Spoilage of vacuum-packaged beef by *Clostridium*. **Journal of Food Protection**, v.52, p.424-426. 1989.
43. KAUFFMANN, F. *Enterobacteriaceae*. 2<sup>nd</sup> ed. Copenhagen, Munksgaard. 1954.
44. KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. **In: Compendium of methods for microbiological examination of foods**, 4ed., p.69-87. 2001.

45. KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocyaneae* by the oxidase reaction. **Nature**, **178**, 703. 1956.
46. LING, J.M., HUI, Y.W., FRENCH, G.L. Evaluation of the Microbact-24E bacterial identification system. **J. Clin. Pathol.**, **41**, p. 910-914. 1988.
47. LAWSON, P.; DAINTY, R. H.; KRISTIANSEN, N.; BERG, J.; COLLINS, M. D. Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 153-157, 1994.
48. HANNA, M. O.; SMITH, G. C.; HALL, L. C.; VANDERZANT, C. Role of *Hafnia alvei* and a *Lactobacillus* species in the spoilage of vacuum-packaged strip loin steaks. **Journal of Food Protection**, v.42, p. 569-571, 1979.
49. HECHELMANN, H.; BEM, Z.; UCHIDA, K.; LEISNER, L. Vorkommen des Tribus Klebsiellae bei kühlgelagertem Fleisch und Fleischwaren. **Die Fleischwirtschaft**, **54**, p. 1515-1517. 1974.
50. HERTEL, C.; LUDWIG, W.; OBST, M.; VOGEL, R. F.; HAMMES, W. P.; SCHLEIFER, K. H. 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the rapid identification of meta lactobacilli. **Systematic Applied Microbiology** **14**, 173-177. 1991.
51. HITCHENER, B. J.; EGAN, A. F.; ROGERS, P. J. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. **J. Appl. Microbiol.** **52**: 31-37. 1982.

52. HOLMES, B.; WILLCOX, W. R.; LAPAGE, S. P. Identification of *Enterobacteriaceae* by the API 20E system. **Journal of Clinical Pathology**, **31**: p. 22-30. 1978.
53. JONES, R. J.; ZAGOREC, M.; BRIGHTWELL G.; TAGG, J.R. Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage. **Food Microbiology**, doi:10.1016/j.fm.2009.06.003. 2009.
54. JONES, R.J.; HUSSEIN, H.M.; ZAGOREC, M.; BRIGHTWELL, G.; TAGG, J. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. **Food Microbiology**, **25**, p. 228-234. 2008.
55. JONES, R.J. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. **Int. J. Food Microbiol.**, **90**: 273-282. 2004.
56. MANUAL PRÁTICO DE MICROBIOLOGIA. **Estudo bioquímico e metabólico de bacilos Gram negativos**, capítulo 08. Disponível em: [http://legasmoniz.edu.pt/ficheiros/alunos/anos\\_antteriores/microbiologia/pratica/CAPITULO08.pdf](http://legasmoniz.edu.pt/ficheiros/alunos/anos_antteriores/microbiologia/pratica/CAPITULO08.pdf). Acesso em 25/02/2010.
57. MCBEE, M. E.; SCHAUER, D. B. The Genus *Hafnia*, *In: The Prokaryotes*, **6**, p. 215-218. 2006.

58. MOLLER, V. Distribution of amino acid decarboxylases in *Enterobacteriaceae*. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand.** **35**, p. 259-277, 1954.
59. MONTEL, M. C.; TALON, R.; FOURNAUD, J.; CHAMPOMIER, M. C. A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* from meat. **J. Appl. Microbiol** **70**, p. 469-472. 1991.
60. MOSSEL, D. A. A.; CORRY, J. E. L.; STRUIJK, C. B. ; BAIRD, R. M. **Essentials of the microbiology of foods**. John Wiley & Sons. P.15-30. 1995.
61. MOSSEL, D.A.A. Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. **Antoine van Leeuwenhoek**, **48**, p. 609-611. 1982a.
62. MOSSEL, D. A. A.; MENGERINK, W. H. J.; SCHOLTS, H. H. Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of *Enterobacteriaceae*. **Journal of Bacteriology**, **84**, p.381. 1962.
63. NISSEN, H.; HOLCK, A.; DAINTY, R. H. Identification of *Carnobacterium* spp. and *Leuconostoc* ssp. in meat by genus-specific 16S rRNA probes. **Letters in Applied Microbiology** **19**, 165-168. 1999.

64. NISSEN, H.; DAINTY, R. Comparison of the use of rRNA probes and conventional methods in identifying strains of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* isolated from meat. **Int. J. Food Microbiol.** **25**, 311-315. 1995.
65. NORTJE, G. L.; NEL, L.; JORDAAN, E.; BADENHORSKT, K.; GOEDHARET, E.; HOLZAPFEL, W.H. The aerobic psychrotrophic populations on meat and meat contact surfaces in a meat production system and on meat stored at chill temperatures. **Journal of Applied Bacteriology** **68**, 331-344. 1990.
66. PACHECO-SANCHEZ, C.P. Relatório técnico de pós-doutorado júnior. Processo: 154265/2006-3. Disponível em: <http://www.cnpq.br>. 2008.
67. PATTERSON J.T.; GIBBS P. A. Incidence and Spoilage Potential of Isolates from Vacuum – packaged Meat of High pH Value. **Journal of Applied Bacteriology**, **43**, 25-28. 1977.
68. PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.** **11**, p. 589–603. 1998a.
69. ROÇA, R.O. Tecnologia da carne e produtos derivados. **Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP**, 2000.
70. ROSS, H.E. *Clostridium putrefaciens*: a neglected anaerobe. **Journal of Applied Bacteriology**, v.28, p.49-51. 1965.

71. SAKALA R. M.; HAYASHIDANI, H.; KATO Y.; KANEUCHI C.; OGAWA M.  
Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. **J. Appl. Microbiol**, **92**, 173-179. 2002.
72. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M. de; CANAVESI, E.  
Carnes, aves, pescados e derivados. In: **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**, Campinas, SP: CETEA, p. 151-174. 2001.
73. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. Embalagem a vácuo e com atmosfera modificada para carnes frescas. In: CETEA, Ital (Org.) **Embalagens para produtos cárneos**. Campinas, SP: CETEA, p. 1-20. 1991.
74. SILVA, A.R., PACHECO-SANCHEZ, C.P., CHAVES, R.D., MASSAGUER, P.R. Quantification and identification of psychrotrophic *Clostridium* sp. spores from vacuum packed chilled Brazilian red meat. *In: Spore forming bacteria in food*. Quimper, França, 15 – 17 junho de 2009.
75. SILVA, A. R.; PACHECO-SANCHEZ, C.P.; CHAVES, R.D.; MASSAGUER, P.R. Enumeration and characterization of psychrotrophic *Clostridium* ssp. associated with the spoilage of vacuum packed chilled brazilian meat. **CIGR – International Conference of Agricultural Engineering**. Brasil, 31.08 – 04.09. 2008.

76. STACKEBRANDT, E.; TEUBER, M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 317-324. 1988.
77. STEEL, K.J. The oxidase reaction as a taxonomic tool. *J. Gen. Microbiol.*, 25, p.297-306. 1961.
78. STILES, M. E.; NG, L. K. *Enterobacteriaceae* associated with meats and meat handling. *Appl. And Env. Microbiol.* 41, 867-872. 1981.
79. SUTHERLAND, J.P.; PATTERSON, J.T.; MURRAY, J.G. Changes in the microbiology of vacuum-packaged beef. *J. appl. Bact.*, 39, p. 227-237. 1975.
80. SVEUM, W. H. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: Ito, K (ed) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association, Washington, DC, pp 51-74, 1992.
81. TORRIANI, S.; VAN REENEN, C. A.; KLEIN, G.; REUTER, G.; DELLAGLIO, F.; DICKS, L. M. T. *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* subsp. nov. and *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *sake* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *carnosus* subsp. nov., new subspecies of *Lactobacillus curvatus* Abo-Elnaga and Kandler, 1965 and *Lactobacillus sake* Katagiri, Kitahara and Fukami 1934 (Klein et al., 1996, emended descriptions) respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, p.1158–1163. 1996.

82. TSAI, C., K.; LIU, C.C.; KUO, H.K. Postoperative endophthalmitis by *Flavimonas oryzihabitans*, **Chang Gung Medical Journal**, **27**, p.830-833. 2004.
83. WELCH, R.A. The Genus *Escherichia*. *In: The Prokaryotes*, **6**, p.60-72. 2006.
84. WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, **51**, 221-271. 1987.
85. ZAHRA, M. K.; HELMY, Z. A.; MUSLER, R. M. Bacteriological flora of meat and meat products. **Zbl. Mikrobiol.**, **140**, p.55-58. 1985.
86. YOST, C.K.; NATTRESS, F.M. The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. **Letters in Applied Microbiology**, **31**, p. 129-133. 2000.

## 8. ANEXO 1 – MEIOS DE CULTURA MODIFICADOS

### Meio API 50 CHL

Polipeptona	10g
Extrato de levedura	5g
Tween 80	1mL
Fosfato dipotássio	2g
Acetato de sódio	3 H <sub>2</sub> O 5g
Citrato diamônio	2g
Sulfato de magnésio	7 H <sub>2</sub> O 0.20g
Sulfato de manganês	4 H <sub>2</sub> O 0.05g
Bromocresol púrpura	0.17g
Água destilada	1000mL

### VRBA (Oxoid) modificado acrescido de 1 % de glicose (Mossel *et al.*, 1962)

Extrato de levedura	3 g
Peptona	7 g
Sais biliares n°3	1.5 g
Lactose	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Agar	15 g
Vermelho neutro	0.03 g
Cristal violeta	2 mg
Glicose	10 g
Água destilada	1000 mL

**CBA (Difco) acrescido de 5 % de sangue de ovino desfibrinado estéril**

Caseína pancreática digerida	10 g
Peptona proteose nº3	5 g
Extrato de levedura	5 g
Bife coração digerido	3 g
Amido de milho	1 g
Cloreto de sódio	5 g
Agar	15 g
Água destilada	1000 mL

## **9. ANEXO 2 – PERFIL DE FERMENTAÇÃO DOS ISOLADOS**

<i>F1 E coli 99.9%</i>		<i>CA1 E coli 98.6%</i>	
carboidratos	leitura em 24h	carboidratos	leitura em 24h
ONPG	positivo	ONPG	positivo
ADH	negativo	ADH	negativo
LDC	positivo	LDC	positivo
ODC	positivo	ODC	positivo
QT	negativo	QT	negativo
H2S	negativo	H2S	negativo
URE	negativo	URE	positivo
TDA	negativo	TDA	negativo
IND	positivo	IND	positivo
VP	negativo	VP	positivo
GEL	negativo	GEL	negativo
GLU	positivo	GLU	positivo
MAN	positivo	MAN	positivo
INO	negativo	INO	negativo
SOR	positivo	SOR	positivo
RHA	positivo	RHA	positivo
SAC	negativo	SAC	positivo
MEL	positivo	MEL	positivo
AMY	negativo	AMY	negativo
ARA	positivo	ARA	positivo
OX	negativo	OX	negativo
<i>EC2 Hafnia alvei 99.9%</i>		<i>EC3 Serratia marcescens 94.9%</i>	
carboidratos	leitura em 24h	carboidratos	leitura em 24h
ONPG	positivo	ONPG	positivo
ADH	negativo	ADH	negativo
LDC	positivo	LDC	negativo
ODC	positivo	ODC	positivo
QT	positivo	QT	positivo
H2S	negativo	H2S	negativo
URE	negativo	URE	positivo
TDA	negativo	TDA	negativo
IND	negativo	IND	positivo
VP	positivo	VP	positivo
GEL	negativo	GEL	positivo
GLU	positivo	GLU	positivo
MAN	positivo	MAN	positivo
INO	negativo	INO	positivo
SOR	negativo	SOR	positivo
RHA	positivo	RHA	negativo
SAC	negativo	SAC	positivo
MEL	negativo	MEL	negativo
AMY	negativo	AMY	positivo
ARA	positivo	ARA	positivo
OX	negativo	OX	negativo

<i>EE1 E coli 99.9%</i>			<i>EC1 Enterobacter sakazakii 97.8%</i>		
carboidratos		leitura em 24h	carboidratos		leitura em 24h
ONPG		positivo	ONPG		positivo
ADH		negativo	ADH		positivo
LDC		positivo	LDC		negativo
ODC		positivo	ODC		positivo
QT		negativo	QT		positivo
H2S		negativo	H2S		positivo
URE		negativo	URE		negativo
TDA		negativo	TDA		negativo
IND		positivo	IND		positivo
VP		negativo	VP		positivo
GEL		negativo	GEL		positivo
GLU		positivo	GLU		positivo
MAN		positivo	MAN		positivo
INO		negativo	INO		positivo
SOR		positivo	SOR		positivo
RHA		positivo	RHA		positivo
SAC		negativo	SAC		positivo
MEL		positivo	MEL		positivo
AMY		negativo	AMY		positivo
ARA		positivo	ARA		positivo
OX		negativo	OX		negativo
<i>F3 Serratia odorifera 99.9%</i>			<i>CA2 E coli 99.7%</i>		
carboidratos		leitura em 24h	carboidratos		leitura em 24h
ONPG		positivo	ONPG		positivo
ADH		negativo	ADH		negativo
LDC		positivo	LDC		positivo
ODC		positivo	ODC		positivo
QT		positivo	QT		negativo
H2S		negativo	H2S		negativo
URE		negativo	URE		negativo
TDA		negativo	TDA		negativo
IND		negativo	IND		positivo
VP		positivo	VP		negativo
GEL		negativo	GEL		negativo
GLU		positivo	GLU		negativo
MAN		positivo	MAN		positivo
INO		negativo	INO		negativo
SOR		negativo	SOR		positivo
RHA		positivo	RHA		positivo
SAC		negativo	SAC		positivo
MEL		negativo	MEL		positivo
AMY		negativo	AMY		negativo
ARA		positivo	ARA		positivo
OX		negativo	OX		negativo

<i>SD3.1 Ewingella americana 99.9%</i>			<i>SD3.2 Buttiauxella agrestis 93.6</i>		
carboidratos		leitura em 24h	carboidratos		leitura em
ONPG		positivo	ONPG		positivo
ADH		negativo	ADH		negativo
LDC		negativo	LDC		negativo
ODC		negativo	ODC		positivo
QT		positivo	QT		positivo
H2S		negativo	H2S		negativo
URE		negativo	URE		negativo
TDA		negativo	TDA		negativo
IND		negativo	IND		negativo
VP		positivo	VP		negativo
GEL		negativo	GEL		positivo
GLU		positivo	GLU		positivo
MAN		positivo	MAN		positivo
INO		negativo	INO		negativo
SOR		negativo	SOR		negativo
RHA		negativo	RHA		positivo
SAC		negativo	SAC		negativo
MEL		negativo	MEL		positivo
AMY		negativo	AMY		positivo
ARA		negativo	ARA		positivo
OX		negativo	OX		negativo
<i>SD1 Pseudomonas oryzihabitans 97.1%</i>					
carboidratos		leitura em 24h			
ONPG		negativo			
ADH		negativo			
LDC		negativo			
ODC		negativo			
QT		positivo			
H2S		negativo			
URE		negativo			
TDA		negativo			
IND		negativo			
VP		negativo			
GEL		negativo			
GLU		negativo			
MAN		negativo			
INO		negativo			
SOR		negativo			
RHA		negativo			
SAC		negativo			
MEL		positivo			
AMY		negativo			
ARA		negativo			
OX		negativo			

<i>C8 I15 VRBA EX Hafnia alvei 99.9%</i>		<i>C11 I25 VRBA SUP Yersinia enterocolitica 99.2%</i>	
carboidratos	leitura em 24h	carboidratos	leitura em 24h
ONPG	positivo	ONPG	negativo
ADH	negativo	ADH	negativo
LDC	positivo	LDC	negativo
ODC	positivo	ODC	positivo
QT	negativo	QT	negativo
H2S	negativo	H2S	negativo
URE	negativo	URE	positivo
TDA	negativo	TDA	positivo
IND	negativo	IND	positivo
VP	positivo	VP	negativo
GEL	negativo	GEL	negativo
GLU	positivo	GLU	positivo
MAN	positivo	MAN	positivo
INO	negativo	INO	positivo
SOR	negativo	SOR	positivo
RHA	positivo	RHA	negativo
SAC	negativo	SAC	positivo
MEL	negativo	MEL	negativo
AMY	negativo	AMY	positivo
ARA	positivo	ARA	positivo
OX	negativo	OX	negativo
<i>C14 I31 VRBA EX Klebsiella pneumoniae 97.6%</i>			
carboidratos	leitura em 24h		
ONPG	negativo		
ADH	negativo		
LDC	positivo		
ODC	negativo		
QT	positivo		
H2S	negativo		
URE	positivo		
TDA	negativo		
IND	negativo		
VP	positivo		
GEL	negativo		
GLU	positivo		
MAN	positivo		
INO	positivo		
SOR	positivo		
RHA	positivo		
SAC	positivo		
MEL	positivo		
AMY	positivo		
ARA	positivo		
OX	negativo		

EE 1 <i>L. mesenteroides</i> 93%		EC 3 <i>Lactococcus lactis</i> spp 1 80.3%	
carboidratos	leitura em 48h	carboidratos	leitura em 48h
controle	negativo	controle	negativo
Gly	negativo	Gly	negativo
Ery	negativo	Ery	negativo
DARA	negativo	DARA	negativo
LARA	positivo	LARA	positivo
RIB	positivo	RIB	positivo
DXYL	negativo	DXYL	negativo
LXYL	negativo	LXYL	negativo
ADO	negativo	ADO	negativo
MDX	negativo	MDX	negativo
GAL	positivo	GAL	positivo
GLU	positivo	GLU	positivo
FRU	positivo	FRU	positivo
MNE	positivo	MNE	positivo
SBE	negativo	SBE	negativo
RHA	negativo	RHA	negativo
DUL	negativo	DUL	negativo
INO	negativo	INO	negativo
MAN	positivo	MAN	positivo
SOR	negativo	SOR	negativo
MDM	negativo	MDM	negativo
MDG	positivo	MDG	positivo
NAG	positivo	NAG	positivo
AMY	negativo	AMY	negativo
ARB	positivo	ARB	positivo
ESC	positivo	ESC	positivo
SAL	positivo	SAL	positivo
CEL	positivo	CEL	positivo
MAL	positivo	MAL	positivo
LAC	positivo	LAC	positivo
MEL	positivo	MEL	positivo
SAC	positivo	SAC	positivo
TER	positivo	TER	positivo
INU	negativo	INU	negativo
MLZ	negativo	MLZ	negativo
RAF	positivo	RAF	positivo
AMD	negativo	AMD	negativo
GLYG	negativo	GLYG	negativo
XLT	negativo	XLT	negativo
GEN	positivo	GEN	positivo
TUR	positivo	TUR	positivo
LYX	negativo	LYX	negativo
TAG	negativo	TAG	negativo
DFUC	negativo	DFUC	negativo
LFUC	negativo	LFUC	negativo
DARL	negativo	DARL	negativo
LARL	negativo	LARL	negativo
GNT	negativo	GNT	negativo
2KG	negativo	2KG	negativo
5KG	negativo	5KG	negativo

SD2 Lactococcus lactis spp 1 93.8%			Grupo 1 Lactobacillus brevis 97.5%	
carboidratos	leitura em 48h		carboidratos	leitura em 48h
controle	negativo		controle	negativo
Gly	positivo		Gly	negativo
Ery	negativo		Ery	negativo
DARA	negativo		DARA	negativo
LARA	positivo		LARA	positivo
RIB	positivo		RIB	positivo
DXYL	negativo		DXYL	negativo
LXYL	negativo		LXYL	negativo
ADO	negativo		ADO	negativo
MDX	negativo		MDX	negativo
GAL	positivo		GAL	positivo
GLU	positivo		GLU	positivo
FRU	positivo		FRU	positivo
MNE	positivo		MNE	positivo
SBE	negativo		SBE	negativo
RHA	negativo		RHA	negativo
DUL	negativo		DUL	negativo
INO	negativo		INO	negativo
MAN	positivo		MAN	negativo
SOR	negativo		SOR	negativo
MDM	negativo		MDM	negativo
MDG	negativo		MDG	negativo
NAG	positivo		NAG	positivo
AMY	positivo		AMY	positivo
ARB	positivo		ARB	positivo
ESC	positivo		ESC	positivo
SAL	positivo		SAL	positivo
CEL	positivo		CEL	positivo
MAL	positivo		MAL	positivo
LAC	positivo		LAC	negativo
MEL	positivo		MEL	positivo
SAC	negativo		SAC	positivo
TER	positivo		TER	positivo
INU	negativo		INU	negativo
MLZ	negativo		MLZ	negativo
RAF	negativo		RAF	negativo
AMD	negativo		AMD	negativo
GLYG	negativo		GLYG	negativo
XLT	negativo		XLT	negativo
GEN	positivo		GEN	positivo
TUR	negativo		TUR	negativo
LYX	negativo		LYX	negativo
TAG	negativo		TAG	negativo
DFUC	negativo		DFUC	negativo
LFUC	negativo		LFUC	negativo
DARL	negativo		DARL	negativo
LARL	negativo		LARL	negativo
GNT	negativo		GNT	positivo
2KG	negativo		2KG	negativo
5KG	negativo		5KG	negativo

<i>Grupo 2 Lactococcus lactis 84%</i>		<i>Grupo 3 L. mesenteroides 99.9%</i>	
carboidratos	leitura em 48h	carboidratos	leitura em 48h
controle	negativo	controle	negativo
Gly	negativo	Gly	negativo
Ery	negativo	Ery	negativo
DARA	negativo	DARA	negativo
LARA	positivo	LARA	positivo
RIB	positivo	RIB	positivo
DXYL	negativo	DXYL	negativo
LXYL	negativo	LXYL	negativo
ADO	negativo	ADO	negativo
MDX	negativo	MDX	negativo
GAL	positivo	GAL	positivo
GLU	positivo	GLU	positivo
FRU	positivo	FRU	positivo
MNE	positivo	MNE	positivo
SBE	negativo	SBE	negativo
RHA	negativo	RHA	negativo
DUL	negativo	DUL	negativo
INO	negativo	INO	negativo
MAN	positivo	MAN	positivo
SOR	negativo	SOR	negativo
MDM	negativo	MDM	negativo
MDG	positivo	MDG	positivo
NAG	positivo	NAG	positivo
AMY	negativo	AMY	negativo
ARB	positivo	ARB	positivo
ESC	positivo	ESC	positivo
SAL	positivo	SAL	positivo
CEL	positivo	CEL	positivo
MAL	positivo	MAL	positivo
LAC	positivo	LAC	positivo
MEL	positivo	MEL	positivo
SAC	positivo	SAC	positivo
TER	positivo	TER	positivo
INU	negativo	INU	negativo
MLZ	negativo	MLZ	negativo
RAF	positivo	RAF	positivo
AMD	negativo	AMD	negativo
GLYG	negativo	GLYG	negativo
XLT	negativo	XLT	negativo
GEN	positivo	GEN	positivo
TUR	positivo	TUR	positivo
LYX	negativo	LYX	negativo
TAG	negativo	TAG	negativo
DFUC	negativo	DFUC	negativo
LFUC	negativo	LFUC	negativo
DARL	negativo	DARL	negativo
LARL	negativo	LARL	negativo
GNT	negativo	GNT	negativo
2KG	negativo	2KG	negativo
5KG	negativo	5KG	negativo

Grupo 4 <i>L. pentosus</i> 99.9%	
carboidratos	leitura em 48h
controle	negativo
Gly	positivo
Ery	negativo
DARA	negativo
LARA	positivo
RIB	positivo
DXYL	positivo
LXYL	negativo
ADO	negativo
MDX	negativo
GAL	positivo
GLU	positivo
FRU	positivo
MNE	positivo
SBE	negativo
RHA	negativo
DUL	negativo
INO	negativo
MAN	positivo
SOR	negativo
MDM	negativo
MDG	positivo
NAG	positivo
AMY	positivo
ARB	positivo
ESC	positivo
SAL	positivo
CEL	positivo
MAL	positivo
LAC	positivo
MEL	positivo
SAC	positivo
TER	positivo
INU	negativo
MLZ	negativo
RAF	negativo
AMD	negativo
GLYG	negativo
XLT	negativo
GEN	positivo
TUR	negativo
LYX	negativo
TAG	negativo
DFUC	negativo
LFUC	negativo
DARL	negativo
LARL	negativo
GNT	positivo
2KG	negativo
5KG	negativo

C7111 VRBA EX <i>Hafnia alvei</i> 99.7%			C9110 VRBA EX <i>Hafnia alvei</i> 99.2%		
carboidratos	leitura em 24h		carboidratos	leitura em 24h	
ONPG	positivo		ONPG	positivo	
ADH	negativo		ADH	negativo	
LDC	positivo		LDC	positivo	
ODC	positivo		ODC	positivo	
GIT	positivo		GIT	positivo	
H2S	negativo		H2S	negativo	
URE	negativo		URE	negativo	
TDA	negativo		TDA	negativo	
IND	negativo		IND	negativo	
VP	positivo		VP	positivo	
GEL	negativo		GEL	negativo	
GLU	positivo		GLU	positivo	
MAN	positivo		MAN	positivo	
INO	negativo		INO	negativo	
SOR	negativo		SOR	negativo	
RHA	positivo		RHA	positivo	
SAC	negativo		SAC	negativo	
MEL	negativo		MEL	negativo	
AMY	negativo		AMY	negativo	
ARA	negativo		ARA	positivo	
OX	negativo		OX	negativo	

