

ESTUDO DA MICROBIOTA ENVOLVIDA NA DETERIORAÇÃO “BLOWN PACK” DE CORTES CÁRNEOS EMBALADOS A VÁCUO

STUDY OF THE MICROBIOTA INVOLVED IN THE "BLOWN PACK"
SPOILAGE OF VACUUM-PACKED BEEF

O. D. ROSSI JÚNIOR^{1*}, L. M. FELIPE¹, T. M. MARTINELI¹, A. J. MESQUITA²

RESUMO

A deterioração “blown pack” é caracterizada por abundante produção de gás e odor desagradável, induzindo à completa distensão da embalagem durante o processo de estocagem sob refrigeração de cortes cárneos embalados a vácuo. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de determinar os possíveis microrganismos envolvidos nessa deterioração através da quantificação e caracterização das populações de *Enterobacteriaceae* e quantificação de bactérias ácido-láticas, além da pesquisa de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*, através da PCR, em carnes próprias para o consumo e em carnes que apresentaram a deterioração “blown pack”. Foram analisadas 54 peças de carne embaladas a vácuo, sendo 27 com deterioração e 27 sem deterioração. As populações médias de enterobactérias foram de $1,7 \times 10^6$ UFC/mL para amostras deterioradas e de $5,5 \times 10^3$ UFC/mL nas não deterioradas, de bactérias ácido-láticas foram, respectivamente, de $5,5 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^5$ UFC/mL. Dentre as enterobactérias, a espécie de maior prevalência foi *Hafnia alvei*. A maior frequência de amostras positivas para o *Clostridium estertheticum* foram aquelas apresentando a deterioração “blown pack”. Não houve diferença estatística significativa para a presença do *Clostridium gasigenes* entre amostras com deterioração “blown pack” e carnes não deterioradas. Concluiu-se que a principal forma de controle desta deterioração é a prevenção da contaminação da carne por material fecal.

PALAVRAS-CHAVES: Carne embalada vácuo. Clostrídios psicofílicos. Deterioração “blown pack”. Enterobactérias.

SUMMARY

"Blown pack" spoilage is characterized by abundant production of gas and off-odor leading to complete distention of the packing during refrigerated storage of vacuum-packed meat cuts. Therefore, the aim of this experiment was to determine the possible microorganisms involved in this spoilage by quantification and characterization of the population of *Enterobacteriaceae*, quantification of lactic-acid bacteria and further research of *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* by PCR in the meat for consumption and meat with the "blown pack" spoilage. Fifty-four vacuum-packed meat were analyzed of which 27 spoiled and 27 non-spoiled. The media populations of enterobacteria were $1,7 \times 10^6$ CFU/mL for spoiled and $5,5 \times 10^3$ CFU/mL for non-spoiled samples, and for lactic-acid bacteria were, respectively $5,5 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^5$ CFU/mL. Among enterobacteria, the more prevalent species was *Hafnia alvei*. The higher frequency of positive samples to *Clostridium estertheticum* were those ones presenting “blown pack” spoilage. There was no significant statistical difference for the presence of *Clostridium gasigenes* between samples of "blown pack" spoilage and non-spoiled meat. It was concluded that the main method to control this spoilage is to preventing the contamination of the meat with fecal material.

KEY WORDS: "Blown pack" spoilage. Enteric bacteria. Psychrophilic clostridia. Vacuum-packed meat.

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp), Campus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900. Jaboticabal, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência: rossijr@fcav.unesp.br.

²Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás.

INTRODUÇÃO

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

Desde 1989, quando a relação entre deterioração por tufamento de embalagens a vácuo e clostrídios psicofílicos foi primeiramente estabelecida (DAINTY et al., 1989), pesquisas têm sido realizadas objetivando determinar a origem dos processos de contaminação com o intuito de se reduzir a deterioração causada por membros do gênero *Clostridium*, apontados como os principais agentes causadores deste tipo de deterioração (MOSCHONAS et al., 2009; YANG et al., 2009).

Apesar dos estudos de Dainty et al. (1989) e BRODA et al. (2000) terem apontado as espécies psicofílicas *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* como agentes causadores de tufamento em cortes cárneos mantidos sob temperaturas entre -1,5 e 2°C, outros estudos realizados na tentativa de estabelecer a prevalência destes clostrídios em carnes refrigeradas, sugeriram a possibilidade de membros da família *Enterobacteriaceae* serem também determinantes da deterioração “blown pack”, pois os mesmos foram encontrados em todas as amostras que apresentavam este tipo de deterioração, independentemente da presença de clostrídios tolerantes ao frio (BRODA, 1997; BRIGHTWELL et al., 2007).

Na indústria de carne, a poeira, a água e as fezes de animais que ficam aderidas à pele são consideradas fontes de contaminação primária das carcaças, tanto por microrganismos do grupo dos clostrídios como do grupo das enterobactérias (BOEREMA et al., 2003).

Baseando-se nas considerações apresentadas e o fato de que a deterioração “blown pack” tem levado a significativos prejuízos de ordem econômica, realizou-se o presente estudo que teve por objetivos determinar a presença e o número de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e de bactérias produtoras de ácido láctico, além da frequência de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* em carnes próprias para consumo e carnes que apresentavam a deterioração, com o intuito de obter informações que contribuam para a adoção de medidas que possam prevenir o problema.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

O material utilizado para a realização deste experimento constou de 54 peças de carne embaladas a vácuo, produzidas sob controle sanitário permanente por meio do Serviço de Inspeção Federal. Vinte e sete

delas apresentavam a deterioração “blown pack” e foram cedidas por indústrias frigoríficas, as outras vinte e sete foram obtidas no comércio varejista, escolhidas aleatoriamente, desde que se apresentassem em perfeito estado de conservação, com características físicas e sensoriais típicas, representando assim o grupo sem a deterioração.

Cada amostra foi representada por uma peça do produto, de acordo com sua apresentação para a venda e procediam de indústrias pertencentes a diferentes estados brasileiros, como os estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Pará e Paraná. Os cortes utilizados foram patinho, contra-filé, filé-mignon, maminha, picanha, alcatra, lagarto, filé de costela, fraldinha, coxão mole, paleta, miolo da alcatra, bananinha e rabo.

As amostras com a deterioração “blown pack” apresentavam visível distensão da embalagem devido o acúmulo de gás, além de alterações físicas e sensoriais como coloração muitas vezes esverdeada, odor acre e sulfídrico, inconsistentes devido a grande atividade proteolítica e exsudação excessiva, características que tornam o produto inaceitável para o consumo. Já as amostras não deterioradas apresentavam o aspecto uniforme, sem manchas escuras ou claras, coloração variando do vermelho rosado ao vermelho pardo, ausência de limo na superfície, aparência marmórea e brilhante, consistência firme, compacta, elástica e ligeiramente úmida, odor suave, agradável e característico de carnes próprias para o consumo.

Contagem e identificação de membros da família *Enterobacteriaceae* e contagem de bactérias ácido lácticas (BAL)

Essas determinações foram realizadas segundo metodologias descritas no ICMSF (2000), a partir dos exsudatos colhidos do interior das embalagens. Utilizou-se o ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBA) e diluições do exsudato até 10^{-7} (APHA, 2001) para a quantificação de enterobactérias e o ágar para *Lactobacillus* Man, Rogosa & Sharpe (MRS) em dupla camada, para a contagem de bactérias ácido lácticas.

Para a realização das provas confirmatórias e de caracterização para enterobactérias isolaram-se dez colônias típicas, que foram submetidas a, no mínimo, duas passagens de purificação em VRBA. Após a incubação por 24 horas a 37°C as colônias puras foram repassadas para ágar nutriente inclinado e incubadas da mesma forma. Para a confirmação das culturas puras, realizaram-se esfregaços corados pelo método de Gram e a prova da oxidase (MacFADIN, 1976).

Foram consideradas como pertencentes à família *Enterobacteriaceae* as culturas que se apresentavam em forma de bacilos Gram-negativos, não esporulados e oxidase negativa. Essas foram posteriormente submetidas a uma bateria de provas bioquímicas para identificação dos principais gêneros, segundo estabelecido no “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (HOLT et al., 1994).

Pesquisa do *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*

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

Os tubos com BHI foram acondicionados em jarras de anaerobiose (Gas Pack™, BD), incubados por 10 dias sob temperatura de refrigeração (10°C). Após este período as amostras foram processadas para posterior extração do DNA. A extração do DNA genômico foi realizada segundo a metodologia proposta por Van Soolingem et al. (1991) com modificações.

O par de iniciadores utilizado para a detecção do *Clostridium estertheticum* foi delineado por Helps et al. (1999) e é composto pelos primers *forward* RFP (5'TGA TCG CAT GAT CTT AAC ATC AAA G-3') e *reverse* RRP (5'TCG ACC CCC GAC ACC TAG TAT T-3') que se encontram nas posições 173-197 e 813-792, respectivamente, da subunidade 16S do RNAr de *C. estertheticum* (nº acesso no GenBank® S46734). Esse par amplifica o fragmento de 641 pares de base (pb) do DNA do *Clostridium estertheticum*.

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

Foram utilizados os seguintes componentes para cada reação de PCR de 50 µL:

- Primers RFP/RRP: amplicon 641 pb, DNA (100ng), primers (0,3 mM), dNTP (0,2 mM), MgCl₂ (1,5 mM), Taq DNA polimerase (2 U), tampão 10X (tris-HCl pH 8,3) e KCl (500 mM);

- Primers 16SDBF/16SDBR: amplicon 935 pb, DNA (100ng), primers (0,5 mM), dNTP (0,2 mM), MgCl₂ (1,5 mM), Taq DNA polimerase (2,5 U) e tampão 10X (tris-HCl pH 8,3) e KCl (500 mM).

A reação de amplificação foi realizada em um aparelho termociclador Eppendorf® num total de 40 ciclos para RFP/RRP e 30 ciclos para 16SDBF/16SDBR.

As condições para amplificação do RFP/RRP foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C/5 minutos, desnaturação a 94°C/1 minuto, anelamento a 60°C/1 minuto, extensão a 72°C/1 minuto e extensão final a 72°C/10 minutos.

As condições para amplificação do 16SDBF/16SDBR foram as seguintes: desnaturação inicial a 93°C/3 minutos, desnaturação a 92°C/1 minuto, anelamento a 55°C/1 minuto, extensão por a 72°C/1 minuto e extensão final a 72°C/3 minutos.

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

Análise estatística

As variáveis número de enterobactérias e de bactérias ácido-láticas, foram analisadas pelo procedimento GLM (General Liner Model) do SAS utilizando um modelo matemático que inclui os efeitos dos tratamentos (amostras deterioradas e não deterioradas) e a interação entre eles. A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Já, o efeito dos tratamentos sobre as variáveis presença e ausência de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foi analisado pelo teste de Qui-quadrado.

Tabela 1 – Distribuição das amostras de carne com deterioração “blown pack” e não deterioradas, conforme a população de enterobactérias e bactérias ácido lácticas em UFC/mL de exsudato.

População (UFC/mL)	Tipo de amostra					
	Enterobactérias			Bactérias ácido lácticas		
	Deterioradas	Não deterioradas	Total	Deterioradas	Não deterioradas	Total
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
< 10 ⁵	6(22,22)	18(66,66)	24(44,45)	0(0,00)	13(48,15)	13(24,08)
10 ⁵ - 10 ⁷	12(44,45)	5(18,52)	17(31,48)	6(22,23)	6(22,23)	12(22,22)
> 10 ⁷	9(33,33)	4(14,82)	13(24,07)	21(77,77)	8(29,62)	29(53,70)
Total	27(100)	27(100)	54(100)	27(100)	27(100)	54(100)

Contagem de enterobactérias

No presente estudo, a contagem populacional de enterobactérias foi distribuída em três intervalos populacionais para carnes deterioradas e não deterioradas que pode ser visualizada na Tabela 1.

O estudo das populações de enterobactérias nas amostras com deterioração “blown pack” e sem deterioração revelou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Ou seja, a média de $1,7 \times 10^6$ UFC/mL para amostras deterioradas foi significativamente superior a de $5,5 \times 10^3$ UFC/mL encontrada nas amostras não deterioradas. Do total de 27 amostras deterioradas, 21 (77,77%) apresentaram populações de enterobactérias maiores que 10^6 UFC/mL no exsudato; dentre as não deterioradas, 18 (66,66%) apresentaram populações inferiores a 10^5 UFC/mL. Estes dados são concordantes com os obtidos por Borch et al. (1996), Riddell & Korkeala (1997) e Yost et al. (2002) quando avaliaram a microbiota de carnes embaladas a vácuo não alteradas.

Caracterização dos microrganismos da família Enterobacteriaceae

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

Já, o estudo de 270 colônias isoladas de amostras não deterioradas mostrou uma maior ocorrência dos seguintes microrganismos: *Hafnia alvei* (38,9%), seguido de *Edwardsiella ictaluri* (11,5%), *Serratia liquefaciens* (10,3%) e *Enterobacter* spp. (8,6%).

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

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

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

enterobactérias muito acima das amostras não deterioradas.

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

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

Contagem de bactérias ácido-láticas

A contagem populacional de BAL (bactérias ácido-láticas) foi distribuída em três intervalos populacionais para carnes deterioradas e não deterioradas que também pode ser visualizada na Tabela 1.

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

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

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

Hanna et al. (1979) comprovaram que *Lactobacillus* spp. heterofermentativos são capazes de produzir gás no interior da embalagem a vácuo quando estocados sob temperaturas de refrigeração (1 a 3°C)

por 3 semanas. Assim, a presença de *Lactobacillus* em populações elevadas nas carnes estudadas neste trabalho pode ter contribuição significativa no processo de deterioração “blown pack”.

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

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

Tsigarida & Nychas (2001) demonstraram que o tipo de filme utilizado nas embalagens influencia no

desenvolvimento de diferentes grupos microbianos, além de influenciar nos tipos de metabólitos produzidos e suas concentrações. Outros fatores como o pH dos diferentes grupos musculares, a contaminação bacteriana inicial e as variações de temperatura pelos quais o produto foi submetido durante todo o processamento devem ser considerados. Cada mudança será refletida nas diferentes taxas de deterioração (EGAN & SHAY, 1982) ou diferentes taxas de desenvolvimento de bactérias deteriorantes (TSIGARIDA et al., 2000).

Detecção do *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*

A Figura 1 mostra os produtos da amplificação do DNA do *Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes* nos cortes cárneos bovinos resfriados e embalados a vácuo, representados por amplicons de 641 pb e 935 pb, respectivamente.

Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 2 onde observa-se que do total de 54 amostras estudadas, foram obtidas 68,52% (37) de amostras positivas e 31,48% (17) negativas para o *C. estertheticum*. Estes dados confirmam a ampla distribuição do *C. estertheticum* em carnes embaladas a vácuo e mantidas sob refrigeração.

As amostras deterioradas apresentaram significativamente maior positividade para o *C. estertheticum* do que amostras não deterioradas ($p < 0,01$). Das 27 amostras estudadas com a deterioração “blown pack”, 23 (85,18%) foram positivas para o *C. estertheticum* enquanto que as não deterioradas foram 14 (51,85%) como mostra a Tabela 2. Este resultado coincide com o de Rauecker (2007), que encontrou o microrganismo em 85,18% das amostras deterioradas. No entanto, no mesmo trabalho, ao analisar carnes não deterioradas, esse autor encontrou *Clostridium estertheticum* em apenas 9,52% das amostras.

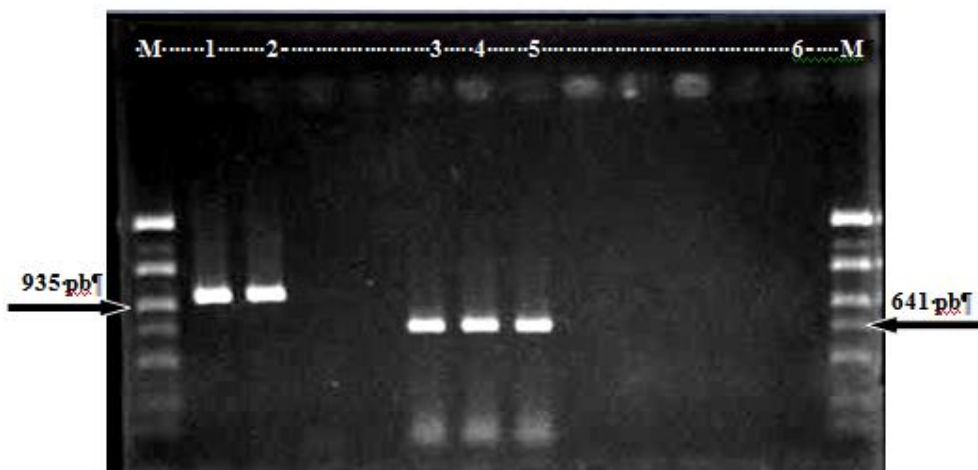


Figura 1 - Produtos de PCR obtidos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*. M: marcador molecular (DNA ladder 100 pb); 1: Controle positivo para *C. gasigenes* (DSM12272); 2: Amostra positiva para o *C. gasigenes*; 3: Controle positivo *C. estertheticum* (DSM 8809); 4, 5: Amostras positivas para *C. estertheticum*; 6: Controle negativo.

Tabela 2 – Número de amostras de carne com deterioração “blown pack” e não deterioradas com presença ou ausência de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*.

	Tipo de amostra					
	<i>Clostridium estertheticum</i>			<i>Clostridium gasigenes</i>		
	Deterioradas	Não deterioradas	Total	Deterioradas	Não deterioradas	Total
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
Presença	23(85,18%)	14(51,85)	37(68,52)	8(29,62)	2(7,40)	10(18,52)
Ausência	4(14,82)	13(48,15)	17(31,48)	19(70,38)	25(92,60)	44(81,48)
Total	27(100)	27(100)	54(100)	27(100)	27(100)	54(100)

Ainda que as amostras não deterioradas tenham apresentado significativamente um número menor de amostras positivas para o *C. estertheticum* em relação às amostras com deterioração “blown pack”, a presença do microrganismo em 51,85% das amostras não deterioradas pode ser um indicativo da ampla distribuição deste microrganismo e que apenas sua presença não é suficiente para causar a deterioração. É preciso que haja outros fatores que influenciem no desencadear e na evolução da deterioração como a permeabilidade da embalagem a gases como o oxigênio e o dióxido de carbono, discutidos anteriormente. Além desses, variações na temperatura de conservação, o uso de sanitizantes na lavagem das carcaças e a interação existente entre diferentes populações microbianas presentes na carne contaminada também podem ser considerados.

A prevalência do *Clostridium gasigenes* em todas as amostras estudadas foi baixa. Os resultados expostos na Tabela 2 mostram a relação total de amostras positivas (10/54 - 18,52%) e negativas (44/54 - 81,48%) para o *C. gasigenes*.

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

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

Helps et al. (1999) encontraram estes clostrídios no solo, tubo digestivo de animais e fezes. Broda et al. (2009) isolaram espécies de clostrídios causadores de

“blown pack” em piso de sala de refrigeração, no piso da sala de abate antes da remoção da pele e piso da sala de desossa. Rauecker (2007) os isolou de diversas fontes dentro da indústria frigorífica como roletes de esteiras, ralos, salas de desossa, câmaras-frias e outros, justificando o amplo número de amostras de carnes positivas. Tais dados mostram que o problema pode ser atribuído à contaminação fecal direta e/ou indireta e a falhas de higiene operacionais.

CONCLUSÕES

Os microrganismos da família *Enterobacteriaceae* e bactérias ácido-láticas estavam presentes em populações elevadas e em maior número nas carnes com deterioração “blown pack”. Dentre os gêneros da família *Enterobacteriaceae* encontrados predominaram *Hafnia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Edwardsiella*, destacando-se a presença da espécie *Hafnia alvei*. As amostras com deterioração “blown pack” apresentaram maior positividade para o *C. estertheticum* que amostras não deterioradas. Não houve diferença estatística de positividade para a presença do *C. gasigenes* entre amostras com deterioração “blown pack” e carnes não deterioradas. Concluiu-se que a principal forma de controle desta deterioração é a prevenção da contaminação da carne por material fecal.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington, 2001. 676p.

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

- BOEREMA, J. A.; BRODA, D. M.; BELL, R. G. Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.406-411, 2003.
- BOEREMA, J. A.; BRODA, D. M.; BELL, R. G. PCR of psychrotolerant clostridia associated with deep tissue spoilage of vacuum-packed chilled meats. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.446-450, 2002.
- BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M.L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**. v.33, p.103-120, 1996.
- BRENNER, D. J. Introduction to the family *Enterobacteriaceae*, in the Prokaryotes. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Ed.). **A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. 2ed. New York: Springer Verlag, 1992. p.2673-95.
- BRIGHTWELL, G.; CLEMENS, R.; URLICH, S.; BOEREMA, J. Possible involvement of psychrotolerant *Enterobacteriaceae* in blown pack spoilage of vacuum-packed raw meats. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, n.3, p.334-339, 2007.
- BRODA, D. M., BOEREMA, J. A.; BELL, R. G.; PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing "blown pack" spoilage of vacuum-packed chilled meats. **Journal of Food Microbiology**, v.94, p.515-522, 2003.
- BRODA, D. M.; BOEREMA, J. A.; BRIGHTWELL, G. Sources of psychrophilic and psychrotolerant clostridia causing spoilage of vacuum-packed chilled meats, as determined by PCR amplification procedure. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, n.1, p.178-186, 2009.
- BRODA, D. M.; MUSGRAVE, D. R.; BELL, R. G. Use of restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate strains of psychrophilic and psychrotrophic clostridia associated with "blown pack" spoilage of vacuum-packed meats. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n.1, p.107-116, 2000.
- BRODA, D. M. Prevalence of cold-tolerant clostridia associated with vacuum-packed beef and lamb stored at abusive and chill temperatures. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.40, p.93-98, 1997.
- DAINTY, R. H.; EDWARDS, R. A.; HIBBARD, C. M.; RAMANTANIS, S. V. Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packed beef. **Journal of Applied Bacteriology**, v.1, p.117-123, 1986.
- DAINTY, R. H.; EDWARDS, R. A.; HIBBARD C. M. Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* spp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.49, n.4, p. 473-486, 1989.
- EGAN, A. F.; SHAY, B. J. Significance of lactobacilli and film permeability in the spoilage of vacuum-packaged beef. **Journal of Food Science**, v.47, p.1119-1126, 1982.
- HANNA, M. O; SMITH, G. C.; HALL, L. C.; VANDERZANT, C. Role of *Hafnia alvei* and *Lactobacillus* species in the spoilage of vacuum-packaged striploin steaks. **Journal of Food Protection**, v.42, n.7, p.569-571, 1979.
- HELPS, C. R.; HARBOUR, D. A.; CORRY, J. E. PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef. **International Journal of Food Microbiology**, v.52, p.57-65, 1999.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9.ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.
- HOVE, H.; NORGAARD, H.; MORTENSEN, P. B. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. **European Journal of Clinical Nutrition**, n.53, p.339-350, 1999.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración**. 2ed. Zaragoza: Editorial Acirbia, 2000. p.147-150.
- JONES, D. T.; WOODS, D. R. Acetone-butanol fermentation revisited. **Microbiological Reviews**, v.50, p. 484-524, 1986.
- LINDBERG, A. M.; LJUNGH, Å. S.; AHRNE, LOFDAHL, S.; MOLIN, G. *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurized milk or cream and the presence of toxin encoding genes. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.11-17, 1998.
- MacFADIN, J. F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. Baltimore: The Willians & Wilkins Company, 1976. 312p.
- MOSCHONAS, G.; BOLTON, D. G.; SHERIDAN, J.; McDOWELL, D. A. Isolation and sources of "blown pack" spoilage clostridia in beef abattoirs. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, n.2, p.616-624, 2009.
- RAUECKER, U. N. *Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes* em carne resfriada, carcaças, equipamentos e ambiente de matadouros-frigoríficos de diferentes estados brasileiros. 2007.

81f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

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

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

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

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

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

YANG, X.; BALAMURUGAN, S.; GILL, C. O. Substrate utilization by *Clostridium stertheticum* cultivated in meat juice medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, n.3, p.501-505, 2009.

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