UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ISOLAMENTO DE CLOSTRÍDIOS PSICROFÍLICOS E PSICROTRÓFICOS ASSOCIADOS À DETERIORAÇÃO DE CARNES REFRIGERADAS EMBALADAS A VÁCUO.

Autor: Cláudia Peixoto Bueno

Orientador: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

GOIÂNIA
2009

sistema de bibliotecas ufg

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[ ] Dissertação** **[x] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Cláudia Peixoto Bueno				
E-mail:	vetcpb@gmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? [x] Sim [ ] Não					
Vínculo empregatício do autor					
Agência de fomento:				Sigla:	
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Caracterização molecular e isolamento de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos associados à deterioração de carnes refrigeradas embaladas a vácuo.				
Palavras-chave:	Bacteriologia, carne, contaminação, embalagem a vácuo, PCR, tipagem, tufamento.				
Título em outra língua:	Molecular characterization and isolation of psychrophilic and psychrotrophic clostridia associated with the spoilage of vacuum packed refrigerated meat.				
Palavras-chave em outra língua:	blown pack, meat, vacuum packed, contamination, PCR, typing, bacteriology.				
Área de concentração:	Higiene e tecnologia de alimentos				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	20/02/2009				
Programa de Pós-Graduação:	Ciência Animal				
Orientador (a):	Albenones José de Mesquita				
E-mail:	mesquita@vet.ufg.br				
Co-orientador (a):	Cristiano Sales Prado				
E-mail:	pradocs@vet.ufg.br				

3. Informações de acesso ao documento:
Liberação para disponibilização?[1] [x] total [ ] parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:
[ ] Capítulos. Especifique: _____

[ ] Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.
O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Cláudia Peixoto Bueno
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 20 / 08 / 2010

[1] Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

CLÁUDIA PEIXOTO BUENO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ISOLAMENTO DE CLOSTRÍDIOS PSICROFÍLICOS E PSICROTRÓFICOS ASSOCIADOS À DETERIORAÇÃO DE CARNES REFRIGERADAS EMBALADAS A VÁCUO.

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:
Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientador:
Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Cristiano Sales Prado
Profa. Dr. Iolanda Aparecida Nunes

Goiânia
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Bueno, Cláudia Peixoto.
B928c Caracterização molecular e isolamentode clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos associados à deterioração de carnes refrigeradas embaladas a vácuo [manuscrito] / Cláudia Peixoto Bueno. - 2009.
90f.

Orientador: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Ciência Animal, 2009.
Bibliografia.

1. Clostrídios 2. Carnes - Refrigeração. 3. Carne – Qualidade I.Título

CDU: 637.5.037

CLÁUDIA PEIXOTO BUENO

Tese defendida e aprovada em **20/02/2009** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Albenones José de Mesquita
(ORIENTADOR (A))

Dr. José Gabriel Amoril - MAPA/LANAGRO/GO

Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus - ICB/UFG

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

Dedico

À minha família e ao meu orientador e amigo prof. Albenones,

Se não fosse por vocês,
Meu céu cairia.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor e mentores superiores... pelo dom da vida, pela família, pelas maravilhosas oportunidades a mim oferecidas.

A minha amada família, por existirem, pela total dedicação, por tudo que sou e tenho.

Ao meu orientador Professor Albenones, pela confiança, apoio, amizade, paciência, enfim, pela grandiosa contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal. À Sua Família – Sandra e Adriano – grandes amigos, pessoas iluminadas e partícipes das atividades de pesquisa.

Ao Professor Nonato pela confiança e ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores do CPA - professor Edmar, Cristiano, Moacir, Cíntia, Nonato e Iolanda - pela grande ajuda na minha formação profissional, pela amizade, confiança e valiosos ensinamentos. Devo-lhes muito respeito e gratidão.

A toda equipe do CPA, local de trabalho intenso e grande profissionalismo, mas acima de tudo mantém um ambiente acolhedor, onde tive o prazer e a sorte de poder compartilhar momentos especiais de aprendizado com pessoas extremamente competentes e amigas. Agradecimentos especiais a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia de Alimentos. Aos colegas Eurione, Mara, Renata, Úrsula, Uesdras, Gisele, Ariane, Rosângela Nunes e Natália pela dedicação, apoio e companhia durante vários dias, noites e madrugadas de trabalho.

Ás minhas amigas Adriana Campos e Gabriela Borges pelo apoio e compreensão quando eu dizia: “...só depois do doutorado!”

Aos funcionários Wilson, Lis, Neuza e Euza, meu agradecimento por todo carinho e empenho.

A UFG, Escola de Veterinária e toda equipe da Pós-Graduação da Escola de Veterinária, pela minha formação profissional. Agradecimentos especiais aos professores, pelos ensinamentos, paciência e dedicação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo financiamento e oportunidade de executar parte do trabalho na Nova Zelândia.

Aos Professores da Escola de Veterinária pela convivência e reciprocidade, em especial Prof. Guido Fontgalland Coelho Linhares, Prof. Luiz Augusto Brito, Profa. Maria Clorinda Fioravanti, Profa. Maria Auxiliadora Andrade, Prof. Francisco.

À toda equipe do Ruakura AgResearch pela parceria, ensinamentos, paciência, amizade, acolhimento...momentos maravilhosos e inesquecíveis! Em especial às amigas Jackie Boerema, Dorota Broda, Shelley Urlich e Robyn Clements.

À banca de qualificação pelas valiosas sugestões.

Ao querido amigo Dr. Gabriel Amoril pela força.

Ao Prof. Luiz Artur M. Bataus pelos valiosos ensinamentos.

Aos Meus Colegas de Curso Válter Ferreira, Alberto França, Cleusely Matias, Robert Taylor, Andréia Vítor, Priscila, Marcele, Rolando Mazzoni, e Karine Brum pelo apoio, pela prazer da convivência, pelas horas de estudo e brincadeiras.

À Professora Cíntia Minafra e pós-graduanda “Camilinha” Melo, amigas iluminadas, queridas, meus “anjinhos da guarda”.

À amiga e pós-graduanda do IPTSP Juliana Lamaro e sua orientadora Profa. Maria Lúcia pela preciosa ajuda e ensinamentos.

À Super Frango pela compreensão durante minha ausência e por todo apoio a mim dedicado. Em especial aos amigos Alexandre Goiáz, Ivana Andrade e toda equipe do Serviço de Inspeção Federal.

Aos frigoríficos Minerva, Bertin, Marfrig pela parceria, em especial ao JBS pela doação da câmara de anaerobiose.

A todos que tornaram possível eu chegar até aqui.

OBRIGADA.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 1
REFERÊNCIAS 14

CAPÍTULO 2 – DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Clostridium estertheticum estertheticum e Clostridium estertheticum* like EM CARNES REFRIGERADAS EMBALADAS A VÁCUO 20
RESUMO..... 20
ABSTRACT..... 21
1. INTRODUÇÃO..... 20
2. MATERIAL E MÉTODOS..... 25
Local..... 25
Amostragem..... 25
Colheita de amostras pelo matadouro frigorífico..... 26
Técnica de PCR..... 27
Extração do DNA genômico..... 27
Eletroforese em gel de agarose para avaliação da qualidade e quantificação do DNA genômico..... 27
Primers utilizados nas reações e condições de amplificação..... 28
Bacteriologia Convencional..... 29
Meios de cultura..... 30
Protocolo empregado no laboratório e cultivo de microrganismos..... 30
Isolamento e identificação..... 31
Análise Estatística 33
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 34
4 - CONCLUSÕES..... 47
5 – REFERÊNCIAS..... 48

CAPÍTULO 3 – Emprego das técnicas de RFLP–PCR e AFLP na diferenciação de espécies de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos associados à deterioração de carnes refrigeradas embaladas a vácuo 51
RESUMO..... 51
ABSTRACT..... 52
1.INTRODUÇÃO..... 53
2. MATERIAL E MÉTODOS..... 58
Local..... 58
Amostragem e identificação..... 59
Técnica de RFLP – PCR 62
Técnica de AFLP..... 64
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 67
4 - CONCLUSÕES..... 83
5 – REFERÊNCIAS..... 84

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 89

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ISOLAMENTO DE CLOSTRÍDIOS PSICROFÍLICOS E PSICROTRÓFICOS ASSOCIADOS À DETERIORAÇÃO DE CARNES REFRIGERADAS EMBALADAS A VÁCUO.

RESUMO: A deterioração de carnes refrigeradas embaladas a vácuo acompanhada de grande produção de gás - fenômeno denominado tufamento de embalagens - é considerada uma das principais causas de perdas econômicas da indústria cárnea, em várias regiões do Brasil e do mundo. Diversos microrganismos psicrofílicos e psicrotróficos podem estar envolvidos, destacando-se espécies do gênero *Clostridium.* Objetivou-se com o presente estudo a caracterização molecular, por meio do emprego da técnica de PCR e o isolamento pela bacteriologia convencional, dos principais microrganismos causadores do tufamento de embalagens de carnes refrigeradas procedentes do Brasil, Nova Zelândia e Reino Unido. Para tanto, foram empregadas técnicas de tipagem visando a diferenciação das espécies e subespécies envolvidas neste tipo de deterioração. Foram analisadas 36 amostras tufadas de carnes brasileiras, 6 amostras tufadas oriundas do Reino Unido e 12 amostras experimentais tufadas de carne de cervo provenientes da Ilha Norte da Nova Zelândia. Foram utilizados três pares de *primers,* o RFP/RRP, o 16SEF/16SER e o par EISRF/EISRR para *C. estertheticum estertheticum* e *Clostridium estertheticum* like e um para C. *gasigenes* (16DBF/16DBR). As amostras com os resultados positivos ao PCR foram enviadas para a microbiologia convencional para isolamento do *Clostridium estertheticum.* Concluiu-se *que o Clostridium estertheticum estertheticum* é responsável pela deterioração das carnes e, consequentemente, pelo tufamento das embalagens no Reino Unido. As amostras tufadas de embalagens de carnes brasileiras têm como principal agente causador o *Clostridium estertheticum* like. A tipagem foi relizada em cepas e isolados – doados pelo Mirinz Centre/ Ruakura AgResearch/ Hamilton/NZ - juntamente a dois isolados brasileiros, envolvidos nesse tipo de deterioração . As técnicas eleitas AFLP e RFLP – PCR foram capazes de distinguir as espécies e subespécies de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos, porém, o AFLP apresentou maior poder discriminatório, sendo capaz de diferenciar 100% das espécies – *C. estertheticum, C. frigoris, C. bowmani, C. lacusfryxellense e C psychrophylum* - e também as subespécies - *Clostridium estertheticum estertheticum, Clostridium estertheticum laramiense,* o *Clostridium estertheticum* like K21 e *Clostridium estertheticum* like K24. Por meio da técnica de RFLP foi possível diferenciar as espécies do clostrídio psicrofílicos e psicrotróficos e também as subespécies *C. estertheticum estertheticum* e *Clostridium estertheticum* like, utilizando em conjunto as quatro endonucleases de restrição – *AluI, CfoI, TaqI e HaeIII*. A *HaeIII* proporciona maior variedade de fragmentos e capacidade de diferenciar as espécies de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos. Já a *TaqI* foi a única enzima capaz de diferenciar as subespécies *C. estertheticum estertheticum* e *C. estertheticum laramiense* do *C. estertheticum* like. As amostras brasileiras isoladas se enquadraram no grupo do *Clostridium estertheticum* like.

Palavras-chave: bacteriologia, carne, contaminação bacteriana, PCR, tipagem, tufamento de embalagem, vácuo.

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND ISOLATION OF PSYCHROPHILIC AND PSYCHROTROPHIC CLOSTRIDIA ASSOCIATED WITH THE DETERIORATION OF VACUUM PACKED REFRIGERATED MEAT.

ABSTRACT: The deterioration of vacuum packed refrigerated meat accompanied by large gas production - a phenomenon called “blown pack” - is considered a major cause of economic losses of the meat industry in several regions of Brazil and the world. Several psychrophilic and psychrotrophic microorganisms may be involved, especially species of *Clostridium*. The objective of the present study was to perform the molecular characterization, through the use of the PCR technique, and the molecular isolation by conventional bacteriology, of the main microorganisms that cause blown pack in refrigerated meat from Brazil, New Zealand and the United Kingdom. Thus, typing techniques were used to differentiate the species and subspecies involved in this type of deterioration. Tirty-six samples of Brazilian “blown pack” meat, 6 samples from the UK and 12 experimental “blown pack” samples of venison from the North Island of New Zealand were analyzed. Three pairs of primers, the RFP / RRP, the 16SEF/16SER and the pair EISRF / EISRR were used for *C. estertheticum estertheticum* and *Clostridium estertheticum* like, and one for C*. gasigenes* (16DBF/16DBR). The samples with the PCR results were sent to a microbiology laboratory for conventional isolation of *Clostridium estertheticum*. It was concluded that *Clostridium estertheticum estertheticum* is responsible for the deterioration of meat and hence the “blown pack” in the UK. Samples of “blown pack” Brazilian meat have *Clostridium estertheticum* like as primary causal agent. The typing was carried out in isolates and strains - donated by Mirinz Center / Ruakura Agresearch / Hamilton / New Zealand - together with two isolates from Brazil, involved in this type of deterioration. The selected techniques AFLP and RFLP - PCR were able to distinguish species and subspecies of psychrophilic and psychrotrophic clostridia. However, the AFLP showed the highest discriminatory power, being able to distinguish 100% of the species - *C. estertheticum*, *C. frigoris*, *C. bowmani*, *C. lacusfryxellense* and *C. psychrophylum* - and also the subspecies – *C. estertheticum estertheticum*, *C. estertheticum laramiense*, *C. estertheticum* like k21 and k24. Through the technique of RFLP, it was possible to differentiate the species of clostridia psychrotrophic, psichrophilic and also the subspecies *C. estertheticum estertheticum* and *Clostridium estertheticum* like, along with the use of four restriction endonucleases - *AluI, CfoI, TaqI* and *HaeIII*. The *HaeIII* provided greater variety of fragments and the ability to differentiate the species of clostridia psychrophilic and psychrotrophic, whereas *TaqI* was the only enzyme capable of differentiating the subspecies of *C. estertheticum estertheticum* and *C. estertheticum laramiense* of C*. estertheticum* like. The Brazilian samples isolated fit into the group of *Clostridium estertheticum* like, although there is no confirmation of the absence of *Clostridium estertheticum estertheticum* in the country.

Keywords: bacterial contamination, bacteriology, blown pack, meat, PCR, typing, vacuum

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A carne bovina constitui fonte básica de 15 a 20% de proteína animal na alimentação humana, sendo considerada de boa qualidade por conter todos os aminoácidos essenciais. É a maior fonte de ferro e vitamina B12 entre os alimentos. Aporta entre 10 e 20% de gordura, sendo a maior parte saturada. Possui escassa quantidade de carboidratos e o conteúdo de água oscila entre 50 e 80%, além de contém vitaminas do grupo B, zinco e fósforo (GÓMEZ, 2000).

Há relatos que consideram o nível de consumo de carnes como "elemento indicativo do desenvolvimento sócio-econômico de um povo" (PARDI et al., 2001 e ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, 2008). Devido a essa relevância, o Brasil tem se esforçado para produzir carne com qualidade para o mundo todo. Nesse sentido, cresce a cada dia no ambiente industrial, a conscientização de que a qualidade está diretamente relacionada e é estimulada pela tradição da pecuária brasileira e pelos diferenciais da carne nacional, que conciliam sanidade, competitividade e valor nutricional (ZEN et al., 2008).

Nos últimos cinco anos, o Brasil tem se destacado no comércio internacional de carnes, com índices de desempenho expressivos nas exportações. Segundo a ABIEC (2008) - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne - a segurança e o controle de qualidade dos alimentos estão alicerçados nas exigências do mercado internacional, e os sistemas de gestão da qualidade da cadeia produtiva apontam para cuidados com matérias-primas, produtos e subprodutos.

O Brasil vem se consolidando como o maior exportador de carne do mundo, comercializando para mais de 150 países. Em decorrência disso, o segmento da produção de carne bovina é hoje um dos maiores geradores de renda de nosso país. Somente a parte da cadeia produtiva que compreende a criação de bovinos – 207 milhões de animais sendo 22 milhões de cabeças abatidas em 2008 - até o produto final na prateleira – 1.022.882.95 toneladas de produtos *in natura* exportados em 2008 - responde pelo emprego de milhões de brasileiros (ABIEC, 2008a; IBGE, 2009).

Ainda de acordo com a ABIEC (2008c) no acumulado do ano (janeiro a outubro) o Brasil exportou pouco mais de 1,89 milhões de toneladas de

equivalente carcaça de carne bovina. Em relação ao mesmo período do ano passado houve um aumento de 26% em receita, com retração de 13% em volume. As exportações de carne *in natura* caíram 15% em quantidade, com expansão de 21% em receita. Já para a carne industrializada houve aumento em valor e volume: 59% e 8%, respectivamente. O maior comprador de carne bovina *in natura* do Brasil tem sido a Rússia, com 38% de participação, seguido pela Venezuela (9%), Irã (7%), Hong Kong (5%), Egito (5%), Argélia (4%) e Israel (4%). Outros países, com pouca representatividade individual, ficaram com os 28% restantes.

Estudo sobre o desempenho da indústria brasileira revela que o setor passa por um processo de profissionalização no qual, pequenas empresas regionais, ou seja, os matadouros-frigoríficos tornaram-se grandes grupos que internacionalizaram suas operações por meio de abertura de capital e da adoção de práticas de governança corporativa (ABIEC, 2008).

Tanto nas exportações como no mercado interno, os investimentos e a manutenção dos procedimentos que envolvem a cadeia produtiva da carne brasileira, associados a uma busca contínua por melhorias nas características e padrões do produto, tiveram grande importância para a qualidade da carne oferecida ao consumidor final, para o desenvolvimento e o reconhecimento do produto "*Brazilian Beef*" (ABIEC- APEX, 2008b; VERÍSSIMO, 2007).

Apesar de todo avanço e tecnificação das indústrias brasileiras, do empenho dos órgãos de fiscalização e da implementação dos Manuais de Qualidade e Programas de Auto-Controle (BRASIL, 2005), ainda podem ser observados gargalos operacionais e organizacionais, que podem comprometer a qualidade do produto final (BRASIL, 2007).

Nesse sentido, os cuidados higiênicos-sanitários observados antes e durante o abate, o processamento e demais etapas de industrialização são fundamentais para a segurança microbiológica do produto (MCEVOY et al., 2000). A multiplicação de microrganismos nas carnes, durante a estocagem, resulta do tipo de contaminação inicial do processamento e da influência de fatores físico-químicos durante a estocagem (LABADIE,1999; BLIXT & BORCH, 2002). Segundo LABADIE (1999), o processamento influencia não só a quantidade de microrganismos/cm², mas também o tipo de microrganismos presentes. Após a remoção da pele, as carcaças geralmente carregam entre 10^2 e 10^4 bactérias/cm².

Existem algumas áreas das carcaças que são mais propícias a certos tipos de contaminação (Figura 1), em decorrência da localização e manipulação (BELL et al., 1997). Por essa razão, os microrganismos não são uniformemente distribuídos pela superfície das carcaças (NAS, 1985).

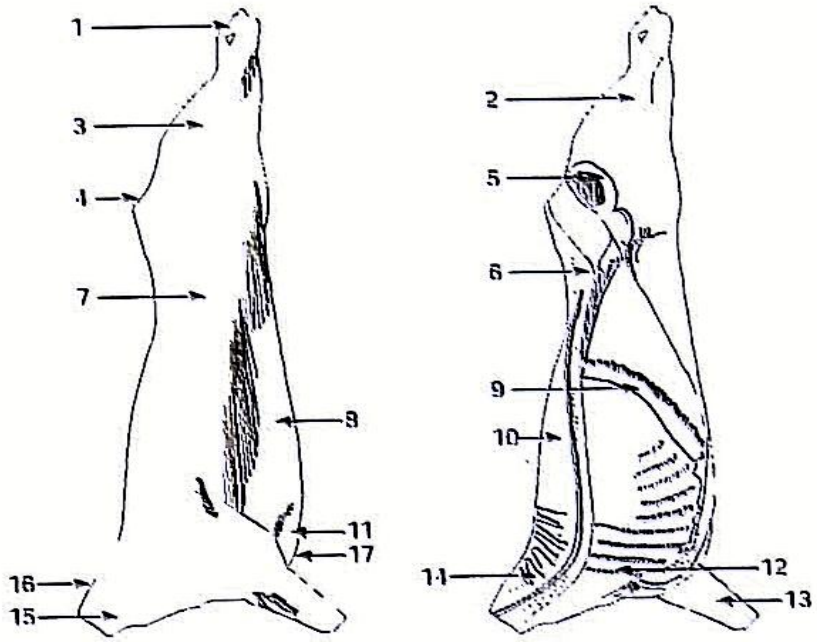

FIGURA 1 – Principais pontos de contaminação em carcaças durante o processamento: 1) tendão; 2) músculo do traseiro - medial; 3 e 4) coxão completo; 5 e 6) base óssea – ísquio, púbis e fêmur; 6) vazio – aba de filé; 7) ponta de agulha; 8) região ventral e peito; 9) diafragma; 10) contra filé; 11) peito; 12) costela; 13) músculo do dianteiro; 14) coluna vertebral; 15 e 16) pescoço;17) peito.
Fonte: BEll et al. (1997)

Um dos fatores determinantes para a preservação da qualidade da carne é conhecer os microrganismos que encontram neste meio, um ambiente propício para proliferação, haja vista a íntima relação entre tais microrganismos e os processos de deterioração, infecção, intoxicação e toxinfecção alimentar (LABADIE, 1999).

A carga microbiana inicial exerce um efeito marcante no tempo de armazenamento da carne fresca e de produtos processados. Portanto, é indispensável para manter as propriedades qualitativas ótimas da carne e para

prolongar sua vida útil, reduzir ao mínimo a contaminação durante as fases de manipulação, processamento, embalagem e armazenamento (ROÇA, 2004).

Os microrganismos responsáveis pela contaminação da carne são provenientes da pele, fezes e conteúdos intestinais, mãos e instrumentos dos funcionários. Várias espécies são específicas para carnes, ou seja, elas são isoladas apenas de carnes, matadouros-frigoríficos ou de instalações e equipamentos necessários ao processamento (DAINTY & MACKEY, 1992). Segundo GILL (1986), em geral, a vida de estocagem das carnes depende amplamente da quantidade de bactérias no início do armazenamento.

A rapidez de decomposição das carcaças depende do número de microrganismos psicrófilos e psicrotróficos, do aumento da temperatura e da atividade de água (a_w) superficial. O número de bactérias na superfície da carne fresca é de 10^2 -10^5 UFC/cm², mas só 10% são capazes de iniciar o seu desenvolvimento. Durante a fase inicial (lag), os microrganismos adaptam-se às novas condições de temperatura, refrigeração e dessecação superficial. Depois dos microrganismos terem adaptado o seu metabolismo, inicia-se a fase de crescimento logarítmico (log). A decomposição pode resultar no aparecimento de maus odores ou na formação de colônias visíveis e limo. Quando os níveis microbianos são de 10^7 UFC/cm², surgem os odores desagradáveis. O limo bacteriano aparece numa fase mais avançada da decomposição, quando o número de células bacterianas é superior a 10^8 UFC/cm² e a_w é de 0,99 (GARCIA-LÓPEZ et al., 1998).

Os microrganismos predominantemente associados à deterioração da carne bovina refrigerada embalada a vácuo são: *Brochothrix thermosphacta, Pseudomonas* spp., algumas espécies dos gêneros *Lactobacilus* e *Leuconostoc*, bactérias ácido-láticas, gêneros da família *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas* spp. e espécies psicrofílicas e psicrotróficas de *Clostridium.* Esses microrganismos podem multiplicar na carne em alto número e torná-la imprópria ao consumo humano (KALCHAYANAND et al., 1989; DAVIES, 1992; LYHS, 2002; HOLLEY & GILL, 2005 e ERCOLINI et al., 2006).

BRODA et al. (1994) relataram que alguns episódios comerciais de deterioração da carne *in natura* foram freqüentemente causados por microrganismos associados a temperaturas abusivas e embalagens danificadas. Três espécies da família *Enterobacteriaceae* foram citadas como exemplo, a

Serratia liquefaciens, Enterobacter aerogenes e Hafnia alvei, que foram isoladas em números significativos, confirmadas como produtoras de gás e possíveis causadoras do fenômeno denominado “Blown Packs”, ou seja, “tufamento de embalagens”, ilustrado pela Figura 2, que se caracteriza pela deterioração da carne com grande distensão da embalagem pela produção de gases (BRODA et al., 1996).

FIGURA 2 – Embalagens tufadas de cortes cárneos de contra-filé refrigerado embalados a vácuo.
Fonte: Acervo pessoal

Posteriormente, BRODA et al. (1997) constataram o aumento na frequência de casos de tufamento de embalagens a vácuo em produtos refrigerados e mantidos em temperaturas na faixa de -1,5 a 2,0ºC, sem relato de abuso de temperatura e embalagens danificadas. Esses autores sugeriram então a participação de microrganismos anaeróbios estritos e/ou facultativos, psicrofílicos ou psicrotróficos, que poderiam representar um perigo para a indústria de processamento de carnes.

Os relatos de tufamento de embalagens tiveram início em 1988, quando um grupo de cientistas da Universidade de *Wyoming*, em *Laramie,* EUA, constataram que uma espécie de *Clostridium* psicrofílico, mais tarde denominado *Clostridium laramie*, era o responsável por esse tipo de deterioração, em larga escala, de carnes refrigeradas embaladas a vácuo nos Estados Unidos da

América. A deterioração por este microrganismo foi descrita pelos autores em função do acúmulo de grande quantidade de gás – incluindo H_2S - e exsudato na embalagem, odor desagradável, perda da textura e da coloração natural da carne (RAY et al., 1991; KALCHAYANAND et al., 1993).

Ao realizarem análises microbiológicas em amostras de produtos contidos em embalagens tufadas, utilizando métodos oficiais, BRODA et al. (1994) encontraram uma microbiota pertencente ao gênero *Lactobacillus*. Porém, ao realizar as análises dos gases contidos nas embalagens, utilizando cromatografia líquida, revelaram a presença de ácido butírico decorrente da fermentação de açúcares, característica exclusiva do gênero *Clostridium.*

À época eram raras as informações científicas sobre o tema, o que permitiu várias suposições sobre o assunto, como por exemplo, a existência de uma espécie de *Lactobacillus* capaz de causar a deterioração das carnes e grande produção de gás, ou a ocorrência de nova espécie de microrganismo causador da deterioração em um matadouro-frigorífico após a passagem de um tornado (KALCHAYANAND et al., 1991).

RAY et al. (1991) constataram que se tratava de um problema de proporção epidêmica, pelo aparecimento do problema em outras regiões dos Estados Unidos da América, e que alcançou estas dimensões pelas mudanças ocorridas no processo produtivo da carne e nos procedimentos dos matadouros-frigoríficos. Entre tais mudanças, destaca-se o aumento dos prazos de validade de cortes cárneos refrigerados embalados a vácuo, pois foram encontrados produtos refrigerados destinados à exportação com quatro ou até seis meses de validade. Relataram, então, com convicção que a nova espécie de *Clostridium* psicrofílico já estava presente no ambiente e somente encontrou meios propícios para sua proliferação.

DAINTY & EDWARDS (1989) relataram outro caso de tufamento com o envolvimento de clostrídios psicrofílicos em Langfort no Reino Unido, em diversos carregamentos de carnes refrigeradas embaladas a vácuo, importadas da África do Sul. Inicialmente, segundo os referidos autores, foram realizadas inspeções nos portos, nos quais as embalagens apresentavam condições normais após período de três semanas em trânsito, em excelentes condições de temperatura - cerca de 0°C . Logo após, decorridas duas a três semanas de estocagem, com temperatura variando de -1° a -2°C, um percentual de embalagens começou a se

distender (“tufar”). Com o passar do tempo, o número de embalagens tufadas aumentou substancialmente.

Posteriormente, a bactéria isolada foi denominada *C. estertheticum* (COLLINS et al., 1992). Desde então, deteriorações semelhantes foram relatadas em carnes frescas bovinas, ovinas e de cervo, embaladas a vácuo na Nova Zelândia (BRODA et al., 1997). Várias amostras suspeitas de deterioração por *C. estertheticum* foram examinadas em Langford, mas somente em uma ocasião foi possível isolar o microrganismo de amostras importadas novamente da África do Sul. A confirmação foi realizada por meio da técnica de PCR – Reação em cadeia pela Polimerase - para o *Clostridium estertheticum*, utilizando como alvo uma seqüência da subunidade 16 S do DNA ribossomal.

Análises realizadas em carne bovina embalada a vácuo, originada da América do Norte, revelaram a presença do *C. estertheticum* (HELPS et al., 1999). Segundo os autores, durante o inverno de 1996-1997, vários episódios de deterioração ocorreram em carnes refrigeradas embaladas a vácuo. Essas carnes eram de animais criados e processados no norte da Europa onde foi constatada extrema dificuldade para o isolamento da bactéria. Para elucidar a origem do problema, foi utilizada a técnica de PCR, sendo a resposta obtida geralmente em um período de 24 – 48 horas. De acordo com os autores, esta técnica tem apresentado benefícios no monitoramento da eficiência dos procedimentos de controle adotados visando reduzir a ocorrência desta bactéria na carne.

Várias espécies de *Clostridium* foram isoladas do solo, lama, esgoto, sedimentos aquáticos, batata, leite e de embalagens de carne *in natura* tufadas nos Estados Unidos e Reino Unido, onde foram identificadas duas espécies: o *C. estertheticum* e o *C. laramie*. O *Clostridium estertheticum* produz grandes quantidades de dióxido de carbono e hidrogênio, junto a uma significativa quantidade de butanol, gás butírico, ácido acético e ésteres butíricos (BRODA et al., 1994). De forma similar, o *C. laramie*, segundo os mesmos autores, é responsável pelo tufamento de várias embalagens a vácuo e produz os mesmos tipos de gases. Esses microrganismos podem proliferar e produzir gás em temperaturas de refrigeração, e ambas as espécies revelam ser de crescimento fastidioso à microbiologia convencional.

Alguns episódios relacionados a casos de deterioração profunda em carne bovina refrigerada embalada a vácuo, sem sinais de abuso de temperatura

foram relatados por BRODA et al. (1996). Já DE LACY et al. (1998) citaram semelhantes episódios sob condições de abuso de temperatura. Enquanto, BOEREMA et al. (2002) constataram que duas espécies de clostridios psicrotróficos, *C. algidicarnis* e *C. putrefaciens,* foram responsáveis pelo processo de deterioração profunda, os quais foram isolados de carne bovina refrigerada embalada a vácuo, deteriorada e com odor pútrido. Esses microrganismos são contaminantes endógenos, encontrados normalmente na musculatura profunda, nas proximidades de ossos e cartilagens de bovinos e ovinos e geralmente ausentes na superfície dos cortes cárneos.

BRODA et al. (2000) relataram tufamento de embalagens causado por *C. gasigenes* em carne refrigerada de carneiro embalada a vácuo na Nova Zelândia. Os autores observaram produção de pequenas bolhas no interior da embalagem após 14 dias de estocagem a temperatura de 2°C. Comparado ao *C. estertheticum,* o *C. gasigenes* apresenta pequena produção de gás com odor bastante desagradável. Ambos estão presentes no solo e no trato gastrintestinal de bovinos, equinos e ovinos, e foram identificados em amostras de fezes, solo de estabelecimentos de abate, *swabs* de ambiente de sala de desossa e câmara-fria.

A cepa de *Clostridium gasigenes* isolada e identificada por BRODA et al. (2003) foi depositada na Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares – DSMZ (*Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,* Braunschweig, Alemanha). Para sua detecção molecular, foi desenvolvido um par de *primers*, que tem como alvo uma seqüência da subunidade 16S do RNA ribossômico.

SPRING et al. (2003) em um estudo taxonômico citaram a nova classificação do *C. laramiense* como *C. estertheticum* subsp. *laramiense,* sugerida pela Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares – DSMZ (*Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,* Braunschweig, Alemanha). Este microrganismo foi isolado na região do Lago Fryxell na Antártica e foi classificado como psicrofílico. Outras novas espécies de *Clostridium* foram também isoladas nessa região, como o *C. frigoris, C. lacusfryxellense, C. bowmanii* e o *C. psychrophilum*. Esses microrganismos, segundo os refridos autores, são psicrofílicos e pertencem ao mesmo grupo do *C. estertheticum*.

POND et al. (2006) identificaram o *C. gasigenes* como microrganismo predominante da microbiota intestinal de trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss,*

introduzidas no Brasil em 1913, oriundas da Inglaterra, indicando a possibilidade da presença do microrganismo na água (MAGALHÃES et al., 2002).

Segundo BRODA et al. (2002), os clostrídios psicrofílicos, *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, foram identificados como os agentes causadores do tufamento de embalagens a vácuo em carnes refrigeradas, durante estocagem em temperaturas entre -1,5°C e 2,0°C. Para esses autores, o controle deste tipo de deterioração em matadouros-frigoríficos tem sido impossibilitado pelas dificuldades do isolamento e da identificação do agente causador. Mas, não são todos os clostrídios psicrofílicos obtidos da carne que estão envolvidos neste processo de deterioração.

Ainda, segundo esses pesquisadores os métodos microbiológicos clássicos para detecção de *Clostridium* spp. psicrofílicos e psicrotróficos associados a este tipo de deterioração – tufamento de embalagens – demonstram certo grau de dificuldade, pois exigem muito trabalho, persistência, tempo para execução dos múltiplos passos para isolamento, seguido pela confirmação da habilidade do microrganismo em produzir gases.

A inexistência de um meio de cultura específico e/ou um sistema comercial para a identificação dos microrganismos torna o trabalho mais complexo (BRODA et al., 1998). Esses microrganismos são tradicionalmente diferenciados e identificados por suas características fenotípicas, as quais são de difícil interpretação para clostrídios (HOLDEMAN et al., 1977; BRODA et al., 1998).

Outro fator que interfere no isolamento do microrganismo é o efeito antagônico provocado pelas bactérias ácido-láticas, que possuem a capacidade de inibir o crescimento de espécies de clostrídios, por produção de bacteriocinas no meio sólido, similar ao que ocorre naturalmente na carne durante a estocagem em baixas temperaturas (CRANDALL & MONTVILLE, 1993; BRODA et al., 1996). Elas produzem também ácidos orgânicos a partir da fermentação de carboidratos, reduzindo o pH e tornando o meio desfavorável ao crescimento de outros microrganismos. Os principais gêneros relacionados com a deterioração de carnes bovinas frescas refrigeradas embaladas a vácuo são *Carnobacteria*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (JONES, 2004).

Além disso, os clostrídios são extremamente sensíveis à presença de alguns gases quando a fonte de carbono se torna limitada, consequentemente

seu restabelecimento torna-se seriamente prejudicado pelo efeito tóxico do butanol produzido por ele mesmo durante o metabolismo (BRODA et al., 1996).

Embora estes microrganismos sejam frequentemente incapazes de proliferar em temperaturas acima de 22ºC, seus esporos sobrevivem às mais diversas condições, incluindo temperaturas elevadas. A forma esporulada do *Clostridium* é capaz de resistir ao aquecimento a 80°C por 10 minutos. A porta de entrada dos esporos no matadouro-frigorífico podem ser partículas do solo, impregnadas na pele e fezes dos animais (BRODA et al., 1998; BRODA et al. 2002).

Episódios de tufamento de embalagens estão diretamente relacionados a reformas estruturais dos matadouros, onde há grande formação e disseminação de poeira e aerosóis. Há que considerar também aqueles já residentes no local, encontrados em ambiente propício para seu desenvolvimento como roletes e ranhuras das esteiras, defeitos e ranhuras em paredes e pisos, defeitos de soldas, estruturas velhas e sem acabamento, ou seja, qualquer estrutura de difícil higienização.

A dificuldade de isolar esses microrganismos envolvidos no processo de deterioração fez com que alguns pesquisadores desenvolvessem procedimentos moleculares práticos, específicos e rápidos (HELPS et al., 1999; BRODA et al., 2003).

Nesse sentido, a reação em cadeia da polimerase – PCR - permitiu uma seletiva amplificação *in vitro* de uma região particular do DNA, imitando o fenômeno da replicação do DNA *in vivo* (ZAHA et al., 1996). Esse processo constitui a melhor ferramenta para a detecção e identificação do microrganismo causador do tufamento de embalagens nas indústrias brasileiras, devido a sua alta sensibilidade e especificidade.

Não existem dados conclusivos acerca das perdas econômicas causadas pelo tufamento de embalagens, mas é inquestionável a sua importância para a cadeia produtiva nacional e internacional. Não se trata de um episódio recente no Brasil, pois há alguns anos já existia. A falta de relatos deve-se a não divulgação dos incidentes pelas indústrias - que tratavam o caso como segredo industrial - com receio do impacto comercial negativo provocado pelos aspectos repugnantes evidenciados no produto tufado.

As pesquisas sobre os microrganismos causadores do tufamento em carnes brasileiras tiveram início em 2003, após relatos de grandes perdas econômicas por matadouros-frigoríficos brasileiros. Houve um aumento exorbitante de episódios de tufamento, em diversos estabelecimentos e em diferentes estados brasileiros, alcançando níveis alarmantes. Essas indústrias se aliaram a uma equipe de pesquisadores goianos da Universidade Federal de Goiás – UFG - no intuito de conhecer e, consequentemente, controlar o agente causador do problema. A partir daí, levantaram-se suspeitas de contaminação por *C. estertheticum e C. gasigenes.*

Vários procedimentos de utilização da técnica de PCR e de tipagem têm sido descritos na literatura. No entanto, foi necessário adaptar alguns protocolos publicados em trabalhos científicos - alguns deles utilizados para outras espécies de microrganismos – na busca de uma solução para o problema vivenciado pelo Brasil.

A técnica de PCR foi padronizada de acordo com os protocolos desenvolvidos por HELPS et al. (1999) e BRODA et al. (2003). Esses procedimentos moleculares para detecção de clostrídios forneceram resultados eficientes, práticos, específicos e rápidos.

RAUECKER (2007) analisando amostras colhidas em matadouros-frigoríficos de diversos estados brasileiros, por meio de análise molecular - PCR - evidenciou a presença e disseminação de *C. estertheticum* em todas as fontes de contaminação pesquisadas. A elevada frequência do microrganismo em fezes e ambiente de sala de matança indicou essas fontes como potenciais de contaminação, além de outros com conteúdo gastrintestinal, pele e pêlos. Resultados semelhantes foram relatados por BRODA et al. (2002) e BOEREMA et al. (2003).

A alta positividade encontrada nas análises indica um elevado grau de contaminação e ampla disseminação do microrganismo em matadouros-frigoríficos brasileiros. Para *C. estertheticum*, o estado com maior índice de positividade, considerando a amostragem analisada, foi Mato Grosso do Sul com 10/16 (62,50%), seguido pelo estado do Pará, 06/12 (50%); Minas Gerais, 18/37 (48,65%); Goiás, 28/59 (47,46%); São Paulo, 29/85 (31,12%); Mato Grosso, 10/35 (28,57%). Nos estados do Acre e Bahia, 02/05 (40%) foram positivas para *C. estertheticum* (RAUECKER, 2007).

Nota-se que *C. estertheticum* encontra-se amplamente distribuído nos diferentes estabelecimentos de abate brasileiros. Independente do porte da planta, a disseminação do microrganismo ocorre de forma semelhante em função das falhas operacionais e de higienização inadequada.

As carcaças contaminadas dão origem a meias-carcaças e cortes contaminados, responsáveis por grande contaminação ambiental, destacando-se as câmaras-frias e salas de desossa. Os percentuais de positividade obtidos em amostras de câmaras-frias podem atingir 40% em algumas situações, devido ao elevado grau de contaminação de meias-carcaças após sua refrigeração, 53,84%. À medida que o produto é submetido à manipulação e entra em contato com superfícies contaminadas, a positividade cresce progressivamente. Na sala de desossa, os pontos de maior contaminação são as esteiras (35%) e ralos (33,33%). As esteiras têm contato direto com o produto, sendo um dos principais responsáveis pela contaminação de origem ambiental na sala de desossa (RAUECKER, 2007).

A alta positividade verificada em amostras de ralos da sala de dessosa e câmara-fria indica que esses locais, provavelmente, tornaram-se nichos ecológicos de *C. estertheticum* após uma contaminação inicial proveniente das meias-carcaças ou contaminações de diversas áreas.

Em relação ao *C. gasigenes,* RAUECKER (2007) relatou que apesar do número reduzido de amostras positivas, sua distribuição nos pontos de contaminação é semelhante à do *C. estertheticum.* Para a autora, como os dois microrganismos dividem o mesmo habitat, a disseminação de ambos está associada às mesmas falhas operacionais ocorridas na esfola, oclusão do reto, evisceração, além da limpeza e desinfecção inadequadas do ambiente. Enfocando a distribuição geográfica das amostras, o estado com maior freqüência de positividade foi Mato Grosso do Sul, com 04/16 (25%), seguido por Mato Grosso, 07/35 (20%), Goiás, 06/59 (10,17%) e São Paulo, 05/85 (5,88%). Das 37 amostras de Minas Gerais, apenas duas foram positivas (5,41%). Nos outros estados (Acre e Bahia), não foram identificadas amostras positivas para *C. gasigenes,* nas amostras analisadas.

Uma vez detectados alguns clostrídios psicrofílicos por meio do emprego da técnica de PCR, bem como apontadas as principais fontes de contaminação nos estabelecimentos de abate brasileiros, surgiu a necessidade de

avançar na busca de novos conhecimentos sobre esses agentes. Nesse sentido, objetivou-se com o presente estudo realizar a caracterização molecular e o isolamento de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos associados ao tufamento de embalagens de carnes refrigeradas embaladas a vácuo, bem como, diferenciar espécies e subespécies desses clostrídios por meio do emprego das técnicas de *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimerase Chain Reaction* (RFLP - PCR).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC, O Brasil vende carne com sustentabilidade e mantém a liderança mundial - Brazil Export, 2008. Disponível em: http://www.abiec.com.br. Acesso em: 03 nov. 2008.

2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE – ABIEC , Conselho Nacional da pecuária de corte - balanço da pecuária bovídea de corte, 2008. 2008a Disponível em: http://www.abiec.com.br/estatisticas/14.pdf. Acesso em: 27 jan. 2009.

3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE – ABIEC em parceria com a Agência de Promoção de Exportações e Investimentos - APEX, Marketing - O Brasil vende carne com sustentabilidade e mantém a liderança mundial - Brazil Export, 2008b. Disponível em: http://www.abiec.com.br. Acesso em: 03 nov. 2008.

4. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE – ABIEC. Síntese das exportações brasileiras de carne bovina em 2008 - Agrolink, 2008c. Disponível em: http://www.abiec.com.br. Acesso em: 29 jan. 2009.

5. BELL, R. G.; PENNEY, N.; MOORHEAD, S. M. Comparison of aerobical methods for the monitoring of chilled packaged meat during storage. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 265-268, 1997.

6. BLIXT, Y.; BORCH, E. Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef. **Meat Science**, v. 60, p. 371-378, 2002.

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

8. 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.

9. BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portal do MAPA. **Histórico da Cadeia Produtiva de Carne bovina** [oline] 2007. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/. Acesso em: 29 jan. 2008.

10. BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Cordenação Geral de Programas Especiais. Circular n° 175 de 16 de maio de 2005. **Procedimentos de verificação dos programas de auto-controle**. Brasília.

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

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

13. BRODA, D., M., SAUL, D., M., LAWSON, P., A., BELL, R., G., MUSGRAVE, D., R. *Clostridium gasigenes* sp. nov*.,* a psychrophile causing spoilage in vacuum-packed meat. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.107-118, 2000.

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

15. BRODA, D., M., DELACY, 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.

16. BRODA, D., M., DE LACEY, K., M., BELL, R., G., BRAGGINS, T., J., COOK, R., L. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with “Blown pack” spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. **International Journal of Food Microbiology***, v.*29, p.335-352, 1996.

17. BRODA, D., M., DE LACY, K., M., COOK, R., L., BELL, R., G. The microbiology of Blown Packs. **Fresh Meat,** Twenty-Eighth Meat Industry Research Conference, p. 467-471, 1994.

18. CRANDALL, A., D.; MONTVILLE, T., J. Inhibition of *Clostridium botulinum* growth and toxigenesis in a model gravy system by coinoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection,** v.56, n.06, p.485-488, 1993.

19. COLLINS, M., D., RODRIGUES, U., M., DAINTY, R.,H., EDWARDS, R., A., ROBERTS,T., A. Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: Description of *Clostridium estertheticum* sp. Nov. **FEMS Microbiological Letters**, v.96, p.235-240, 1992.

20. DAINTY, R.H.; MACKEY, B.M. The relationship between phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **Journal of Applied Bacteriology**, Symposium supplement, v.73, p. 103s-114s, 1992.

21. DAINTY, R.H.; EDWARDS, R.A. Spoilage of vacuum packed beef by a *Clostridium* sp. **Journal of Science Food Agriculture**, v.49,p. 473 – 486, 1989.

22. DAVIES, A. **Meat microbiology.** In: Introduction to Meat Product Manufacture, Leatherhead Food Research Association, UK. 1992. 121 p.

23. DE LACY, K. M., BRODA, D. M., BELL, R. G. In vitro assessment of psychrotrophic *Clostridium* spp. As possible causative agents of bone-taint in beef. **Food microbiology,** v 47, p. 583-589, 1998.

24. ERCOLINI, D., RUSSO, F., TORRIERI, E., MASI, P., VILLANI, F. Changes in spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packagin conditions. **Applied and Enviromental Microbiology,** v.72, n.07, p.4663-4671, 2006.

25. GARCIA-LOPEZ, M. L; PRIETO, M; OTERO, A. The physiological attributes of Gram-negative bactéria associated with spoilage of meat and meat products. In: **The microbiology of meat and poultry.** Londres: Ed. A. Davies and R. Board. . p. 1-34,1998.

26. GILL, C. O . The control of microbial spoilage in fresh meats. **Advances in Meat Research**, v.2, p. 50-88, 1986.

27. GÓMEZ, J.D. **La carne y sus derivados**. Unidad de Nutrición Clínica y Dietética – Hospital Universitário La paz Madrid. Data de publicación: Ago 2000. Disponível em: www.saludalia.com/Saludalia/vivisano/doc/nutricion/carne,htm. Acesso em 16/06/2004.

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

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

30. HOLDEMAN, L. V., CATO, E. P., MOORE, W. E .C. **Anaerobe Laboratory Manual**, 4th edição, Blacsburg, Va: Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.

31. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, Produção Animal – Brasil 3º Trimestre de 2008 [online]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_200803comentarios.pdf. Acesso em: 29 jan. 2009.

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

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

34. KALCHAYANAND, N., RAY, B., FIELD, R. A. Characteristics of *Clostridium laramie*, a new psychrotrophic specie, associeted with spoilage of vaccum-packaged refrigerated fresh meat. **American Society of Animal Science – Western Section**, v. 42, p. 26 – 29, 1991.

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

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

37. LYHS U. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finlândia.

38. MAGALHÃES, A. L. B; ANDRADE, R. F.; RATTON, T. F.; BRITO, M. F. G. Ocorrência da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* no alto do rio Aiuruóca e tributários, bacia do Rio Grande, Minas Gerais, Brasil. **Bol. Mus. Biol. Melo Leitão**, v. 14, p. 33-40, 2002.

39. MCEVOY, J. M.; DOHERTY, A. M.; FINNERTY, M.; SHERIDAN, J.J.; MCGUIRE, L.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D. A.; HARRINGTON, D. The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 390-395, 2000.

40. NAS. An evaluation of the role of microbiological criteria for foods and foods ingredients. **The Nacional Academy of Sciences** [online], p. 184-307, 1985. Disponível em: www.nap.edu/openbook/html/194.html. Acesso em: 10 set. 2004.

41. PARDI, M. C; SANTOS, I. F; SOUZA, E. R; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da carne**. Goiânia: CEGRAF-UFG/ Niterói: EDUFF, 2001. v. II.1145p.

42. POND, M., J., STONE, D., M., ALDERMAN, D., J. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.261, p.194-203, 2006.

43. RAY, B., KALCHAYANAND, N., FIELD, R. A. Isolation of a *Clostridium* spp from spoiled vaccum-packaged refrigerated beef and its susceptibility to bacteriocin from *Pediocococcus acidilactici*. **Journal Industrial Microbiology,** Univesity of Wyoming, Laramie, USA, 1991.

44. RAUECKER, U. N., *Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes* em carne bovina refrigerada, equipamentos e ambiente de matadouros-frigoríficos de diferentes estados brasileiros 2007. 81p. Dissertação (Mestrado Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Brasil.

45. ROÇA, R.O., **Microbiologia da Carne**. UNESP, Campus de Botucatu. 2004. Disponível em: http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/tecarne.htm#s5. Acesso em 20 de julho de 2004.

46. SPRING, S., MERKHOFFER, B., WEISS, N., KROPPENSTEDT, R. M., HIPPE, H., STACKEBRANDT, E. Characterization of novel psychrophilic clostridia from Antartic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov., and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. **International journal of systematic and Evolutionary Microbiology,** v.53, p.1019-1029, 2003.

47. VERÍSSIMO, A.; Panorama da carne brasileira no mercado mundial e o marketing internacional. **Biológico**, v. 69, p.35-37, 2007.

48. ZAHA, A. (Cord.), SCHRANK, A., FERREIRA, H. B., SCHRANK, I. S., RODRIGUES, J. J. S., REGNER, L. P., PASSAGLIA, L. M., ROSSETTI, M. L. R., RAUPP, R. M., SILVA, S. C., GAIESKY, V. L. V, Biologia Molecular Básica. Porto Alegre:EdMercado Aberto, 1996, 336p.

49. ZEN, S., MENEZES, S. M., CARVALHO, T. B., Perspectiva do consumo de carne no Brasil. In: XLVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2008, Rio Branco. **Anais eletrônicos...**[online]. Rio Branco: SOBER, 2008. p. 1-13. Disponível em: http://www.sober.org.br/palestra/9/560.pdf. Acesso em: jan. 2008.

CAPÍTULO 2 – DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Clostridium esterheticum estertheticum* e *Clostridium estertheticum* like EM CARNES REFRIGERADAS EMBALADAS A VÁCUO

RESUMO: A deterioração de carnes refrigeradas embaladas a vácuo é uma das principais causas de perdas econômicas da indústria cárnea em várias regiões do Brasil e do mundo. Diversos microrganismos podem estar envolvidos, destacando-se espécies do gênero *Clostridium,* principalmente uma espécie psicrofílica denominada *C. estertheticum,* responsável pelo fenômeno "tufamento de embalagens". Objetivou-se com o presente estudo a identificação, por meio do emprego da técnica de PCR e o isolamento por meio de bacteriologia convencional, dos principais microrganismos associados ao tufamento de embalagens de carnes refrigeradas do Brasil, Nova Zelândia e Reino Unido. Foram utilizados três pares de *primers,* o RFP/RRP, o 16 SEF/16SER e o par EISRF/EISRR para *C. estertheticum estertheticum* e *Clostridium estertheticum* like e um para C. *gasigenes* (16DBF/16DBR). Dos cortes cárneos com embalagens tufadas, 17/22 (77,28%) foram positivos e 5/22 (22,73%) negativos para o *C. estertheticum* quando se empregou o *primer* RFP / RRP. Quando o par 16SEF/ 16SER foi utilizado, 15/22 (68,2%) amostras foram positivas e 7/22 (31,8%) negativas para o *C. estertheticum*. Os *primers* EISRF/EISRR e 16SDBF/ 16SDBR, não proporcionaram resultados positivos para o *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, respectivamente. As amostras com os resultados positivos ao PCR foram enviadas para a bacteriologia convencional para o isolamento do *Clostridium estertheticum.* Os episódios de tufamento de embalagens de carnes brasileiras refrigeradas embaladas a vácuo, tem como principal agente causador o *Clostridium estertheticum* like. O *Clostridium estertheticum estertheticum* é o principal responsável pela deterioração das carnes e, consequentemente, pelo tufamento das embalagens no Reino Unido. Os clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos são os microrganismos anaeróbios deteriorantes mais associados aos processos de tufamento de embalagens a vácuo e alteração das carnes refrigeradas, não importando a espécie animal.

Palavras chave: anaerobiose, carne, deterioração, microbiologia, PCR, tufamento

CHAPTER 2 - MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Clostridium estertheticum estertheticum* and *C. estertheticum* like ASSOCIATED WITH THE DETERIORATION OF VACUUM PACKED REFRIGERATED MEAT.

ABSTRACT: The deterioration of vacuum packed refrigerated meat accompanied by large gas production - a phenomenon called “blown pack” - is considered a major cause of economic losses of the meat industry in several regions of Brazil and the world. Several microorganisms may be involved, especially species of *Clostridium* psychrophilic and psychrotrophic. The objective of the present study was to carry out the molecular characterization, through the use of the PCR technique, and isolation, by conventional bacteriology, of the main microorganisms that cause blown pack in refrigerated meat from Brazil, New Zealand and the United Kingdom. Three pairs of primers, the RFP / RRP, the 16SEF/16SER and the pair EISRF / EISRR were used for *C. estertheticum estertheticum* and *Clostridium estertheticum* like and one for C*. gasigenes* (16DBF/16DBR). From the meat cuts with “blown packs”, 17/22 (77.275%) were positive and 5/22 (22.725%) were negative for *C. estertheticum* when the primer RFP / RRP was used. When the pair 16SEF and 16SER was used, 15/22 (68.2%) samples were positive and 7/22 (31,8%) negative for *C. estertheticum*. The primers EISRF / EISRR and 16SDBF / 16SDBR did not provide positive results for *C. estertheticum* and *C. gasigenes*, respectively. The samples with the PCR results were sent to a microbiology laboratory for conventional isolation of *Clostridium estertheticum*. Samples of “blown pack” Brazilian meat had *Clostridium estertheticum* like as primary causal agent. The *Clostridium estertheticum estertheticum* is responsible for the deterioration of meat and hence the “blown pack” in the UK. The clostridia psychrophilic and psychrotrophic were the most important spoilage anaerobic microorganisms involved in “blown pack” in meat.

Keywords: anaerobiosis, blown pack, meat, microbiology, PCR, spoilage

INTRODUÇÃO

A qualidade da carne bovina é fator relevante quando se analisa a segurança alimentar da população mundial. No intuito de promover a carne brasileira no exterior, foi criada a marca "*Brazilian Beef*", um trabalho de marketing para que a carne brasileira, especialmente *in natura*, seja percebida como um produto natural, benéfico e saudável. Tudo isso para que o país fortaleça a posição de primeiro lugar no "*ranking"* dos países exportadores de carne (ABIEC, 2008).

Para atender às exigências do mercado internacional, o país também fez grandes investimentos em programas de qualidade, visando maior controle e segurança da cadeia produtiva de carnes. Além disso, o Brasil possui grandes indústrias, que permitem abates em excelentes condições higiênico-sanitárias, habilitadas internacionalmente para exportação (PRADO, 2005).

Apesar de todo o investimento e cuidado por parte do governo e das indústrias, o Brasil enfrenta alguns entraves de ordem sanitária, sendo a ocorrência de tufamento de embalagens a vácuo de carne refrigerada um dos mais frequentes e preocupantes. Não existem dados conclusivos acerca das perdas econômicas causadas por este tipo de deterioração, mas é inquestionável a sua importância para a cadeia produtiva nacional e internacional. Os prejuízos causados por este tipo de deterioração, além de econômico, são também de credibilidade e confiança devido à depreciação da marca "*Brazilian Beef*".

Conhecer os microrganismos responsáveis pela deterioração da carne e que encontram nela um ambiente propício para a sua proliferação, constitui um dos fatores determinantes para a preservação de sua qualidade (LABADIE, 1999).

Segundo BRODA et al. (2000) o fenômeno "tufamento de embalagens" tem acontecido frequentemente em carnes refrigeradas embaladas a vácuo. Este tipo de deterioração é caracterizado pela grande produção de gás, induzindo a distensão da embalagem, além da presença de odor desagradável, após 4-6 semanas de estocagem a temperaturas de -1,5°C a 4°C.

Os microrganismos predominantemente associados à deterioração da carne bovina refrigerada embalada a vácuo são: *Brochothrix thermosphacta, Pseudomonas* spp., algumas espécies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, bactérias ácido-láticas, gêneros da família *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas* spp. e espécies

psicrofílicas e psicrotróficas de *Clostridium.* Estes microrganismos podem multiplicar na carne em elevado número e torná-la imprópria ao consumo humano (KALCHAYANAND et al., 1989; DAVIES, 1992; LYHS, 2002; JONES, 2004; HOLLEY & GILL, 2005; ERCOLINI et al., 2006). Tempos atrás, não havia a suspeita da participação de *Clostridium* spp. na deterioração de carnes refrigeradas. Acreditava-se que a maioria das espécies introduzidas durante o abate e processamento de carnes bovinas era incapaz de se desenvolver em temperaturas de refrigeração (GILL, 2000).

COLLINS et al. (1992) realizaram um estudo taxonômico sobre *Clostridium* psicrofílicos envolvidos em casos de deterioração e chegaram à classificação de uma nova espécie, o *C. estertheticum* sp..

KALCHAYANAND et al. (1993) conseguiram isolar as primeiras culturas do *Clostridium* psicrofílico, responsável pelo tufamento de embalagens. O microrganismo foi isolado a partir do cultivo de esporos de embalagens tufadas. Os autores utilizaram culturas puras para estudar as características do microrganismo e diferenciá-las de outras espécies de clostrídios encontrados na carne. As características bioquímicas, a temperatura e o pH de crescimento, a esporulação, a germinação e a destruição, também foram estudados pelos autores.

Duas espécies psicrofílicas, *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*, foram identificadas como os verdadeiros agentes causadores do tufamento de embalagens (BRODA et al., 2003). Esses autores relataram a dificuldade em isolar culturas puras dos microrganismos envolvidos neste processo de deterioração. Os métodos microbiológicos clássicos para detecção de *Clostridium* spp. psicrofílicos e psicrotolerantes associados a este tipo de deterioração são complexos, envolvem muito trabalho, persistência e tempo. Além disso, a identificação do microrganismo pelas características fenotípicas é de difícil interpretação (HOLDEMAN et al., 1977; BRODA et al., 1998).

Pode-se afirmar que métodos moleculares para detecção de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos oferecem alternativas rápidas e eficientes no diagnóstico do tufamento de embalagens, sem a necessidade de isolamento do microrganismo. Atualmente, existem poucos trabalhos na literatura mundial que abordam o diagnóstico molecular de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* (HELPS et al., 1999; BRODA et al. 2003 e RAUECKER et al., 2007).

Para a detecção do *C. estertheticum* DSM 8809 e o *C. estertheticum* like, cepas denominadas K21 e K24, foi proposto o par de *primers* 16SEF e 16SER. Um par de *primers* adicional, EISRF e EISRR, foi desenhado para diferenciar as duas espécies. Estes *primers* são complementares ao *Internal Transcribed Spacer Fragment* – ITS das subunidades 16S-23S do DNA ribossômico presente no *C. estetheticum* DSM 8809 e ausente no *C. estertheticum* like (BRODA et al., 2003).

Diante da relevância do tema, objetivou-se com o presente estudo detectar por meio do emprego da técnica de PCR e isolar por meio da bacteriologia convencional, os principais microrganismos anaeróbios psicrofílicos e psicrotróficos associados ao tufamento de embalagens de carnes refrigeradas do Brasil, Nova Zelândia e do Reino Unido.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

Uma parte do experimento foi conduzida no Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da UFG, de outubro de 2004 a novembro de 2008. As análises laboratoriais de isolamento bacteriano e de biologia molecular foram conduzidas nos laboratórios de microbiologia - seção de anaeróbios – e biologia molecular.

Outra parte do experimento foi realizada no laboratório de microbiologia (seção de anaeróbios) e biologia molecular do *Mirinz Centre – Ruakura AgReserch* / *Hamilton* – Nova Zelândia, durante o período de janeiro a julho de 2006.

Amostragem

Foram analisadas 36 amostras tufadas de carnes bovinas refrigeradas embaladas a vácuo, de diversas regiões do Brasil (Figura 1). Além de 6 amostras de carne de carneiro refrigeradas, com embalagem tufada, oriundas do Reino Unido e 12 amostras tufadas de carne de cervo (Figura 2), provenientes da Ilha Norte da Nova Zelândia.

FIGURA 1 - Amostra de carne bovina tufada de origem brasileira
Fonte: Acervo pessoal

FIGURA 2- Amostra de carne de cervo tufada originária da Nova Zelândia
Fonte: Acervo pessoal

As 36 amostras brasileiras procederam de estabelecimentos de abate habilitados para comércio internacional – Lista Especial, localizados nos estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Dessas 36 amostras, 22 foram encaminhadas pelas indústrias ao laboratório de Biologia Molecular e seção de cultivo de anaeróbios do Centro de Pesquisas em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (CPA/EV/UFG) com a finalidade de identificar o agente causador da deterioração. Todas as amostras apresentavam sinais de deterioração com presença de gás e mais de 60 dias de validade.

As outras 14 amostras brasileiras também foram encaminhadas pelas indústrias ao Centro de Pesquisas em Alimentos e delas foram retiradas alíquotas do exsudato das quais foram obtidos peletes de esporos que foram encaminhados para o Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia - seção de cultivo de anaeróbios - do *MIRINZ Centre – RUAKURA AgResearch, Hamilton*/NZ.

As 6 amostras de carne de carneiro do Reino Unido - amostras de exsudato - foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia - seção de cultivo de anaeróbios - do *MIRINZ Centre – RUAKURA AgResearch, Hamilton*/N*Z*. Segundo o relatório enviado pelos pesquisadores ingleses, essas amostras também apresentavam sinais de deterioração com presença de gás e mais de 60 dias de validade.

As 12 amostras de carne de cervo procedentes da Nova Zelândia não apresentavam, em princípio, indícios de deterioração, tendo sido encaminhadas pela indústria ao laboratório, para realização de teste experimental de inoculação do microrganismo e monitoramento das fases de tufamento. Mas, vale ressaltar que essas amostras foram analisadas após o aparecimento de sinais de deterioração e tufamento das embalagens.

Colheita de amostras pelo matadouro-frigorífico no Brasil

Os cortes cárneos embalados a vácuo foram identificados e encaminhados ao Centro de Pesquisa em Alimentos – CPA/EV/UFG - em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, observando-se a integridade física das embalagens e a manutenção de baixas temperaturas dos cortes.

Técnica de PCR

Todas as amostras avaliadas foram submetidas inicialmente ao diagnóstico molecular. Para isso, retiraram-se 3 mL de exsudato, com auxílio de pipeta esterilizada e descartável, em câmara de anaerobiose - Forma Anaerobic System, Modelo - 1025/1029 - apresentando atmosfera de 10% de H_2, 5% de CO_2 e 85% de N_2 e temperatura ambiente de 10°C na Nova Zelândia e 18°C no Brasil.

Extração do DNA genômico

As amostras foram imediatamente acondicionadas em *Eppendorf* com capacidade de 1,5 mL e centrifugadas a 10.000 rpm/15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 200 μL de tampão TE e lisosima (10μg/mL), e incubado a 37°C por uma hora. A extração foi realizada utilizando-se o *kit High Pure PCR Template* (Roche).

Eletroforese em gel de agarose para avaliação da qualidade e quantificação do DNA genômico

Objetivando a avaliação da integridade e a determinação da concentração do DNA, 2 μL da solução de DNA obtido de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, a 90 volts (V), durante 40 minutos. O gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,6 μg/mL) na Nova Zelândia e, no Brasil foi utilizado o corante intercalante de ácidos nucléicos: o Gel Red Nucleic Acid Stain® (10mg/mL). A visualização do gel foi efetuada com o auxílio do fotodocumentador Gel Doc XR Bio Rad®, utilizando o programa operacional Quantity One.

Primers utilizados nas reações e condições de amplificação

Foram utilizados três pares de *primers* para a detecção de *C. estertheticum*. Um par foi proposto por Helps et al. (1999), composto pelos

primers forward RFP (5’ TGATCGCATGATCTTAACATCAAAG 3’) e *reverse* RRP (5’ CGACCCCCGACACCTAGTATT 3’), que se encontram nas posições 173-197 e 813-792, respectivamente, da subunidade 16S do RNAr de *C. estertheticum*, nº de acesso no GenBank S46734 (GENBANK, 2007). Deste par, obtém-se um produto de amplificação de 641 pares de base (pb).

O par desenhado por BRODA et al. (2003) para a detecção do *C.estertheticum* DSM 8809 e *C. estertheticum* like K21, composto pelos pares 16SEF (5’ TCGGAATTTCACTTTGAG 3’) e 16SER (5’ AAGGACTTCACTCATCTCTG 3’), que se encontram localizados nas posições 207-223 e 996-977, respectivamente, da subunidade 16S do rDNA de *C. estertheticum,* nº de acesso S46734 (GENBANK, 2007). Este par fornece um produto de amplificação de 790 pb.

O terceiro par empregado neste trabalho, EISRF e EISRR, também foi desenhado por BRODA et al. (2003), com o objetivo de diferenciar o *C. estertheticum* DSM 8809 do *C. estertheticum* like K21. Esse par amplifica um fragmento de 230 pb, composto pela sequência EISRF (5’GTA GAT GTA TTG ACT TCG G 3’) e EISRR (5’ ACC TAT AAC CAC TCT CGT 3’), que são complemetares à subunidade do 16S-23S rDNA do fragmento “*internal transcribed spacer*” presente na sequência de DNA do *C. estertheticum* DSM 8809, porém ausente no C. *estertheticum* like.

Para detecção de *C. gasigenes,* empregou-se o par proposto por BRODA et al. (2003), composto pelos *primers* 16SDBF *(*5’ AGA GGA GTT CTT CGG AAC GA 3’) e 16SDBR (5’ AAG CSA CTT CCC CAA TTA C 3’). Estes primers encontram-se localizados nas posições 61-81 e 995-977, respectivamente, na seqüência de referência do microrganismo (nº de acesso AF092548 e AF143692; GENBANK, 2007), amplificando fragmentos de 935 pb.

Foram utilizados os protocolos originais, propostos por HELPS et al. (1999) e BRODA et al. (2003), referente às soluções que compuseram as misturas das reações e das condições do PCR para cada par de *primer.*

Nas reações com os *primers* RFP e RRP (HELPS et al., 1999), as amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 95ºC/5 min, seguindo-se 40 ciclos de desnaturação a 94ºC/1 min, anelamento a 60ºC/1 min e extensão a 72ºC/1 min, extensão final a 72ºC/10 min.

Nas reações com os pares 16SEF/16SER, EISRF/EISRR e 16DBF/16DBR, as amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 93ºC/3 min, seguindo-se 30 ciclos que compreendem desnaturação a 92ºC/1 min, anelamento a 55ºC/1 min e extensão a 72ºC/2min, com extensão final de 72ºC/3min segundo proposto por BRODA et al. (2003).

Após as amplificações, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, com alinhamento inicial de 90 v/10 min e corrida 110 v/45 min, sendo o marcador de padrão de peso molecular utilizado de 100 pb DNA *Ladder* (Invitrogen®). Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,6 μg/mL), na Nova Zelândia e, no Brasil o Gel Red Nucleic Acid Stain® (10mg/mL). A visualização foi realizada com o auxílio do fotodocumentador Gel Doc XR Bio Rad®, utilizando o programa operacional Quantity One.

Bacteriologia Convencional

Somente as amostras positivas aos *primers* 16SEF/16SER (BRODA et al., 2003) e RFP / RRP (HELPS et al., 1999) – ambos para detecção do *Clostridium estertheticum*, foram submetidas às análises bacteriológicas.

Meios de Cultura

O meio de cultura utilizado no enriquecimento foi o caldo pré-reduzido PYGS – Peptone Yeast Extract Glucose Starch (LUND et al., 1990) - que contém, em sua composição, indicador de anaerobiose. Esse caldo foi repicado em atmosfera ideal para crescimento do microrganismo, ou seja, $N_2/H_2/CO_2$ na proporção 85:10:5, respectivamente. No plaqueamento, utilizou-se o Columbia Blood Agar (CBA, Oxoid) contendo 5% de sangue de carneiro.

Protocolo empregado no laboratório de cultivo de microrganismos

Foram seguidos os protocolos descritos por HOLDEMAN et al. (1977), BRODA et. al. (1996) e BRODA et al. (1998).

Uma vez no laboratório de microbiologia - seção de cultivo de anaeróbios - as embalagens a vácuo e frascos contendo no mínimo 10 mL de exsudato foram higienizados com etanol 70°IMPM e transportados intactos para o interior do compartimento de recebimento de materiais da câmara de anaerobiose e, quando necessário, eram envoltos em outra embalagem plástica. Toda a manipulação das amostras, o enriquecimento e o plaqueamento foram realizados sob condições de anaerobiose, apresentando 10% de $H_{2,}$ 5% de CO_2 e 85% de $N_{2,}$ mistura ideal para o crescimento do *C. estertheticum*. Antes da utilização da câmara, foram rigorosamente realizadas as renovações dos ciclos dos gases seguindo as orientações do fabricante.

Paralelamente, visando o enriquecimento, foi retirado com o auxílio de pipeta Pasteur, 1,5 mL do exsudato e transferido para um tubo de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura PYGS (LUND et al., 1990) e incubado a temperatura de 10°C por três semanas.

Após o período de incubação dos tubos contendo o caldo de enriquecimento PYGS, com o auxílio de alça descartável e esterilizada, calibrada para 10 µL, foram retiradas alíquotas e estriada em ágar sangue de carneiro a 5%. Posteriormente, foram incubadas à temperatura de 10°C por quatro semanas.

Uma alíquota de 0,5 mL do exsudato foi retirada e vertida em tubos de Eppendorf com o objetivo de destruir as células vegetativas. A seguir, adicionou-se igual volume, 0,5mL, de etanol absoluto filtrado. Após 45 minutos de repouso, o conteúdo do Eppendorf foi homogeneizado e estriado em placas de ágar sangue com auxílio de alça descartável e esterilizada, calibrada para 10 µL. As placas inoculadas com a suspensão de esporos foram incubadas a temperatura de 10°C por três semanas.

Diretamente do exsudato foi retirada uma alíquota com auxílio de alça descartável e esterilizada, calibrada para 10 µL, e estriada em ágar sangue de

carneiro a 5%. A seguir as placas foram incubadas à temperatura de 10°C por quatro semanas.

Isolamento

Todas as unidades formadoras de colônias (UFC) típicas e suspeitas de pertencerem a espécie *Clostridium estertheticum,* presentes nas placas de ágar sangue foram repicadas, em câmara de anaerobiose, para novas placas de ágar sangue visando seu isolamento. Uma vez isoladas, as UFCs, foram submetidas à coloração em Gram, prova da catalase, prova da oxidase e microscopia de contraste de fase, visando a detecção de esporos e/ou células vegetativas com características morfotintoriais e morfométricas similares às do *C. estertheticum*.

Análise de bactérias ácido láticas e *Enterobacteriacea*

Preparação das amostras

Ainda no laboratório de microbiologia - seção de cultivo de anaeróbios - uma porção de aproximadamente 250 gramas, das 22 amostras brasileiras, foram retiradas em condições de assepsia no interior da câmara de anaerobiose, depositadas em placas de Petri esterilizadas e encaminhadas ao laboratório de microbiologia de alimentos do Centro de Pesquisa em Alimentos/Escola de Veterinária/UFG.

A seguir, uma sub-amostra de 10 gramas foi retirada e homogeneizada com 90mL de água peptonada tamponada 0,1%. Obteve-se dessa forma a diluição 10^{-1} a partir da qual diluições decimais seriadas sucessivas foram preparadas.

Contagem de bactérias ácido láticas (ICMSF, 2000)

Alíquotas de 1,0 mL das diluições decimais selecionadas foram transferidas para placas de Petri esterilizadas. Sobre o inóculo verteu-se 15mL do

Ágar para *Lactobacillus* Man, Rogosa & Sharpe – MRS - previamente fundido e resfriado a temperatura média de 45°C ±2°C. Em seguida, procedem-se a homogeneização em constantes movimentos seguindo a forma do numeral oito. Após a homogeneização as placas foram mantidas em superfície plana até a completa solidificação do meio. Uma vez solidificado o meio, verteu-se 5mL do mesmo ágar, proporcionando condição de anaerobiose.

Após a solidificação do meio as placas foram acondicionadas em jarra de anaerobiose e transferidas para estufa bacteriológica a 35°C ±2°C por 48 horas. Após a incubação procedeu-se a contagem das placas que continham entre 15 – 150 UFCs, expressando o resultado em UFC/g de carne.

Contagem de *Enterobacteriaceae* (ICMSF, 2000)

Alíquotas de 1,0 mL das diluições decimais selecionadas foram transferidas para placas de Petri esterilizadas. Sobre o inoculo verteu-se 15mL do ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose – VRBG previamente fundido e resfriado a temperatura média de 45°C ±2°C. Em seguida, procedia-se a homogeneização em constantes movimentos seguindo a forma do numeral oito. Após a homogeneização as placas foram mantidas em superfície plana até a completa solidificação do meio. Uma vez solidificado o meio, verteu-se 5mL do mesmo ágar, proporcionando condições de anaerobiose. Após a solidificação do meio as placas foram transferidas para estufa bacteriológica a 36°C ±1°C por 18-24 horas. Após a incubação procedeu-se a contagem das unidades formadoras de colônias – UFC em placas que continham entre 15 – 150 UFCs, expressando o resultado em UFC/g de carne.

Análises estatísticas

A análise dos dados de isolamento de *Clostridium estertheticum* baseou-se na distribuição de frequência absoluta e relativa, além da estatística descritiva, sendo os dados apresentados por meio do emprego de Quadros, Figuras e Gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras de carnes utilizadas no experimento encontravam-se deterioradas, com aspecto totalmente alterado, coloração escura, às vezes esverdeada, grande quantidade de exsudato e com odor desagradável "pútrido", mesmo antes da abertura da embalagem, devido à grande produção de gás que provavelmente escapava pela solda da embalagem (Figura 3). BRODA et al. (1997) e BRODA et al. (2000) identificaram os compostos formados no processo de deterioração e que, provavelmente, contribuem para a formação do odor característico: ésteres butíricos, propionato, isobutirato, butanol e compostos formados na fermentação de carboidratos. Da descarboxilação de aminoácidos, são formados compostos sulfurados voláteis, amônia e diaminas (cadaverina e putrescina).

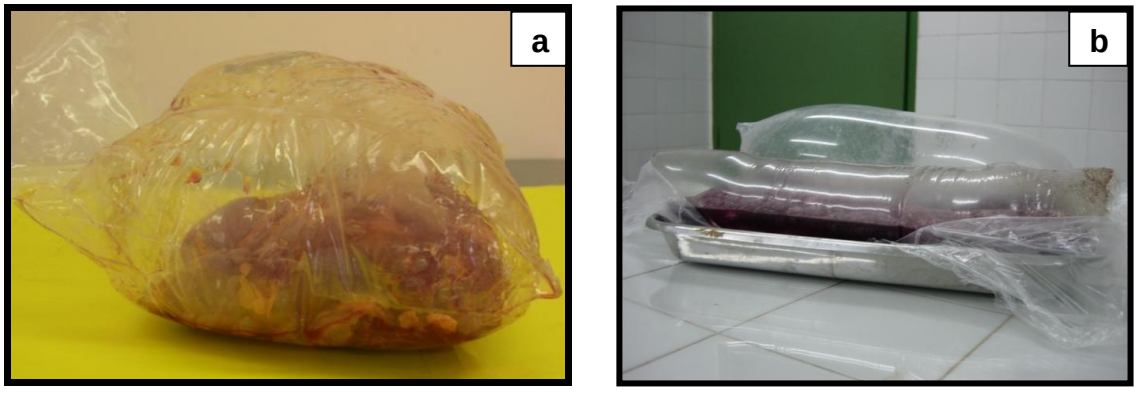

FIGURA 3 – a) Embalagem tufada de contra-filé tipo exportação. Brasil, 2003; b) carne de carneiro tufada. Nova Zelândia, 2006
Fonte: Acervo pessoal

No Quadro 1 podem ser vistos os resultados relativos ao diagnóstico molecular do *Clostridium estertheticum* e do *C. gasigenes* em amostras de carnes tufadas oriundas do Brasil.

QUADRO 1 **–** Resultados para *C. estertheticum – primers* RFP/RRP (HELPS et al., 1999), 16SEF/16SER (BRODA et al., 2003) e EISRF/EISRR (BRODA et al., 2003) - e *C. gasigenes – primer* 16SDBF/16SDBR (BRODA et al., 2003) em carnes brasileiras refrigeradas e embaladas a vácuo,analisados em Goiânia/GO, 2004 a 2008.

Amostras de cortes cárneos	***C. estertheticum***			***C. gasigenes***
	HELPS et al. (1999) RFP / RRP	**BRODA et al. (2003) 16SEF/16SER**	**BRODA et al. (2003) EISRF/EISRF**	**BRODA et al. (2003) 16SDBF/16SDBR**
nº 1	+	-	-	-
nº 2	+	+	-	-
nº 3	+	-	-	-
nº 4	+	+	-	-
nº 5	-	-	-	-
nº 6	-	-	-	-
nº 7	+	+	-	-
nº 8	+	+	-	-
nº 9	-	-	-	-
nº 10	-	-	-	-
nº 11	+	+	-	-
nº 12	+	+	-	-
nº 13	+	+	-	-
nº 14	+	+	-	-
nº 15	+	+	-	-
nº 16	+	+	-	-
nº 17	+	+	-	-
nº 18	+	+	-	-
nº 19	+	+	-	-
nº 20	+	+	-	-
nº 21	+	+	-	-
nº 22	-	-	-	-
Total	**17/22**	**15/22**	**0/22**	**0/22**

(+) positivo/presente

(-) negativo/ausente

Nota-se no Quadro 1 que dos cortes cárneos com embalagens tufadas, 17/22 (77,275%) são positivos e 5/22 (22,725%) negativos para o *C. estertheticum* quando se empregou o *primer* RFP / RRP (HELPS et al.1999). Quando o par 16SEF e 16SER (BRODA et al., 2003) foi utilizado, 15/22 (68,2%) amostras são positivas e 7/22 (31,8%) negativas para o *C. estertheticum,*

conforme ilustrado também pela Figura 4. Os *primers* EISRF e EISRR e 16SDBF e 16SDBR (BRODA et al., 2003), não proporcionaram resultados positivos para o *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, respectivamente.

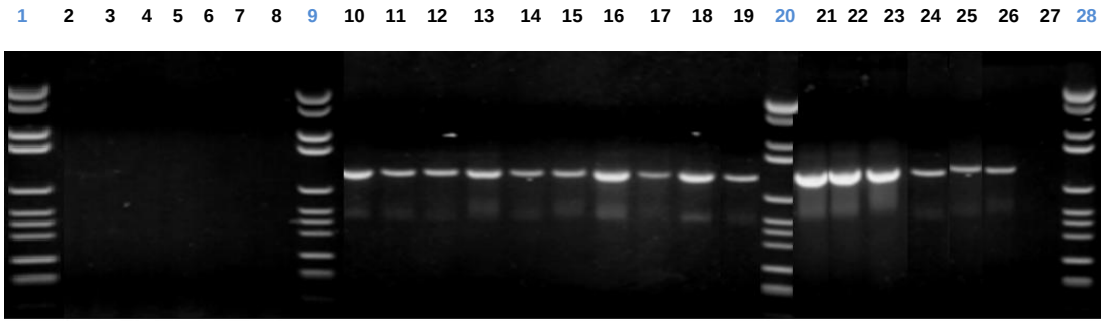

FIGURA 4 – Gel de eletroforese de produtos de PCR de 790 pb do *C. estertheticum* obtidos a partir de amostras de carnes brasileiras refrigeradas embaladas a vácuo, empregando-se o par de *primers* 16SEF/16SER. 1, 9, 20, 28: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 100pb); 2 a 8: amostras negativas; 10 a 19 e 21 a 25: amostras positivas; 26: controle positivo (DSMZ 8809); 27: controle negativo.
Fonte: Acervo pessoal

Vale ressaltar que o primer RFP e RRP foi utilizado apenas na triagem das amostras, por possuir alta sensibilidade e baixa especificidade. Segundo BRODA et al. (2003), este *primer* amplifica outras espécies semelhantes ao *Clostridium estertheticum.* Os resultados positivos ao par de primers RFP/RRP, juntamente com os resultados positivos ao 16SER/16SEF, vêm sugerir que das 17 amostras positivas, 15 são realmente *C. estertheticum estertheticum* ou *C. estertheticum* like*.*

Os resultados negativos ao par de primers EISRF e EISRR e positivos ao par 16SEF e 16SER permitem inferir que nas amostras brasileiras o *Clostridium estertheticum* like estava presente, produzindo grande quantidade de gás, coloração escura, às vezes esverdeada, grande quantidade de exsudato e o odor extremamente desagradável. Vale lembrar que este par de *primer* foi criado para diferenciar as duas espécies (BRODA et al., 2003).

Amostras negativas ao primeiro *primer* (HELPS et al., 1999) indicam que outros grupos de microrganismo podem ter desempenhado papel importante no tufamento das embalagens. Nestes casos, recomenda-se que o histórico do problema seja levantado e outras análises bacteriológicas realizadas. No presente estudo, paralelamente, essas amostras foram também encaminhadas ao laboratório de microbiologia de alimentos do Centro de Pesquisa em

Alimentos/Escola de Veterinária/UFG/Goiânia - GO e revelaram altas contaminações com bactérias ácido láticas – acima de 10^7 UFC/g de carne - e espécies da família *Enterobacteriaceae* – acima de 10^6 UFC/g de carne. Com base nesses resultados pode-se inferir que houve abuso de temperatura em alguma etapa do processo, provavelmente etocagem e/ou transporte. Estes microrganismos podem multiplicar na carne em alto número e torná-la imprópria ao consumo humano (KALCHAYANAND et al., 1989; DAVIES, 1992; LYHS, 2002; JONES, 2004; ERCOLINI et al., 2006, HOLLEY & GILL, 2005).

Os resultados negativos ao *primer* 16SDBF/16SDBR, específico para o *C. gasigenes*, confirmam que a deterioração, neste caso, não foi provocada por este *Clostridium* deteriorante.

Os resultados das análises realizadas em Hamilton/Ilha Norte/Nova Zelândia, das 14 amostras de exsudato de carnes brasileiras tufadas, encontram-se no Quadro 2 e Figuras 5 e 6.

QUADRO 2 **–** Resultados para *C. estertheticum primers* - RFP/RRP (HELPS et al., 1999), 16SEF/16SER (BRODA et al., 2003) e EISRF/EISRR (BRODA et al., 2003) - e *C. gasigenes – primer* 16SDBF/16SDBR (BRODA et al., 2003) em exsudato de carnes brasileiras refrigeradas e embaladas a vácuo, analisados em Hamilton/Ilha Norte/Nova Zelândia, 2006.

Amostra	***C. estertheticum***			***C. gasigenes***
	HELPS et al. (1999) RFP / RRP	**BRODA et al. (2003) 16SEF/16SER**	**BRODA et al. (2003) EISRF/EISRF**	**BRODA et al. (2003) 16SDBF/16SDBR**
nº 1	+	+	-	-
nº 2	+	-	-	-
nº 3	+	-	-	-
nº 4	+	+	-	-
nº 5	+	+	-	-
nº 6	+	+	-	-
nº 7	+	-	-	-
nº 8	+	-	-	-
nº 9	+	-	-	-
nº 10	+	-	-	-
nº 11	+	+	-	-
nº 12	+	-	-	-
nº 13	+	-	-	-
nº 14	+	-	-	-
TOTAL	**14/14**	**5/14**	**0/14**	**0/14**

(+) positivo/presente

(-) negativo/ausente

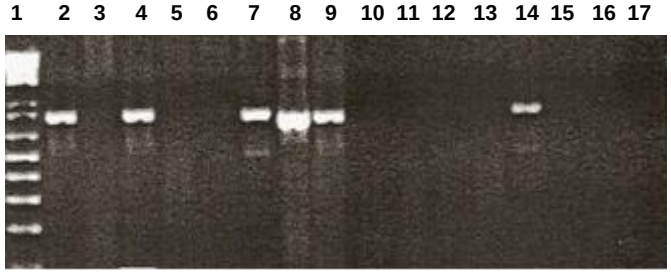

FIGURA 5 – Gel de eletroforese de produtos de PCR de 790 pb do *C. estertheticum* obtidos a partir de amostras de exsudato de carnes brasileiras refrigeradas embaladas a vácuo, empregando-se o par de *primers* 16SEF/16SER. 1: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 100pb); 2: controle positivo (DSMZ 8809); 3: controle negativo; 4: amostras positivas; 5 e 6:amostras negativas; 7, 8 e 9: amostras positivas; 10, 11,12, 13: amostras negativas; 14: amostras positiva; 15, 16 e 17: amostras negativas.
Fonte: Acervo pessoal

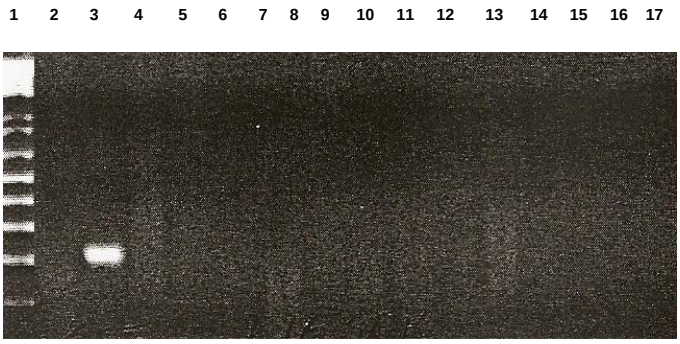

FIGURA 6 – Gel de eletroforese de produtos de PCR de 230 pb do *C. estertheticum* obtidos a partir de amostras de exsudato de carnes brasileiras refrigeradas embaladas a vácuo, empregando-se o par de *primers* EISRF/EISRR. 1: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 100pb); 2: controle negativo; 3: controle positivo (DSMZ 8809); 4 a 17: amostras negativas.
Fonte: Acervo pessoal

Verifica-se que todos exsudatos de cortes cárneos embalados a vácuo, analisados na Nova Zelândia, foram positivos ao *primer* RFP/RRP (HELPS et al., 1999) e negativos ao *primer* EISRF e EISRR e 16SDBF e 16SDBR (BRODA et al., 2003). O par de *primer* 16SEF e 16SER (BRODA et al., 2003), apresentou 35,7% (5/14) de positividade. Esses resultados são similares aos obtidos para cortes cárneos brasileiros tufados - dados mostrados no presente estudo (Quadro 1 e Figura 4) - e confirmam que o *C. estertheticum* like é o principal causador do tufamento das embalagens brasileiras.

No Quadro 3 são apresentados os dados relativos à presença/ausência de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de exsudato de carnes de carneiro tufadas procedentes do Reino Unido.

QUADRO 3 **–** Resultados para *C. estertheticum primers* - RFP/RRP (HELPS et al., 1999), 16SEF/16SER (BRODA et al., 2003) e EISRF/EISRR (BRODA et al., 2003) - e *C. gasigenes – primer* 16SDBF/16SDBR (BRODA et al., 2003) em exsudato de carnes de carneiro refrigeradas e embaladas a vácuo, do Reino Unido, analisados em Hamilton/Ilha Norte/Nova Zelândia, 2006.

Amostras de exsudato	***C. estertheticum***			***C. gasigenes***
	HELPS et al. (1999) RFP / RRP	**BRODA et al. (2003) 16SEF/16SER**	**BRODA et al. (2003) EISRF/EISRF**	**BRODA et al. (2003) 16SDBF/16SDBR**
UK nº 1	+	+	+	-
UK nº 2	+	+	+	-
UK nº 3	+	+	+	-
UK nº 4	+	+	+	-
UK nº 5	+	+	+	-
UK nº 6	+	+	+	-
Total	**6/6**	**6/6**	**6/6**	**0/6**

(-) negativo/ausente

(+) positivo/presente

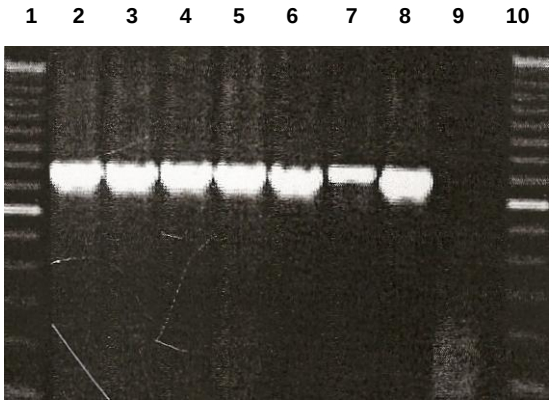

FIGURA 7 – Gel de eletroforese de produtos de PCR de 790 pb do *C. estertheticum* obtidos a partir de amostras de exsudato de carnes de carneiro refrigeradas embaladas a vácuo, empregando-se o par de *primers* 16SEF/16SER. 1 e 10: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 100pb); 2 a 7: amostras positivas; 8: controle positivo (DSMZ 8809); 9: controle negativo.
Fonte: Acervo pessoal

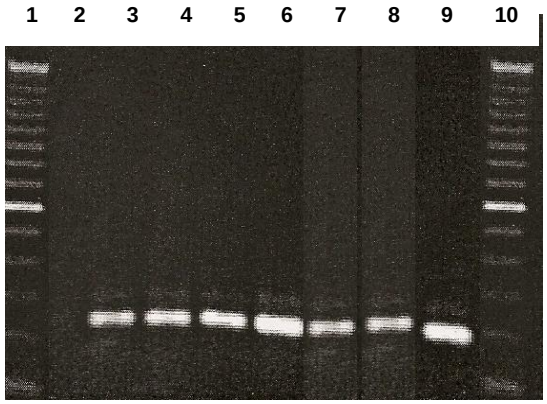

FIGURA 8 – Gel de eletroforese de produtos de PCR de 230 pb do *C. estertheticum* obtidos a partir de amostras de exsudato de carnes de carneiro refrigeradas embaladas a vácuo, empregando-se o par de *primers* EISRF/EISRR. 1 e 10: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 100pb); 2: controle negativo; 3: : controle positivo (DSMZ 8809); 3 a 9: amostras positivas
Fonte: Acervo pessoal

No que pese o pequeno número de amostras de exsudato de cortes cárneos de carneiro de embalagens tufadas provenientes do Reino Unido, todas foram positivas aos *primers* RFP/RRP, 16SEF/16SER e EISRR/EISRS (HELPS et

al., 1999 e BRODA et al., 2003) e negativas ao *primer* 16SDBF e 16SDBR (BRODA et al., 2003), específico para *C. gasigenes.*

Esses resultados confirmaram que a deterioração ocorrida em carne de carneiro do Reino Unido foi provocada pelo *Clostridium estertheticum estertheticum*.

Encontram-se no Quadro 4 e Figuras 9 e 10 os resultados relativos a presença/ausência de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de carnes refrigeradas de cervo provenientes de experimento realizado na Nova Zelândia.

QUADRO 4 **–** Resultados para *C. estertheticum primers* - RFP/RRP (HELPS et al., 1999), 16SEF/16SER (BRODA et al., 2003) e EISRF/EISRR (BRODA et al., 2003) - e *C. gasigenes* – *primer* 16SDBF/16SDBR (BRODA et al., 2003) em amostras de carnes de cervo com embalagens tufadas de origem neozelandesas, analisadas em *Hamilton*/Ilha Norte/Nova Zelândia, 2006.

Amostra de carnes tufadas	***C. estertheticum***			***C. gasigenes***
	HELPS et al. (1999) RFP / RRP	**BRODA et al. (2003) 16SEF/16SER**	**BRODA et al. (2003) EISRF/EISRF**	**BRODA et al. (2003) 16SDBF/16SDBR**
nº 1	+	+	+	-
nº 2	+	+	+	-
nº 3	+	+	+	-
nº 4	+	+	+	-
nº 5	+	+	+	-
nº 6	+	+	+	-
nº 7	+	+	+	-
nº 8	+	+	+	-
nº 9	+	+	+	-
nº 10	+	+	+	-
nº 11	+	+	+	-
nº 12	+	+	+	-
Total	**12/12**	**12/12**	**12/12**	**0/12**

(+) positivo/presente

(-) negativo/ausente

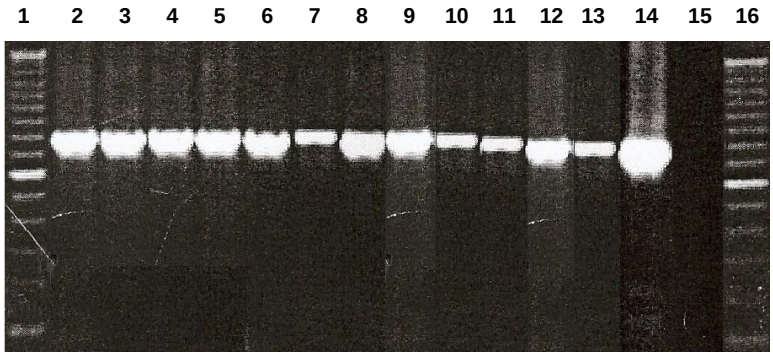

FIGURA 9 – Gel de eletroforese de produtos de PCR de 790 pb do *C. estertheticum* obtidos a partir de amostras de carnes refrigeradas de cervo embaladas a vácuo, empregando-se o par de *primers* 16SEF/16SER. 1 e 16: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 100pb); 2 a 13: amostras positivas; 14: controle positivo (DSMZ 8809); 15: controle negativo.
Fonte: Acervo pessoal

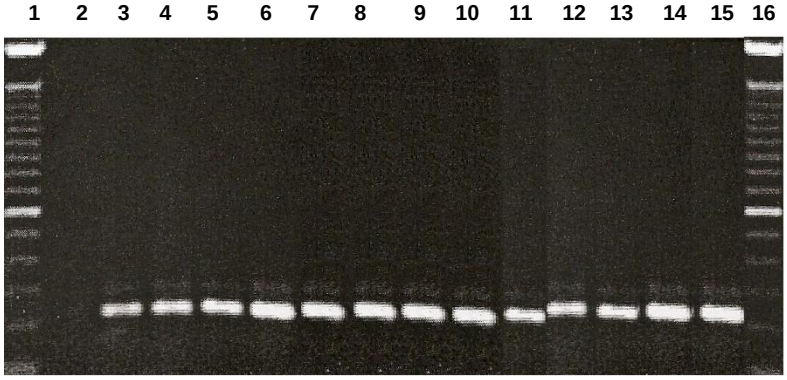

FIGURA 10 – Gel de eletroforese de produtos de PCR de 230 pb do *C. estertheticum* obtidos a partir de amostras de carnes refrigeradas de cervo embaladas a vácuo, empregando-se o par de *primers* EISRF/EISRR. 1 e 16: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 100pb); 2: controle negativo; 3: : controle positivo (DSMZ 8809); 4 a 15: amostras positivas
Fonte: Acervo pessoal

As amostras de carnes de cervo procedentes da Nova Zelândia, foram encaminhadas pela indústria ao laboratório para realização de um experimento, nas quais foram inoculadas cepas de *C. estertheticum* (DSM 8809) com o objetivo de observar a evolução do processo de tufamento, ou seja, reproduzir em condições controladas o processo de deterioração. Todas amostras inoculadas apresentaram deterioração com formação de gás, exceto as amostras controles. Observa-se que os *primers* utilizados RFP/RRP (HELPS et al., 1999), 16SEF/16SER (BRODA et al., 2003) e EISRR/EISRS (BRODA et al., 2003) confirmam a presença do *Clostridium estertheticum* e *C. estertheticum* like. O

primer 16SDBF e 16SDBR (BRODA et al., 2003), específico para *C. gasigenes* não amplificou nenhuma das amostras.

Na Figura 11 podem ser observados os percentuais de positividade para *C. estertheticum estertheticum* e *C. estertheticum* like quando foram considerados os três pares de *primers* e a procedência da amostra.

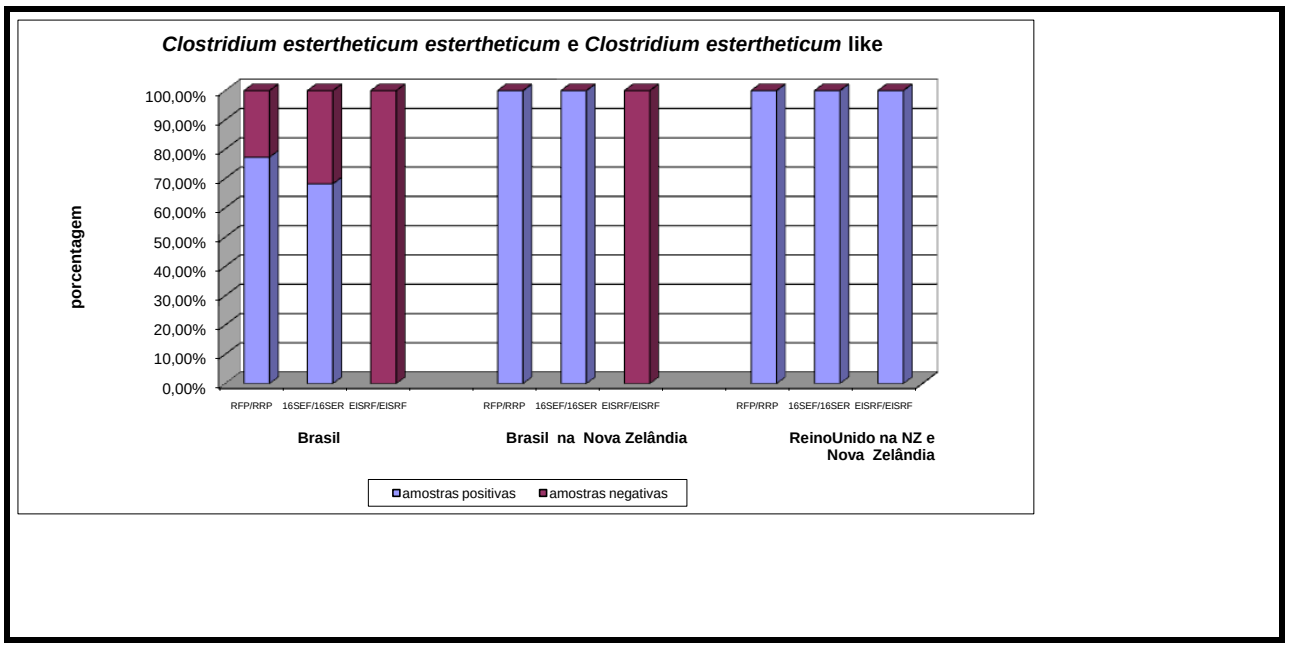

FIGURA 11 – Resultados em % para *C. estertheticum estertheticum* e *C. estertheticum* like obtidos a partir de amostras de carnes refrigeradas de bovino, carneiro e cervo – de procedência do Brasil, Nova Zelândia e Reino Unido, respectivamente - embaladas a vácuo, empregando-se os pares de *primers* RFP/RRP, 16SER/16SEF e EISRF/EISRR

Nota-se que o *C. estertheticum* like foi o maior responsável pelos episódios de deterioração das carnes brasileiras. Porém não se pode ignorar o papel desempenhado pelo *C. estertheticum estertheticum* neste processo no país e no mundo. Nas deteriorações das carnes procedentes do Reino Unido e neozelandesas o *C. estertheticum estertheticum* preponderou, mas vale ressalvar que as amostras procedentes do experimento com carne de cervo foram intencionalmente contaminadas com o deteriorante.

No que se refere às análises bacteriológicas convencionais das amostras que apresentaram resultados positivos à técnica de PCR, pode-se afirmar que por ser um microrganismo anaeróbio estrito e fastidioso, houve muita dificuldade em seu cultivo e isolamento. Essas dificuldades são corroboradas por HOLDEMAN et al. (1977), BRODA et al. (1999) que consideraram as características fenotípicas do *Clostridium* de difícil interpretação.

No presente experimento foram encontradas as seguintes características: a) Bastonetes móveis, b) Gram-positivos (Figura 12), c) anaeróbios estritos, d) prova da catalase negativa, e) provada oxidase negativa, f) esporos elípticos terminais ou subterminais (Figura 13 e 14), g) beta-hemolíticos ou não hemolíticos em ágar sangue de carneiro a 5%. Essas características foram confirmadas por BRODA et al. (1996) e SPRING et al.(2003).

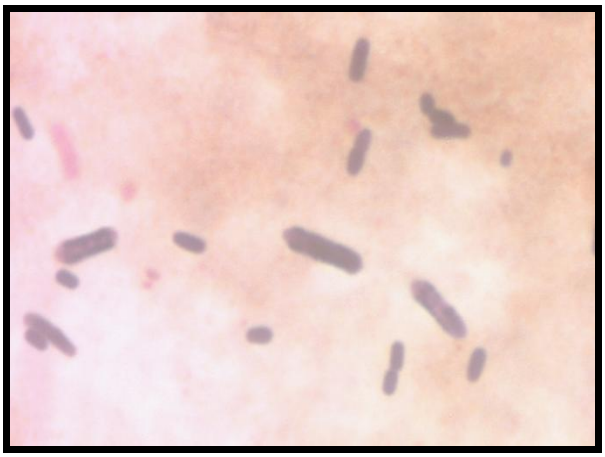

FIGURA 12 – Bastonetes, Gram-positivos observados de exsudato de embalagens tufadas de amostras neozelandesas
Fonte: Acervo pessoal

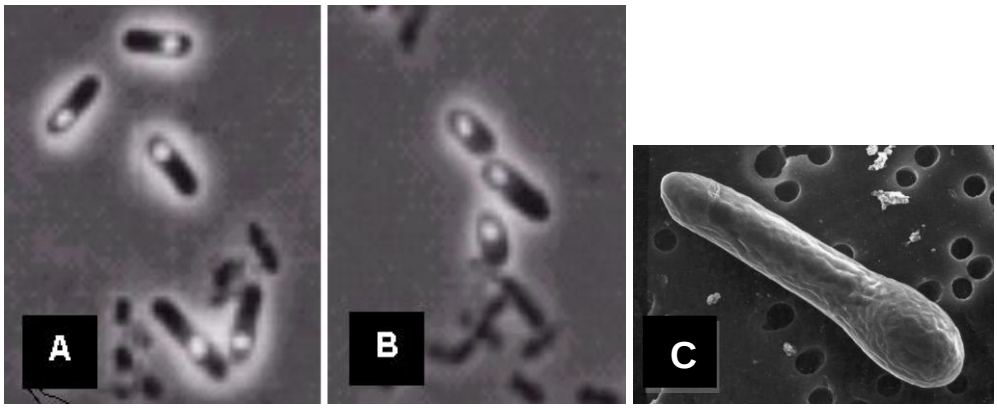

FIGURA 13 – Fotomicrografia de contraste de fase de esporos de *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* DSM 8809 (a) e *C. estertheticum* subsp. *laramiense* DSM 14864 (b) (SPRING et al., 2003).c) Foto eletônica do esporo *C. estertheticum* like
Fonte: (BRODAet al, 2003)

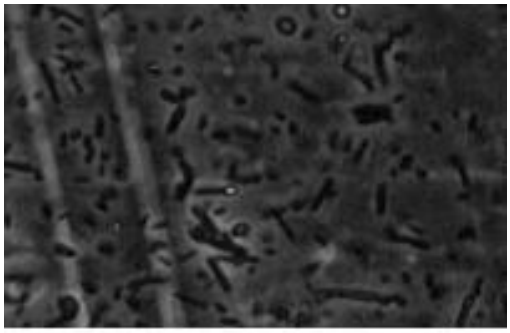

FIGURA 14 – Fotomicrografia de contraste de fase de esporos de *C. estertheticum* de embalagens tufadas brasileiras
Fonte: Acervo pessoal

Das 22 amostras analisadas pelo PCR, 15 foram encaminhadas à bacteriologia convencional para isolamento. Destas, foram isoladas seis isolados sugestivos do *C. estertheticum* like (Figura 15), em um período de oito meses. De acordo com BRODA et al. (2003) os métodos microbiológicos clássicos para detecção de *Clostridium* spp psicrofílicos e psicrotolerantes, associados com este tipo de deterioração, são de difícil realização. Envolvem muito trabalho, persistência, tempo para execução dos múltiplos passos para isolamento e confirmação da habilidade do microrganismo em produzir gases (BRODA, 2003).

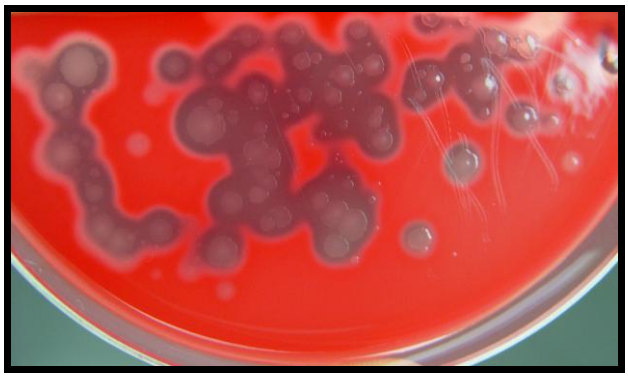

Figura 15 – Unidades formadoras de colônias sugestivas de *Clostridium estertheticum* like
Fonte: Acervo pessoal

Apesar de ser um microrganismo esporulado, na forma vegetativa revela ser muito sensível e não ser um bom competidor. Os isolados obtidos no presente estudo produzem grande quantidade de gás, ao mesmo tempo que foram extremamente sensíveis à presença de alguns desses gases produzidos.

Segundo BRODA et al. (2003) o restabelecimento desses clostrídios é seriamente prejudicado pelo efeito tóxico do butanol produzido durante o processo de produção de gases. Talvez seja esse um dos motivos de terem sido observados muitos resultados falsos negativos ao cultivo convencional. Além disso, a inexistência de um meio de cultura específico e/ou um sistema comercial para a identificação desses microrganismos, torna o trabalho mais complexo (BRODA et al., 1998).

Para as 14 amostras de exsudato de carnes brasileiras analisadas na Nova Zelândia adotou-se o mesmo protocolo. Das cinco amostras positivas ao PCR foram obtidos três isolados de *Clostridium estertheticum* like, em um período de três meses.

Nas seis amostras de exsudato de carne de carneiro do Reino Unido, foi obtido apenas um isolado de *C. estertheticum estertheticum*.

Das 12 amostras positivas de carne refrigerada de cervo da Nova Zelândia, apenas duas foram submetidas à análise bacteriológica convencional, haja vista que o microrganismo foi introduzido na carne experimental e intencionalmente.

Tendo como base os resultados obtidos pode-se afirmar que o *Clostridium estertheticum estertheticum* realmente é um dos principais causadores de tufamento de embalagens, pois, em aproximadamente 35 dias após a inoculação do microrganismo na carne, começam aparecer as primeiras microbolhas (Figura 16). Depois de 50 dias, algumas embalagens tem o vácuo rompido (Figura 17) e, daí em diante, ocorre produção de grande quantidade de gases e exsudato.

FIGURA 16 – Amostra experimental com 35 dias de produção apresentando o aparecimento de bolhas na embalagem.
Fonte: Acervo pessoal

FIGURA 17 – Amostra experimental com 50 dias de produção apresentando o rompimento do vácuo da embalagem
Fonte: Acervo pessoal

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo conclui-se:

- Os episódios de tufamento de embalagens de carnes brasileiras refrigeradas embaladas a vácuo tiveram como principal agente causador o *Clostridium estertheticum* “like”.

- O *Clostridium estertheticum estertheticum* é o principal responsável pela deterioração das carnes de carneiro e, consequentemente, pelo tufamento das embalagens no Reino Unido.

- Os clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos são os microrganismos anaeróbios deteriorantes mais associados aos processos de tufamento de embalagens a vácuo e alteração das carnes refrigeradas, não importando a espécie animal e nem o país de origem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC, O Brasil vende carne com sustentabilidade e mantém a liderança mundial - Brazil Export, 2008. Disponível em: http://www.abiec.com.br. Acesso em: 03 nov. 2008.

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

3. BRODA, D., M., SAUL, D., M., LAWSON, P., A., BELL, R., G., MUSGRAVE, D., R. *Clostridium gasigenes* sp. nov*.,* a psychrophile causing spoilage in vacuum-packed meat. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.107-118, 2000.

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

5. BRODA, D., M., DELACY, 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.

6. BRODA, D., M., DELACEY, K., M., BELL, R., G., BRAGGINS, T., J., COOK, R., L. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with “Blown pack” spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. **International Journal of Food Microbiology***, v.*29, p.335-352, 1996.

7. COLLINS, M., D., RODRIGUES, U., M., DAINTY, R.,H., EDWARDS, R., A., ROBERTS,T., A. Taxonomic studies on a psychrophilic Clostridium from vacuum-packed beef:description of *Clostridium estertheticum sp*. **Microbiological .Letters**, v.96, p.235-240, 1992.

8. DAVIES, A. **Meat microbiology.** In: Introduction to Meat Product Manufacture, Leatherhead Food Research Association, UK. 1992. 121 p.

9. ERCOLINI, D., RUSSO, F., TORRIERI, E., MASI, P., VILLANI, F. Changes in spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packagin conditions. **Applied and Enviromental Microbiology,** v.72, n.07, p.4663-4671, 2006.

10. GENBANK. Entrez. **Nucleotide.**. On line. Disponível na Internet http://www.ncbi.nlm.nih.gov/. Acesso em 03 de jan. 2007.

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

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

13. HOLDEMAN, L. V., CATO, E. P., MOORE, W. E .C. **Anaerobe Laboratory Manual**, 4th edição, Blacsburg, Va: Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.

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

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

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

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

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

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

20. LYHS U. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finlândia.
21. LUND B. M., GRAHAM A. F., GEORGE S. M., BROWN D. The combined effect of incubation temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of non-proteolytic, type B *Clostridium botulinum*. **Journal of Applied Bacteriology,** vol. 69, p.481-492, 1990.

22. PRADO, C.S., Influência do método de Resfriamento de carcaças bovinas nas variações de peso e nas medidas físico-químicas, sensoriais e microbiológicas do contra-filé (m. *Longissimus dorsi*), 2005. 145p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

23. RAUECKER U. N., *Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes* em carne bovina refrigerada, equipamentos e ambiente de matadouros-frigoríficos de diferentes estados brasileiros 2007. 81p. Dissertação (Mestrado Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Brasil.

24. SPRING, S., MERKHOFFER, B., WEISS, N., KROPPENSTEDT, R. M., HIPPE, H., STACKEBRANDT, E. Characterization of novel psychrophilic clostridia from Antartic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov., and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. **International journal of systematic and Evolutionary Microbiology,** v.53, p.1019-1029, 2003.

CAPÍTULO 3 - Emprego das técnicas de RFLP- PCR e AFLP na diferenciação de espécies de clostrídiheos psicrofílicos e psicrotróficos associados à deterioração de carnes refrigeradas embaladas a vácuo.

RESUMO: Diversos microrganismos psicrofílicos e psicrotróficos podem estar envolvidos na deterioração de carnes refrigeradas embaladas a vácuo acompanhada de grande produção de gás, destacando-se espécies do gênero *Clostridium*. O diagnóstico molecular e a utilização de técnicas de tipagem são fundamentais para a diferenciação das espécies e subespécies envolvidas neste tipo de deterioração. No presente estudo foram utilizadas as técnicas de AFLP e RFLP – PCR. As duas técnicas foram capazes de distinguir as espécies e subespécies de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos, porém, a técnica de AFLP apresentou maior poder discriminatório. Essa técnica foi capaz de diferenciar 100% das espécies – *C. estertheticum, C. frigoris, C. bowmani, C. lacusfryxellense e C psychrophylum* - e também as subespécies - *Clostridium estertheticum estertheticum, Clostridium estertheticum laramiense, Clostridium estertheticum* like K21 e *Clostridium estertheticum* like K24 *.* Por meio do emprego da técnica de RFLP foi possível diferenciar as espécies do gênero *Clostridium* psicrofílicos e psicrotróficos e também as subespécies *C. estertheticum estertheticum* e *Clostridium estertheticum* like, utilizando um conjunto de quatro endonucleases – *AluI, CfoI, TaqI e HaeIII*. A enzima de restrição *HaeIII* proporcionou maior variedade de fragmentos e capacidade de diferenciar as espécies de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos. Das quatro enzimas testadas a *TaqI* foi a única capaz de diferenciar as subespécies *C. estertheticum estertheticum* e *C. estertheticum laramiense* do *C. estertheticum* like. As duas amostras brasileiras isoladas se enquadraram no grupo do *Clostridium estertheticum* like, muito embora não exista confirmação da ausência do *Clostridium estertheticum estertheticum* no país.

Palavras-chave: Deterioração, tufamento de embalagem, enzimas de retrição, PCR, AFLP, RFLP.

CHAPTER 3 - Use of AFLP and RFLP-PCR to differentiate strains of psychrophilic and psychrotrophic clostridia associated with 'blown pack' spoilage of vacuum packed meats

ABSTRACT: Several psychrophilic and psychrotrophic microorganisms, especially species of *Clostridium*, along with a large gas production, may be involved in the spoilage of vacuum packed refrigerated meats. The molecular characterization, by the PCR technique and typing techniques was used to differentiate the species and subspecies involved in this type of deterioration. In this study, the selected techniques were AFLP and RFLP – PCR, being both able to distinguish species and subspecies of psychrophilic and psychrotrophic clostridia. However, the AFLP showed the highest discriminatory power, being able to distinguish 100% of the species - *C. estertheticum*, *C. frigoris*, *C. bowmani*, *C. lacusfryxellense* and *C. psychrophylum* - and also the subspecies – *C. estertheticum estertheticum*, *C. estertheticum laramiense*, *C. estertheticum* like k21 and k24. By the technique of RFLP it was possible to differentiate the species of clostridia psychrotrophic, psichrophilic and also the subspecies *C. estertheticum estertheticum* and *Clostridium estertheticum* like along with the use of four restriction endonucleases - *AluI, CfoI, TaqI* and *HaeIII*. The *HaeIII* provided greater variety of fragments and the ability to differentiate the species of clostridia psychrophilic and psychrotrophic, while a *TaqI* was the only enzyme capable of differentiating the subspecies of *C. estertheticum estertheticum* and *C. estertheticum laramiense* of C*. estertheticum* like. The Brazilian samples isolated fit into the group of *Clostridium estertheticum* like.

Keywords: AFLP, blown pack, meat spoilage, PCR, restriction enzymes, RFLP.

INTRODUÇÃO

A demanda mundial por carnes cresce graças ao aumento da população, da renda *per capita* e da urbanização. Logo, pode-se esperar o crescimento do consumo em países emergentes. Com isso, as previsões a médio e longo prazo para o mercado de carne bovina são muito favoráveis para o Brasil, nesse momento em que a crise no mercado financeiro mundial começa a ter efeitos na economia (CAVALCANTI, 2008).

O Brasil vem se consolidando como o maior exportador de carne do mundo, vendendo para mais de 150 países. Em decorrência disso, o segmento da produção de carne bovina é hoje um dos maiores geradores de renda do país. Muitos são os fatores que conferem vantagens comparativas do segmento da carne brasileira em relação à de outros países, como por exemplo: a) preços e disponibilidade de terras, b) escalas e sistemas de produção, c) o tipo de rebanho (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de carne -ABIEC, 2008).

A situação da União Européia e dos Estados Unidos da América é bastante diferente da brasileira, pois não há perspectiva de aumento do rebanho, os custos são altos e a produtividade não apresenta possibilidade de crescimento. Já a Rússia possui diversos planos de investimento na cadeia de carne suína e de frango, porém, possui dificuldade em aumentar sua produção de gado de corte. Enfim, o processo da cadeia bovina é visto pelo mundo inteiro como um investimento de grande complexidade e que requer alto investimento, tempo, espaço e dedicação (ABIEC, 2008).

Outro fator que confere vantagem ao Brasil é a qualidade e o sabor da carne bovina, que são conhecidos por um número crescente de consumidores de todo o mundo. A qualidade da carne bovina é fator relevante quando se analisa a segurança alimentar da população mundial. A deterioração da carne e a veiculação de doenças, constitui um tema de preocupação global do ponto de vista técnico-científico e comercial.

Apesar de todo avanço e tecnificação das indústrias brasileiras, do empenho dos órgãos de fiscalização e da implementação dos Manuais de Qualidade e Programas de Auto-Controle (Brasil, 2005), ainda podem ser observadas falhas operacionais relacionadas à capacidade máxima de matança diária e/ou velocidade horária de abate, abuso de temperatura, além de outros

fatores que implicam na obtenção de produto final com elevada carga microbiana inicial, que pode dar origem a problemas de ordem sanitária e afetar a qualidade da marca *Brazilian Beef* (MAPA, 2007).

A deterioração da carne devido o aparecimento do fenômeno "*Blown Packs*", ou seja, tufamento de embalagens é um dos grandes problemas enfrentados pelo Brasil. Este tipo de deterioração é caracterizado pela grande distensão da embalagem pela produção de gases, aumento da exsudação, alterações de cor e odor (HELPS et al., 1999).

São várias as espécies e subespécies de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos, alguns associados ao tufamento de embalagens e outros não. BRODA et al. (2002) associaram os clostrídios psicrofílicos, *C. estertheticum* e *C. gasigenes* ao tufamento de embalagens a vácuo em carnes refrigeradas, durante estocagem em temperaturas entre -1,5°C e 2,0°C.

Casos de tufamento de embalagens de carne bovina refrigerada embalada a vácuo ocorreram em diferentes frigoríficos de diversas regiões do Brasil e do mundo, levantando a suspeita de contaminação por *Clostridium* psicrófilos e psicrotolerantes.

O grande obstáculo encontrado pelos pesquisadores goianos na detecção dos microrganismos envolvidos nesse processo de deterioração foi o isolamento de culturas puras. Os métodos bacteriológicos convencionais empregados na detecção de *Clostridium* spp psicrofílicos e psicrotolerantes são complexos, envolvem muito trabalho, persistência e tempo para execução dos múltiplos passos para isolamento, seguido pela confirmação da habilidade do microrganismo em produzir gases (BRODA et al., 2002).

Outro fator que interfere no isolamento do microrganismo é o efeito antagônico provocado pelas bactérias ácidoláticas quando são utilizadas amostras de carnes tufadas e/ou exsudato. Essas bactérias possuem a capacidade de inibir o crescimento de espécies de clostrídios, por produção de bacteriocinas em meio sólido, similar ao que ocorre naturalmente na carne durante a estocagem em baixas temperaturas (CRANDALL & MONTVILLE, 1993). Além disso, os clostrídios são extremamente sensíveis à presença de alguns gases, consequentemente seu restabelecimento torna-se seriamente prejudicado pelo efeito tóxico do butanol produzido por ele mesmo durante o metabolismo.

A dificuldade de isolar esses microrganismos envolvidos no processo de deterioração fez com que alguns pesquisadores desenvolvessem procedimentos moleculares práticos, específicos e rápidos (HELPS et al., 1999 e BRODA et al., 2003).

SPRING et al. (2003) propuseram, em um estudo taxonômico, algumas espécies isoladas na região do lago Fryxell na Antártica, como o *C*. *frigoris, C. lacusfryxellense, C. bowmanii* e o *C. psychrophilum*. Esses microrganismos psicrofílicos pertencem, segundo os autores, ao mesmo grupo do *C. estertheticum,* porém não são produtores de gás.

Segundo AARTS et al. (1998) as bactérias são diferenciadas e classificadas de acordo com o crescimento, morfologia e características bioquímicas. Mas, com o passar do tempo, as pesquisas evoluíram e surgiram métodos adicionais como as técnicas de tipagem, as quais, segundo os autores, possuem vantagens e desvantagens e devem ser escolhidas de acordo com o objetivo e necessidades da pesquisa. Essas técnicas podem ser utilizadas para fins de identificação, epidemiologia e taxonomia de determinados microrganismos (FOLKERSTMA et al., 1996; HUYS et al., 1996; JANSSEN et al.,1996; LIN et al. 1996 e AARTS et al., 1998) .

BRODA et al. (2000) utilizando cepas de referência e isolados de produtos tufados, realizaram testes moleculares na tentativa de discriminar espécies e subespécies de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos. Os autores empregaram a técnica de RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* – derivada do uso da reação em cadeia pela polimerase, que utiliza o DNA ribossomal da subunidade menor -16S rDNA . O DNA amplificado foi clivado por quatro enzimas de restrição: *CfoI, AluI, HaeIII* e *TaqI*, as quais revelaram o melhor poder discriminatório.

As endonucleases são enzimas de restrição que reconhecem sequências específicas de nucleotídeos nas moléculas de DNA, e promovem um corte nesses pontos. A RFLP tem sido bastante utilizada para estabelecer relações taxonômicas e para identificar várias espécies de bactérias (HEYNDRICKX et al., 1996, PUKALL et al., 1998, BRODA et al., 2000), inclusive importantes espécies de interesse em saúde pública (GURTLER et al., 1991).

Já a técnica de AFLP – *Amplified fragment length polymorphism* - foi desenvolvida por VOS et al. (1995), com base na amplificação seletiva do

fragmento de restrição, além de combinar alto grau de reprodutibilidade e sensibilidade. O DNA bacteriano purificado é digerido, utilizando-se enzimas de restrição, seguido pela ligação de dois "*adapters"* complementares ao final dos fragmentos produzidos pela enzima. Para a amplificação, são utilizados *primers* complementares à sequência dos "*adapters"* juntamente ao sítio de restrição acrescentado de um ou mais nucleotídeos.

McLAUCHLIN et al. (2000) escolheram a AFLP como método de eleição, devido a facilidade encontrada para o diagnóstico epidemiológico de intoxicações por *C. perfringens.* A AFLP também foi utilizada por diversos autores que relataram a eficiência da técnica na tipagem epidemiológica de diversas e diferentes bactérias Gram - negativas e Gram - positivas (KLEIM et al.; 1997, PICARDEAU et al., 1997; GIBSON et al., 1998; BOUMEDINE & RODOLAKIS, 1998; STRUELENS et al., 1998; GEORNARAS et al., 1999; DUIM et al., 1999; VAN ELDERE et al., 1999).

O aumento de episódios de tufamento de embalagens de carnes bovinas refrigeradas embaladas à vácuo em estabelecimentos de abate brasileiros, motivou uma equipe de pesquisadores goianos a conhecer e diferenciar as inúmeras espécies e subespécies envolvidas nesse processo de deterioração. Para alcançar esses objetivos fez-se necessário o isolamento do microrganismo e o emprego do diagnóstico molecular – técnicas de tipagem como a *Amplified Fragment Length Polymorphism* e *Restriction Fragment Length Polymorphism / Polimerase Chain Reaction.*

Também tem sido ressaltadas a eficiência e facilidade da AFLP quanto a interpretação e performance, pois a técnica requer pequeno tamanho de fragmento de DNA (50 a 500pb). Outro fator de destaque refere-se ao baixo custo dos equipamentos, quando comparados aos empregados na técnica de Ribotipagem e *Pulsed Field Gel Eletroforesis*. Em relação ao poder discriminatório, o AFLP é semelhante ao do PFGE, porém, o resultado é obtido em menor intervalo de tempo. Além disso, oferece alto grau de flexibilidade e maior reprodutibilidade que o RAPD (KLEIM et al.; 1997, PICARDEAU et al., 1997; GIBSON et al., 1998; BOUMEDINE & RODOLAKIS, 1998; STRUELENS et al., 1998; GEORNARAS et al., 1999; DUIM et al., 1999; VAN ELDERE et al., 1999).

Uma vez detectados no Brasil alguns clostrídios psicrofílicos e/ou psicrotróficos por meio do emprego da técnica de PCR, bem como apontadas as principais fontes de contaminação nos estabelecimentos de abate, surgiu a necessidade de avançar na busca de novos conhecimentos sobre esses agentes. Nesse sentido, objetivou-se com o presente trabalho, diferenciar espécies e subespécies de clostrídios psicrofílicos e/ou psicrotróficos associados ao “tufamento de embalagens” a vácuo de carnes refrigeradas por meio do emprego das técnicas de AFLP e RFLP-PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi conduzido nos laboratórios de microbiologia - seção de anaeróbios e biologia molecular do *Mirinz Centre – Ruakura AgReserch / Hamilton* – Nova Zelândia, durante o período de janeiro a julho de 2006.

Outra parte foi conduzida no Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da UFG, de janeiro de 2007 a novembro de 2008, nos laboratórios de biologia molecular e microbiologia - seção de anaeróbios.

Amostragem

Foram utilizadas 26 isolados e cepas de clostrídios psicrofílicos e psicrotolerantes. Destas, vinte e quatro foram cedidas pelo *Mirinz Centre – Ruakura AgResearch*, *Hamilton*/Ilha Norte - Nova Zelândia, e duas originaram-se de cortes cárneos refrigerados e embalados a vácuo no Brasil.

As amostras de números 1, 11, 12, 13 e 14 são cepas provenientes de culturas registradas e depositadas na Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares – DSMZ (*Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,* Braunschweig, Alemanha): Amostra 1- DSM 8809 *C. estertheticum estertheticum*, 11 - DSM 14204 – *C.frigoris*, 12 - DSM 14205 – *C. lacusfryxellene*, 13 - DSM 14206 – *C. bowmani* e 14 - DSM 14207 – *C.psycroplilum*. A amostra de número 2 foi registrada e depositada na Coleção Americana de Microrganismos e Culturas Celulares – ATCC - 51254 - *Clostridium estertheticum laramiense*.

As demais amostras originaram de isolados de embalagens tufadas e suabes de ambiente de matadouros frigoríficos da Ilha Norte/Nova Zelândia, todos com relatos da ocorrência deste tipo de deterioração. As amostras de número 24 e 25 foram isoladas de embalagens tufadas de carne bovina brasileiras. O pequeno número se deve a dificuldade de isolamento de culturas puras. Essas amostras foram submetidas apenas à técnica de RFLP-PCR.

O Quadro 1 contém as informações relativa a identificação e origem dos isolados e cepas utilizadas no presente estudo.

Quadro 1 – Identificação e origem das amostras utilizadas no presente estudo

Amostras **Cepas e Isolados**	**País**	**Origem**
1 DSM2 8809 *C. estertheticum estertheticum*	Alemanha	Cepas registradas
2 ATCC 51254 *C. estertheticum laramiense*	EUA	Cepas registradas
3 V3 3199	Nova Zelândia	Embalagem tufada - carne de cervo
4 V1 3199	Nova Zelândia	Embalagem tufada - carne de cervo
5 V4	Nova Zelândia	Pele de cervo
6 776	Nova Zelândia	Embalagem tufada - carne de carneiro
7 V7 (D7 panel)	Nova Zelândia	Pele de cervo
8 K21- *C. estertheticum* like	Nova Zelândia	Embalagem tufada – carne bovina
9 K24 – *C. estertheticum* like	Nova Zelândia	Embalagem tufada – carne bovina
10 L6 /Ba	Nova Zelândia	Musculatura interna – carne de carneiro
11 DSM 14204 – *C.frigoris*	Alemanha	Cepas registradas
12 DSM 14205 – *C. lacusfryxellense*	Alemanha	Cepas registradas
13 DSM 14206 – C. *bowmani*	Alemanha	Cepas registradas
14 DSM 14207 – *C. psychrophilum*	Alemanha	Cepas registradas
15 MDe	Nova Zelândia	Suabes de ambiente
16 MCa	Nova Zelândia	Suabes de ambiente
17 MBa	Nova Zelândia	Suabes de ambiente
18 MF1	Nova Zelândia	Suabes de ambiente
19 MDa	Nova Zelândia	Suabes de ambiente
20 Otago Venison	Nova Zelândia	Embalagem tufada – carne de cervo
21 PP4	Nova Zelândia	Embalagem tufada – carne bovina
22 PP5	Nova Zelândia	Embalagem tufada – carne bovina
23 PP5 (2)	Nova Zelândia	Embalagem tufada – carne bovina
24 Br 1	Brasil	Embalagem tufada – carne bovina
25 Br2	Brasil	Embalagem tufada – carne bovina
26 H3 – *C. gasigenes*	Nova Zelândia	Embalagem tufada – carne bovina

Bacteriologia Convencional

Meios de Cultura

O meio de cultura utilizado no enriquecimento foi o caldo pré-reduzido PYGS – Peptone Yeast Extract Glucose Starch (LUND et al., 1990) - que contém, em sua composição, indicador de anaerobiose. Esse caldo foi repicado em atmosfera ideal para crescimento do microrganismo, ou seja, $N_2/H_2/CO_2$ na proporção 85:10:5, respectivamente. No plaqueamento, utilizou-se o Columbia Blood Agar (CBA, Oxoid) contendo 5% de sangue de carneiro.

Protocolo empregado no laboratório de biologia molecular

Foram seguidos os protocolos descritos por HOLDEMAN et al. (1977), BRODA et. al. (1996) e BRODA et al. (1998).

Uma vez no laboratório de microbiologia - seção de cultivo de anaeróbios – as ampolas contendo as cepas liofilizadas, bem como os isolados, foram higienizadas com etanol 70°IMPM e transportadas intactas para o interior do compartimento de recebimento de materiais da câmara de anaerobiose. A manipulação das amostras, o enriquecimento e o plaqueamento foram realizados sob condições de anaerobiose, apresentando 10% de H_2, 5% de CO_2 e 85% de N_2, mistura ideal para o crescimento do *C. estertheticum*. Antes da utilização da câmara, foram rigorosamente realizadas as renovações dos ciclos dos gases seguindo as orientações do fabricante.

As cepas e isolados foram hidratados em 15mL do caldo PYGS e subdivididos em alíquotas de 1,5mL e incubadas a temperatura de 10°C por quatro semanas. Após o período de incubação, com o auxílio de alça descartável esterilizada, calibrada para 10 µL, foram retiradas alíquotas e estriada em ágar sangue de carneiro a 5%. Posteriormente, foram incubadas à temperatura de 10°C por quatro semanas.

Protocolo empregado no laboratório de biologia molecular

Preparo dos isolados e cepas

Todos os isolados/cepas foram submetidos inicialmente ao diagnóstico molecular. Para isso, em condições de anaerobiose, obtida no equipamento Forma Anaerobic System, Modelo - 1025/1029 - apresentando atmosfera de 10% de $H_{2,}$ 5% de CO_2 e 85% de $N_{2,}$ foram pescadas UFCs - unidades formadoras de colônias – e suspendidas em solução salina e, em seguida, encaminhadas ao laboratório de Biologia Molecular.

Técnica de PCR

1° Etapa - Extração do DNA genômico

As amostras foram acondicionadas em Eppendorf com capacidade de 1,5 mL, os quais foram centrifugados a 10.000 rpm/15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 200 μL de tampão TE e lisosima (10μg/mL), e incubado a 37°C por uma hora. A extração foi realizada utilizando o *kit High Pure PCR Template* (Roche^{R}).

2° Etapa - Eletroforese em gel de agarose para avaliação da qualidade e quantificação do DNA genômico

Objetivando a avaliação da integridade e a determinação da concentração do DNA, 2 μL da solução de DNA obtidos de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, a 90 volts (V), durante 40 minutos. O gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,6 μg/mL) na Nova Zelândia e, no Brasil foi utilizado o corante intercalante de ácidos nucléicos, Gel Red Nucleic Acid Stain® (10mg/mL). A visualização do gel e a leitura dos resultados foi efetuada com o auxílio do fotodocumentador Gel Doc XR Bio Rad®, utilizando-se o programa operacional Quantity One.

3° Etapa - *Primers* utilizados nas reações e condições de amplificação

Foram utilizados três pares de *primers* para a detecção de *C. estertheticum*. Um par foi proposto por HELPS et al. (1999), composto pelos *primers forward* RFP (5' TGATCGCATGATCTTAACATCAAAG 3') e *reverse* RRP (5' CGACCCCCGACACCTAGTATT 3'), que se anelam nas posições 173-197 e 813-792, respectivamente, da subunidade 16S do RNAr de *C. estertheticum*, nº de acesso no Banco de dados genéticos GenBank: S46734 (GENBANK, 2007). Utilizando este par de *primers* em protocolo de PCR, obtém-se um produto de amplificação de 641 pares de base (pb).

Foi utilizado também, o par desenhado por BRODA et al. (2003) para a detecção do *C.estertheticum* DSM 8809 e *C. estertheticum* like K21, composto pelos pares 16SEF (5' TCGGAATTTCACTTTGAG 3') e 16SER (5' AAGGACTTCACTCATCTCTG 3'), que se anelam nas posições 207-223 e 996-977, respectivamente, da subunidade 16S do rDNA de *C. estertheticum,* nº de acesso S46734 (GENBANK, 2007). O emprego deste par de *primers* em um protocolo de PCR fornece um produto de amplificação de 790 pb.

O terceiro par empregado neste trabalho, EISRF e EISRR, também foi desenhado por BRODA et al. (2003), com o objetivo de diferenciar o *C. estertheticum* DSM 8809 do *C. estertheticum* like K21. Esse par amplifica um fragmento de 230 pb, composto pela sequência EISRF (5'GTA GAT GTA TTG ACT TCG G 3') e EISRR (5' ACC TAT AAC CAC TCT CGT 3'), que são complementares ao fragmento "*internal transcribed spacer*" da subunidade do 16S-23S rDNA, presente na sequência de DNA do *C. estertheticum* DSM 8809, porém ausente no *C. estertheticum* like.

Para detecção de *C. gasigenes,* empregou-se o par de oligonucleotídeos elaborado por BRODA et al. (2003) 16SDBF *(*5' AGA GGA GTT CTT CGG AAC GA 3') e 16SDBR (5' AAG CSA CTT CCC CAA TTA C 3'). Esses *primers* anelam-se nas posições 61-81 e 995-977, respectivamente, na seqüência gênica de referência do microrganismo (nº de acesso AF092548 e AF143692; GENBANK, 2007), proporcionando a amplificação de 935 pb de fragmentos.

Foram utilizados os protocolos originais, propostos por HELPS et al. (1999) e BRODA et al. (2003), referente às soluções que compuseram as

misturas das reações e das condições do PCR para cada par de *primer,* respectivamente*.*

Nos ciclos de amplificação utilizando os *primers* RFP e RRP (HELPS et al., 1999), as amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 95ºC/5 min, seguindo-se 40 ciclos de desnaturação a 94ºC/1 min, anelamento a 60ºC/1 min e extensão a 72ºC/1 min. Ao final, mais uma fase de extensão a 72ºC/10 min.

Para amplificação com os pares 16SEF/16SER, EISRF/EISRF e 16DBF/16DBR, as amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 93ºC/3 min, seguindo-se 30 ciclos que compreendem desnaturação a 92ºC/1 min, anelamento a 55ºC/1 min e extensão a 72ºC/2min. Ao final, extensão de 72ºC/3min. Em conformidade com o proposto por BRODA et al. (2003).

Após as amplificações, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, com alinhamento inicial de 90 v/10 min e corrida 110 v/45 min, sendo de 100 pb DNA *Ladder* (Invitrogen®) o marcador padrão de peso molecular utilizado. Na Nova Zelândia os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,6 μg/mL), e no Brasil foi utilizado o Gel Red Nucleic Acid Stain® (10mg/mL). A visualização do gel e a leitura dos resultados foi realizada pelo fotodocumentador Gel Doc XR Bio Rad®, utilizando o programa operacional Quantity One®.

As amostras brasileiras que resultaram em amplificações positivas ao PCR, quando utilizados os *primers:* 16SEF/16SER e RFP / RRP, foram submetidas às demais etapas subsequentes de tipagem– RFLP/PCR, por ter sido confirmado o *Clostridium estertheticum* like*.*

Técnica de RFLP - PCR

Inicialmente, para a execução da técnica de RFLP – PCR foi realizada a 1° Etapa – Extração do DNA genômico – descrita anteriormente, seguido pela eletroforese em gel de agarose para avaliação da qualidade e quantificação do DNA genômico. Na 3° Etapa - *Primers* usados nas reações e condições de amplificação – utilizou-se um *primer* universal que conserva as regiões 5` e 3` finais do gene 16S rRNA, cuja sequência foi proposta por HUTSON et, al (1993):

pA (forward) (5’ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3’) e *reverse* pH (5’ AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3’).

O protocolo utilizado para a mistura de reação de PCR – mix – foi proposto por BRODA et al. (2000) conforme descrito no Quadro 2.

QUADRO 2 - Misturas das reações de PCR e concentrações finais dos reagentes, para amplificação do gene 16S rDNA, utilizando *primers* universais.

REAGENTES	**PRIMER pA e pH**
REFERÊNCIA	HUTSON et al. (1993) e BRODA et al. (2003)
TAMPÃO 10X 100MM TRIS-HCL PH 8.3 500MM KCL	5 µL
DNA	100pmol/µl - 0.5 µl
H_20 MiliQ	33,25µL
PRIMERS	0,5 mM
DNTP	2 mM - 5µL
$MgCl_2$	1,5 mM – 0,25µl
TAQ DNA POLIMERASE	0,5µL
VOLUME TOTAL	50µL

Após a amplificação, o produto de PCR foi digerido e fragmentado por 4 enzimas de restrição: *AluI, HaeIII, TaqI* e *CfoI*. O protocolo utilizado para cada enzima de restrição está descrito no Quadro 3 e encontra-se em conformidade com as especificações do fabricante dos reagentes e com a metodologia preconizada por BRODA et al. (2000).

QUADRO 3 - Protocolo de reação utilizado para RFLP-PCR

REAGENTES	**Enzimas de restrição**			
	Alu I	***Hae III***	***Taq I***	***CfoI***
TAMPÃO 10X	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
H_20 MiliQ	7,5μL	7,5μL	7,5μL	7,5μL
PRODUTO DE PCR	10μL	10μL	10μL	10μL
ENZIMA	0,5μL	0,5μL	0,5μL	0,5μL
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	37°C	37°C	69°C	37°C
TEMPO DE INCUBAÇÃO	2 horas	2 horas	2 horas	1hora

Após tratamento térmico – tempo e temperatura conforme Quadro 3 - foram adicionados imediatamente 4,4μL de *stop mix,* em cada tubo*,* com a finalidade de paralisar a reação.

Os produtos digeridos foram separados e visualizados em gel de eletroforese contendo 2,5% de agarose, a 90V, por cerca de 60 minutos.

No Laboratório de Biologia Molecular da Nova Zelândia foi utilizado como corante de ácidos nucléicos solução de brometo de etídeo (0,6 μg/mL) e, no Laboratório de Biologia Molecular do Brasil, foi utilizado o Gel Red Nucleic Acid® Stain (10mg/mL). A visualização foi realizada pelo Gel Doc XR Bio Rad, utilizando-se o programa Quantity One®. O marcador de padrão de peso molecular utilizado foi de 1Kb DNA *Ladder* (Invitrogen®).

Técnica de AFLP

Para a execução da técnica de AFLP, realizou previamente a extração do DNA genômico como descrito anteriormente. Logo após, 5μL do DNA foi digerido pela enzima de restrição *HindIII* (2μl, [10 U /μl]) (*Invitrogen*, Life Technologies) com o respectivo tampão (50mM Tris-HCl [pH 8.0], 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$), por 16 horas a 37°C, conforme protocolo descrito no Quadro 4.

QUADRO 4 - Protocolo da Técnica de AFLP. 1° Passo: *Retriction Digest*

DNA template	5ul
Hind III (1U)	2ul
10 x Enzyme buffer	2ul
Sterile Ultra pure water	11ul
Total Volume	20ul

Os fragmentos que se formaram após a digestão enzimática - 5µl - foram ligados aos "*adapters"* ADH-1 5´ ACG GTA TGC GAC AG 3´ e ADH-2 5´AGC TCT GTC GCA TAC CGT GAG 3`(0.2µg de cada *adapter*), com o auxílio da *T4 DNA ligase* (Invitrogen, life technologies) juntamente ao próprio tampão (50mM Tris-HCl [pH 7.6], 5mM $MgCl_2$, 1mM ATP, 1mM dithiothreitol), conforme protocolo descrito no Quadro 5. O volume final de 20µl foi incubado a temperatura de 20°C por 4 h.

Logo após, a amostra foi aquecida a 80°C por 10 minutos e, diluída 1/5 em água *MiliQ* esterilizada.

QUADRO 5 - Protocolo da Técnica de AFLP. 2° Passo: *Ligation Reaction*

DNA template (digested)	5ul
T4 DNA Ligase (1U)	1ul
5 x Buffer	4ul
Sterile Ultra pure water	9ul
Adapter ADH-1 (0.2ug)	0.5ul
Adapter ADH-2 (0.2ug)	0.5ul
Total Volume	20ul

O terceiro passo da técnica de AFLP obedeceu o protocolo da reação de PCR, conforme Quadro 6.

QUADRO 6 - Protocolo da Técnica de AFLP. 3° Passo: *PCR Reaction*

10 x Buffer (Roche)	5ul
dNTP's (2mM)	5ul
Primer (100pmol/ul) 5` GGT ATG CGACAG AGC TT**N** 3`, sendo **N** substituído por A, C, G e T	1ul
Sterile ultra pure water	34ul
Taq (Roche)	0.25ul
DNA template	5ul
Total Volume	50ul

Logo após o 2° passo da técnica de AFLP, foram realizadas as reações de PCR, onde o *primer* estabelecido para a amplificação foi o 5´ GGT ATG CGA CAG AGC TT**N** 3`, sendo que **N** substitui A, G, C e T.

Primeiramente foi realizado teste utilizando apenas 5 amostras, amplificadas com o *primer* proposto com cada um dos nucleotídeos – A, C, G e T. Os resultados apresentaram melhor performance quando N substituiu C e G, por isso esses foram os resultados utilizados no presente experimento.

As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100, Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc). Após a desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, outros 39 ciclos foram realizados. Cada ciclo consistiu 1 minuto de desnaturação a 94°C, anelamento de 1minuto a 60°C e extensão por 2.5 minutos a 72°C.

Análise dos Dados

Os resultados foram agrupados de acordo com a similaridade e número dos fragmentos gerados. Os géis para construção dos dendrogramas foram analisados visualmente e incluídos e processados pelo programa BioNumerics versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Em todas as imagens, a definição de bandas foi realizada automaticamente pelo programa e depois conferida individualmente, por comparação visual. O coeficiente de similaridade

utilizado foi o de Dice (Dice 1945), baseado na presença e posição de bandas. O dendrograma foi construído utilizando o algoritmo de análise filogenética UPGMA (*Unweighted Pair-Groups Method using Arithmetic Averages*) (SNEATH & SOKAL, 1973). Este algoritmo realiza as análises pelo agrupamento de médias não ponderadas. Os valores de otimização e tolerância utilizados para o conjunto de isolados foram de 0,7 e 1,5%, respectivamente. Um coeficiente de similaridade acima de 80% foi selecionado para definir cada linhagem de isolados (GERTZ et al. 2003, SÁ-LEÃO et al., 2000) e 100% de similaridade para definir grupos ou "*clusters"*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A endonuclease *AluI* promoveu um corte na sequência 5` AG/CT 3` do produto de PCR amplificado com o *primer* universal. Os resultados encontrados quando se utilizou esta enzima de restrição podem ser visualizados na Figura 1. Já a relação genética das cepas/isolados de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos é apresentada na Figura 2. O dendrograma revela alta similaridade geral, o que aponta para uma baixa diversidade entre as cepas quando se emprega *AluI*.

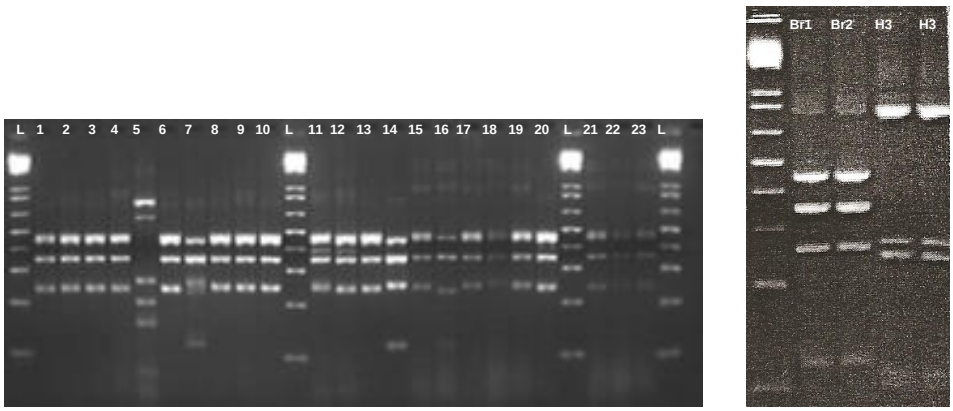

FIGURA 1 – Resultado PCR – RFLP com a enzima *AluI*. L: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 1Kb); 1:*C. estertheticum estertheticum* ; 2: *C. estertheticum laramiense*; 3: V3; 4: V1; 5: V4; 6: 776; 7: V7; 8: K21; 9: K24; 10: L6/Ba; 11: *C. frigoris;* 12: *C. lacusfryxellense;* 13: *Clostridium bowmani;* 14: *C. psychrophilum;* 15: Mde*;* 16: Mca; 17: Mba; 18: MF1; 19; Mda; 20: Otago Venison; 21: PP4; 22: PP5; 23:PP5 2; Br1: Amostra Brasil 1; Br2: Amostra Brasil 2; H3: *C. gasigenes.*

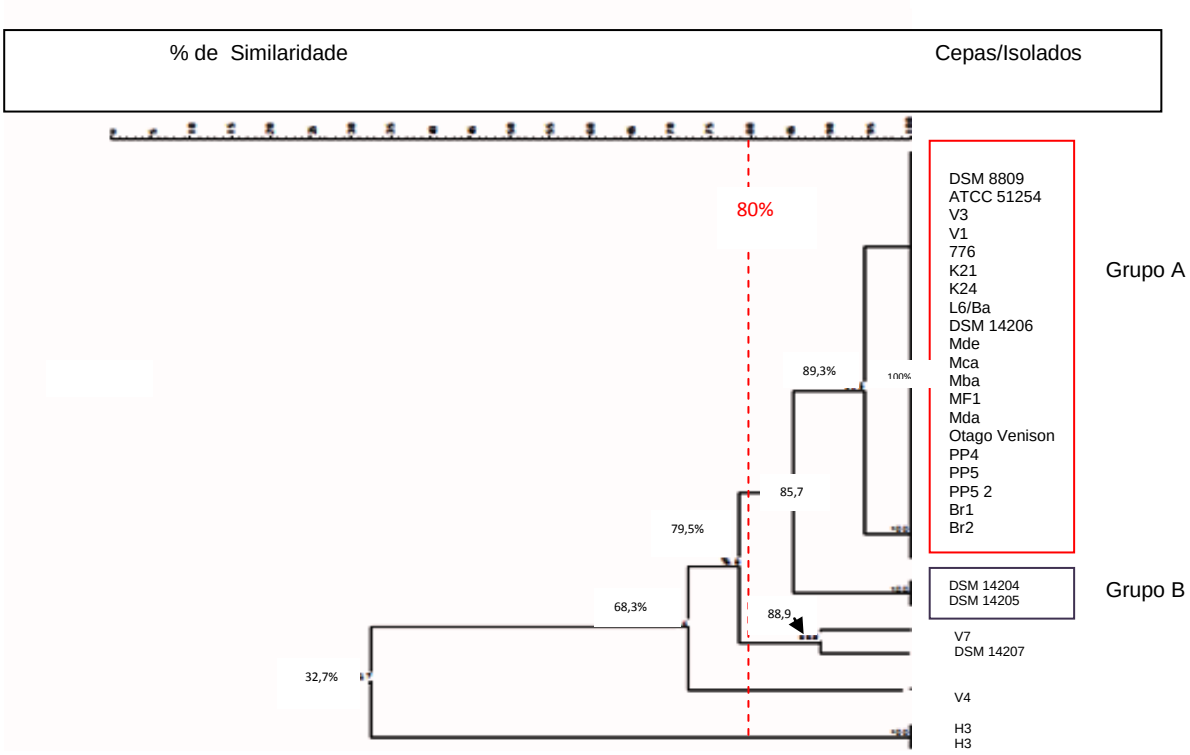

FIGURA 2 – Dendrograma – RFLP com a enzima *AluI*. Apresentando % de similaridade entre as 26 cepas e isolados de culturas puras de carnes deterioradas e ambiente da Nova Zelândia(18) e do Brasil (2). A linha vermelha tracejada indica o valor do *cut-off* de 80% - de similaridade com os grupos ancestrais.

As cepas e isolados de número 1 - DSM 8809 - *C. estertheticum estertheticum* , 2 – ATCC 51254 *C. estertheticum. laramiense*, 3 – V3, 4 – V1, 6 - 776, 8 – K21 *C. estertheticum* like, 9 – K24 *C. estertheticum* like, 10 – L6/Ba, 13 - DSM 14206 *C. bowmani*, 15 – Mde, 16 - Mca, 17 - Mba, 18 – MF1, 19 - Mda, 20 – Otago Venison, 21 – PP4, 22 – PP5, 23 – PP5 2, Br1 e Br2 pertencem ao mesmo "*cluster*", denominado grupo A, ou seja, possuem 100% de similaridade entre elas.

Já as cepas 11 - DSM 14204 *C. frigoris* e 12 - DSM 14205 *C. lacusfryxellense*, são representantes de outro "cluster", denominado grupo B. Os isolados de número 5 – V4, 7 – V7 e a cepa 14 - DSM2 14207 *C.psychrophylum,* não pertencem a nenhum dos dois grupos por isso foram classificados como "*miscellaneos"*, conforme pode ser também observado no Quadro 7.

Quadro 7 – Classificação dos grupos com a utilização da enzima de restrição *AluI*.

Cepas/Isolados	RFLP/ *Alu I*
	Grupos
1 DSM 8809 - *C. estertheticum estertheticum*	A
2 ATCC *C. estertheticum. laramiense*	A
3 V3 (B9 panel)	A
4 V1 (C4 panel)	A
5 V4 (C4 panel)	Misc.
6 776 est. (C3 panel)	A
7 CTC local strain V7 (D7 panel)	Misc.
8 K21 *C. estertheticum* like	A
9 K24 *C. estertheticum* like	A
10 L6 /Ba	A
11 DSM 14204 *C. frigoris*	B
12 DSM 14205 *C. lacusfryxellense*	B
13 DSM 14206 *C. bowmani*	A
14 DSM2 14207 *C.psychrophylum*	Misc.
15 Mde	A
16 Mca	A
17 Mba	A
18 MF1	A
19 Mda	A
20 Otago Venison	A
21 PP4	A
22 PP5	A
23 PP5 (2)	A
24 BR 1	A
25 BR 2	A
26 H3 *C.gasigenes*	Misc.

As Figura 1 e 2 revelam um grande número de componentes do grupo A, representado pelo *Clostridium estertheticum*, visto que, a endonuclease *AluI* não foi capaz de diferenciar as suas subespécies como - *C. estertheticum estertheticum* (amostra1), *C. estertheticum laramiense* (amostra 2), e *C. estertheticum* like (amostra 8 e 9) – além da espécie *Clostridium bowmani.*

O grupo A e B apresentaram 85,7% de similaridade genética, sendo que todos os isolados destes grupos são membros de uma mesma linhagem.

A DSM 14207 (amostra 14) – *C. psychrophilum* apresentou 78,8% de similaridade com os representantes do grupo A e B e 88,9% com a amostra 7 denominada V7.

Os isolados H3 – Clostridium gasigenes apresentaram 32,7% de similaridade genética com as demais cepas e isolados. Já a amostra 5 (V4) apresentou 68,3% de similaridade com os grupos A e B, ou seja, pertencem a

outra linhagem de clostrídio, porém esses resultados não foram aprofundados neste experimento.

A *CfoI* promoveu corte na sequência 5` GCG/C 3`. Os resultados encontrados com a utilização desta enzima de restrição apresentaram os seguintes fragmentos observados na Figura 3.

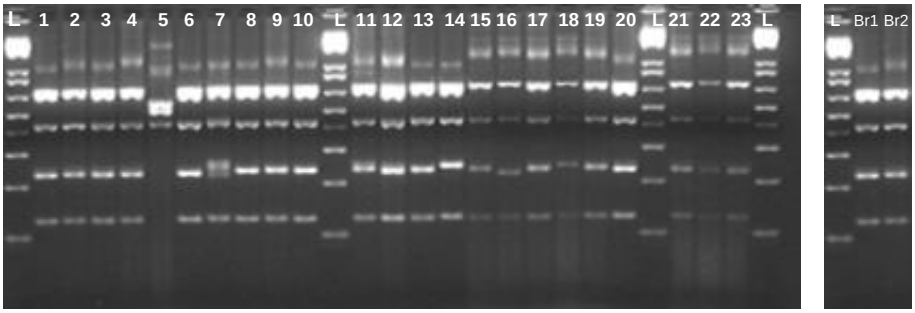

FIGURA 3 – Resultado RFLP – PCR com a enzima *CfoI.* L: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 1Kb); 1:*C. estertheticum estertheticum* ; 2: *C. estertheticum laramiense*; 3: V3; 4: V1; 5: V4; 6: 776; 7: V7; 8: K21; 9: K24; 10: L6/Ba; 11: *C. frigoris;* 12: *C. lacusfryxellense;* 13: *Clostridium bowmani;* 14: *C. psychrophilum;* 15: Mde*;* 16: Mca; 17: Mba; 18: MF1; 19; Mda; 20: Otago Venison; 21: PP4; 22: PP5; 23:PP5 2; Br1: Amostra Brasil 1; Br2: Amostra Brasil 2

A genética das cepas e isolados dos clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos é apresentada na Figura 4. O dendrograma revela a existência de 4 grupos gerados pela enzima.

Assim como a *Alu*I, a enzima de restrição *CfoI* não foi capaz de diferenciar todas subspécies do *Clostridium estertheticum*, principal representante do grupo A. Em decorrência disso, o *C. estertheticum estertheticum* - DSM 8809 (amostra1), *C. estertheticum laramiense* - ATCC (amostra 2), e *C. estertheticum* like (amostra 8 e 9) apresentaram 100% de similaridade, incluindo os isolados e cepas 3 – V3, 4 – V1 e 6 – 776, conforme ilustrado na Figura 4.

O grupo B representado pelas cepas 13 e 14 correspondentes às DSM 14206 - *C. bowmani* e DSM 14207 – *C. psychrophilum*, e apresentou 79,5% de similaridade com o grupo A.

Os isolados de suabe de ambiente Mde, Mba, MF1, Mca e Mda e os isolados PP4, PP5, PP52 possuem 100% de similaridade entre eles e são representantes de outro "*cluster*", denominado grupo C e que apresenta "*cut-off*" de 62,4% com os demais grupos.

A amostra 5 (V4), provavelmente, pertence a outra linhagem de clostrídio, pois, apresentou 23,1% de similaridade com os grupos A, B e C.

As amostras de número 5, 7 e 11 não pertencem a nenhum dos grupos citados, por isso, foram classificados como "*miscellaneos"*, conforme observado no Quadro 8.

A amostra 11 - DSM 14204 *C. frigoris* apresentou 90,9% de similaridade com os representantes do grupo A, 79,5% com o grupo B, 48,6% com o grupo C e 90.9% com a DSM 14205.

Quadro 8 – Classificação dos grupos com a utilização da *CfoI.*

Cepas/Isolados	RFLP/ Cfo I
	Grupos
1 DSM 8809 - *C. estertheticum estertheticum*	A
2 ATCC *C. estertheticum laramiense*	A
3 V3 (B9 panel)	A
4 V1 (C4 panel)	A
5 V4 (C4 panel)	MISCEL.
6 776 est. (C3 panel)	A
7 CTC local strain V7 (D7 panel)	MISCEL.
8 K21 *C. estertheticum* like	A
9 K24 *C. estertheticum* like	A
10 L6 /Ba	A
11 DSM 14204 *C. frigoris*	MISCEL.
12 DSM 14205 *C. lacusfryxellense*	A
13 DSM 14206 *C. bowmani*	B
14 DSM2 14207 *C.psychrophylum*	B
15 Mde	C
16 Mca	C
17 Mba	C
18 MF1	C
19 Mda	C
20 Otago Venison	A
21 PP4	C
22 PP5	C
23 PP5 (2)	C
24 BR 1	A
25 BR 2	A

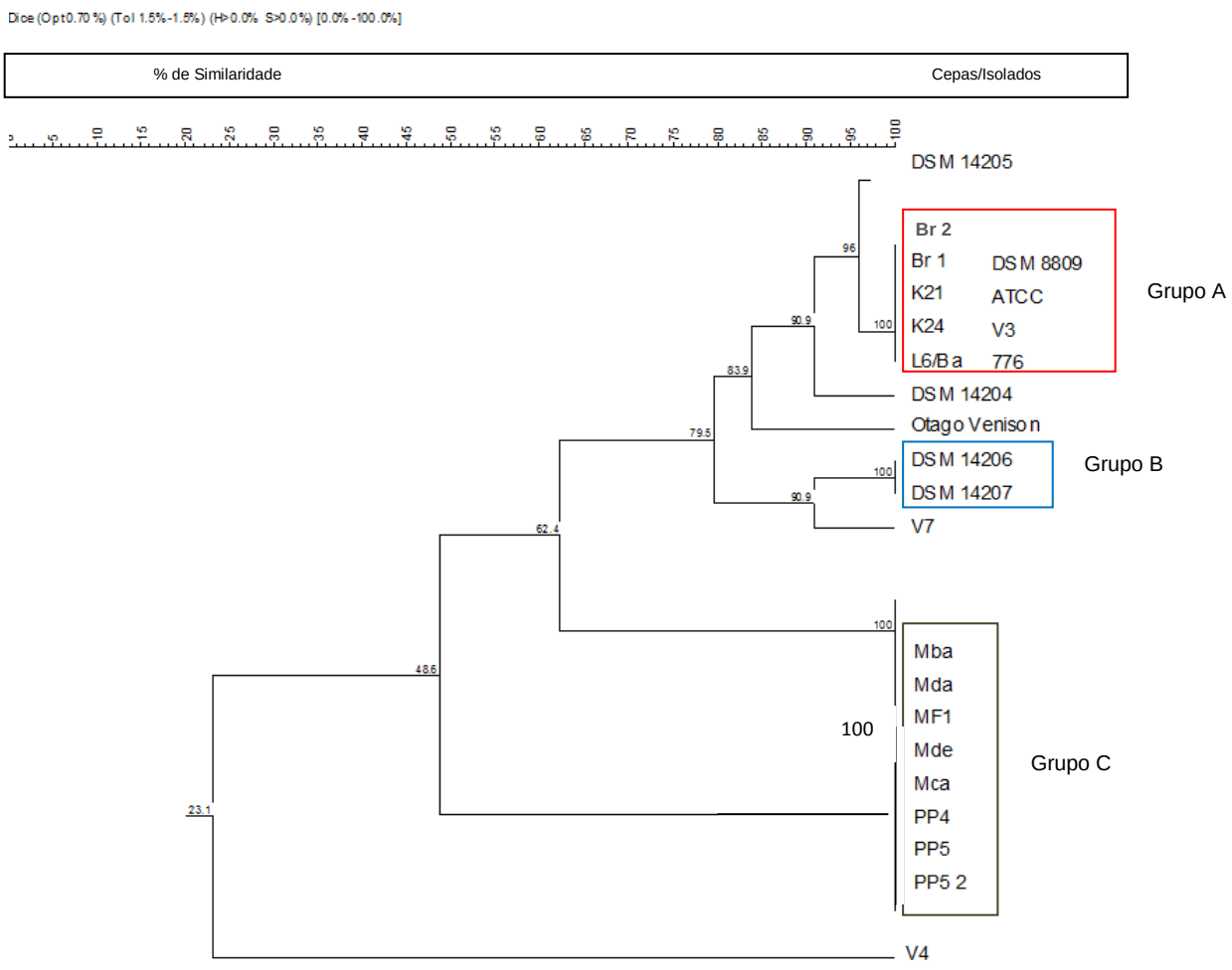

FIGURA 4 – Dendrograma – RFLP com a enzima *CfoI*. Apresentando % de similaridade entre as 26 cepas e isolados de culturas puras de carnes deterioradas e ambiente da Nova Zelândia(18) e do Brasil (2). A linha vermelha tracejada indica o valor do *cut-off* de 80% - de similaridade com os grupos ancestrais.

A *HaeIII* promoveu corte na sequência 5` GG/CC 3` do produto de PCR. A similaridade entre os isolados foi comparada de acordo com os fragmentos gerados pela enzima de restrição *HaeIII* e os resultados agrupados conforme Figuras 5 e 6 e Quadro 9.

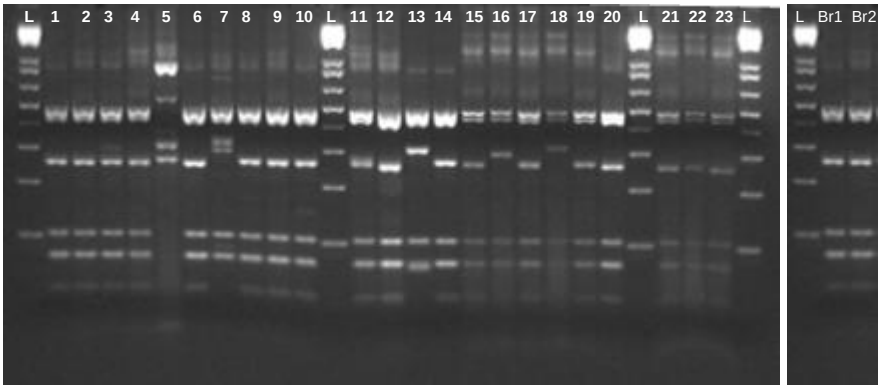

FIGURA 5 – Resultado PCR – RFLP com a enzima Hae III. L: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 1Kb); 1:*C. estertheticum estertheticum* ; 2: *C. estertheticum laramiense*; 3: V3; 4: V1; 5: V4; 6: 776; 7: V7; 8: K21; 9: K24; 10: L6/Ba; 11: *C. frigoris;* 12: *C. lacusfryxellense;* 13: *Clostridium bowmani;* 14: *C. psychrophilum;* 15: Mde*;* 16: Mca; 17: Mba; 18: MF1; 19; Mda; 20: Otago Venison; 21: PP4; 22: PP5; 23:PP5 2; Br1: Amostra Brasil 1; Br2: Amostra Brasil 2

Os resultados encontrados quando se utiliza esta enzima de restrição apresentam maior variedade de fragmentos, quando comparadas às demais enzimas, e obteve maior variação entre os demais isolados. Mesmo demonstrando estas características, não foi capaz de diferenciar as subspécies do *Clostridium estertheticum*, principal representante do grupo A. O *C. estertheticum estertheticum* - DSM 8809 (amostra1), *C. estertheticum laramiense* - ATCC (amostra 2), e *C. estertheticum* like (amostra 8 e 9) possuem "*cut-off"* de 100%. Pertencem também a esse grupo as amostras 3 – V3, 4 – V1, 6 - 776, 10 – L6/Ba, 20 – Otago Venison, Br 1 e Br 2.

O Grupo B, foi composto pelas amostras de suabes de ambiente MBa, MCa, MDa, MDe, MF1, PP4 PP5 e PP52, também apresentam "*cut-off"* de 100%.

Já as amostras pertencentes a outras espécies de *Clostridium* psicrofílicos e psicrotróficos, foram todas diferenciadas com a utilização da endonuclease *HaeIII*: a) DSM 14204 (amostra 11) – C. frigoris e DSM 14205 (amostra 12) - *C. lacusfryxellense*, apresentaram 86,7% de similaridade entre o grupo A e 72,5% entre o grupo B; b) DSM 14206 (amostra 13) – C. *bowmani* e DSM 14207(amostra 14) - *C. psychrophilum,* apresentaram 76,4% de similaridade entre o grupo A e 72,5% entre o grupo B.

A amostra 5 (V4) apresentou 40,1% de similaridade entre os grupos A, B. Já a amostra 7 (V7) apresentou 63,7% de similaridade. As amostras de número 5, 7,11, 12, 13 e 14 não pertencem a nenhum dos grupos citados, por isso, foram

classificados como “*miscellaneos”*, conforme pode ser visualizado no Quadro 6 e na Figura 6.

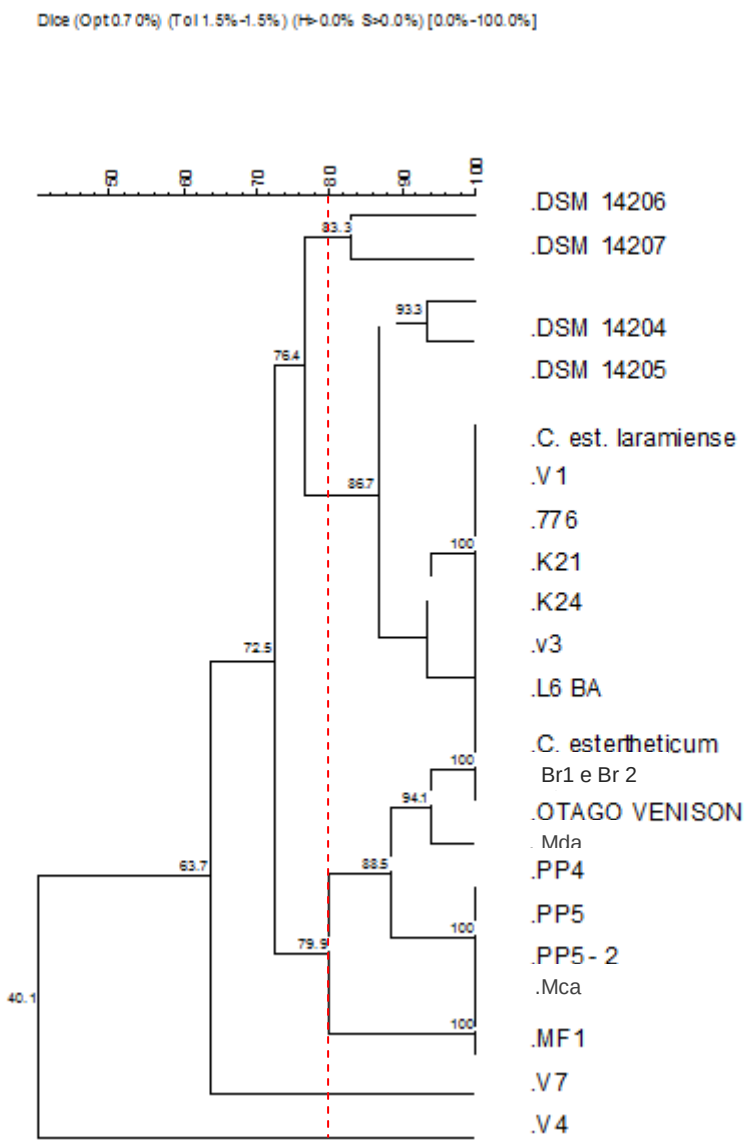

FIGURA 6 – Dendrograma – RFLP com a enzima *HaeIII*. Apresentando % de similaridade entre as 26 cepas e isolados de culturas puras de carnes deterioradas e ambiente da Nova Zelândia(18) e do Brasil (2). A linha vermelha tracejada indica o valor do *cut-off* de 80% - de similaridade com os grupos ancestrais.

Quadro 9 – Classificação dos grupos com a utilização da *HaeIII*.

Cepas/Isolados	RFLP HaeIIII
1 DSM 8809 - *C. estertheticum estertheticum*	A
2 ATCC *C. estertheticum laramiense*	A
3 V3 (B9 panel)	A
4 V1 (C4 panel)	A
5 V4 (C4 panel)	MISCEL.
6 776 est. (C3 panel)	A
7 CTC local strain V7 (D7 panel)	MISCEL.
8 K21 *C. estertheticum* like	A
9 K24 *C. estertheticum* like	A
10 L6 /Ba	A
11 DSM 14204 *C. frigoris*	MISCEL.
12 DSM 14205 *C. lacusfryxellense*	MISCEL.
13 DSM 14206 *C. bowmani*	MISCEL.
14 DSM2 14207 *C.psychrophylum*	MISCEL.
15 Mde	B
16 Mca	B
17 Mba	B
18 MF1	B
19 Mda	B
20 Otago Venison	A
21 PP4	B
22 PP5	B
23 PP5 (2)	B
24 BR 1	A
25 BR 2	A

A *TaqI* endonuclease promoveu um corte na sequência 5`T/CGA 3`. Os resultados encontrados com a utilização desta enzima de restrição proporcionaram a variedade de bandas que pode ser visualizada na Figura 7.

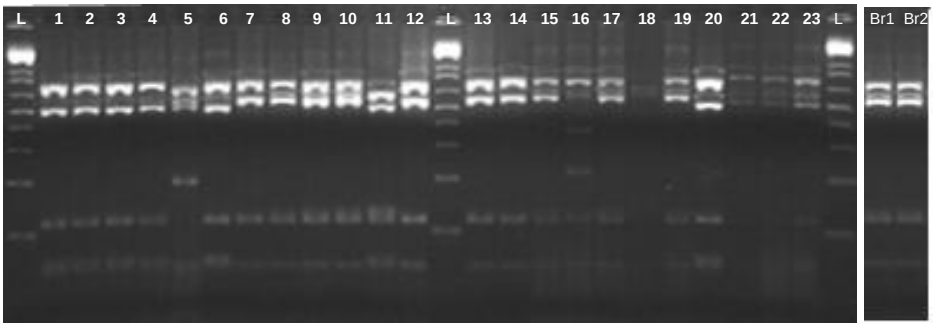

FIGURA 7 – Resultado RFLP - PCR com a enzima *TaqI*. L: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 1Kb); 1:*C. estertheticum estertheticum* ; 2: *C. estertheticum laramiense*; 3: V3; 4: V1; 5: V4; 6: 776; 7: V7; 8: K21; 9: K24; 10: L6/Ba; 11: *C. frigoris;* 12: *C. lacusfryxellense;* 13: *Clostridium bowmani;* 14: *C. psychrophilum;* 15: Mde*;* 16: Mca; 17: Mba; 18: MF1; 19; Mda; 20: Otago Venison; 21: PP4; 22: PP5; 23:PP5 2; Br1: Amostra Brasil 1; Br2: Amostra Brasil 2

A *TaqI* foi a única enzima capaz de diferenciar as subespécies *C. estertheticum estertheticum* e *C. estertheticum laramiense* do *C. estertheticum* like. Além do que, a amostra 8 - K21 demonstrou 100% de similaridade com as amostras 10 - L6/Ba, 9 - K24, Br 1 e Br 2 – Grupo B.

O grupo A foi composto pelo *Clostridium estertheticum estertheticum* - DSM 8809 (amostra1), o *Clostridium estertheticum laramiense* - ATCC 51254 (amostra 2), V3 (amostra 3), V1 (amostra 4), 776 (amostra 6), Otago Venison (amostra 20), PP4 (amostra 21), PP5 (amostra 22), PP5 2 (amostra 23).

As amostras 12, 13 e 14 - DSM 14205, 14206 e 14207 – formaram o grupo C e apresentaram 82,6% de similaridade com o grupo A e 85,7% com B.

As amostras de suabe MDe, MBa, MF1e MDa apresentaram 100% de similaridade entre elas e são os componentes do grupo D

Já a DSM 14204 - *C.frigoris,* apresentou 86% de similaridade com o grupo A e 82,6% com B e C, e 75,1% com o grupo D.

A similaridade entre os isolados foi comparada de acordo com as Figuras 5 e 8 os resultados agrupados conforme Quadro 10.

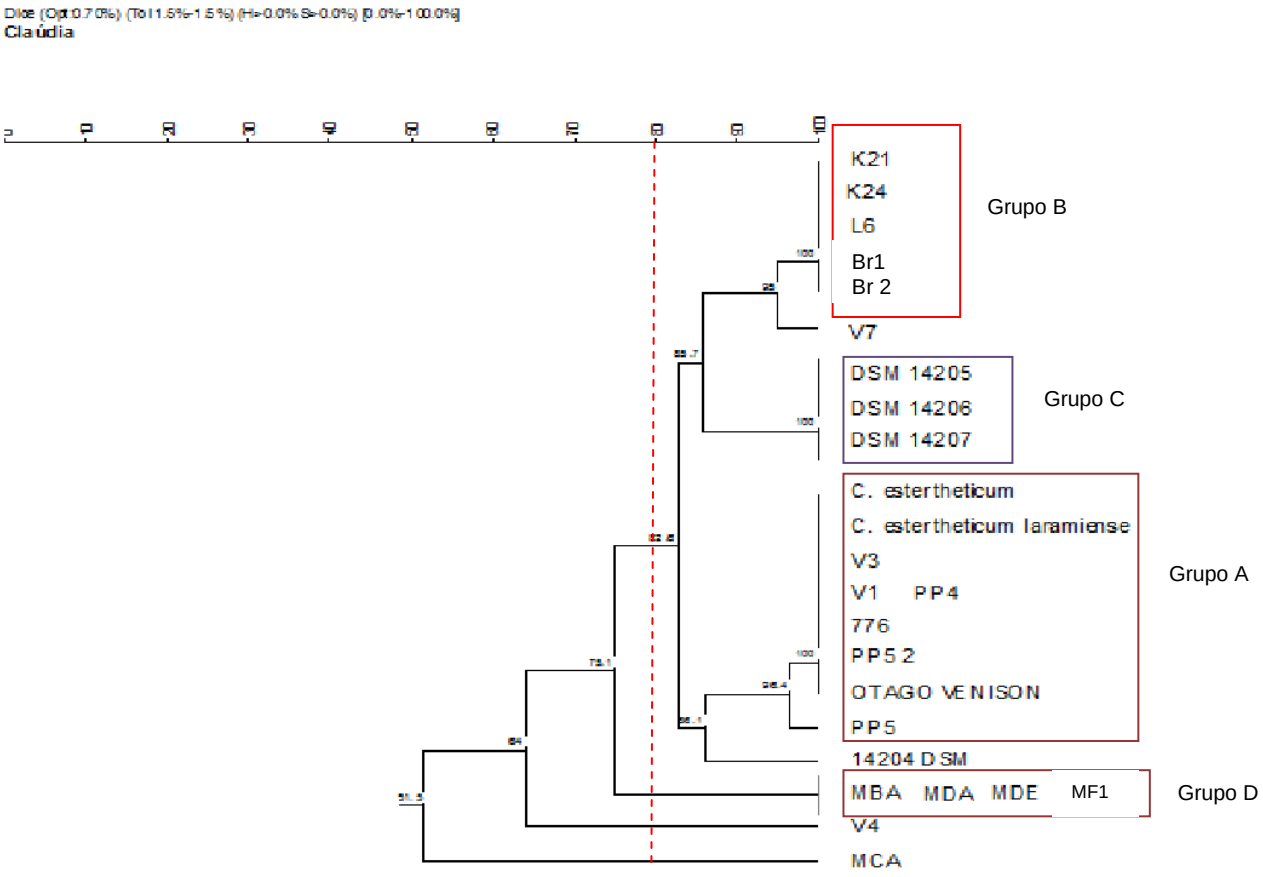

FIGURA 8 – Dendrograma – RFLP com a enzima *TaqI*. Apresentando % de similaridade entre as 26 cepas e isolados de culturas puras de carnes deterioradas e ambiente de matadouros-frigorífico da Nova Zelândia(18) e do Brasil (2). A linha vermelha tracejada indica o valor de *cut-off* de 80% - similaridade com os grupos ancestrais.

Quadro 10 – Classificação dos grupos com a utilização da *TaqI*.

Cepas e Isolados	RFLP/ Taq I Grupos
1 DSM 8809 - *C. estertheticum estertheticum*	A
2 ATCC *C. estertheticum laramiense*	A
3 V3 (B9 panel)	A
4 V1 (C4 panel)	A
5 V4 (C4 panel)	MISCEL.
6 776 est. (C3 panel)	A.
7 CTC local strain V7 (D7 panel)	MISCEL.
8 K21 *C. estertheticum* like	B
9 K24 *C. estertheticum* like	B
10 L6 /Ba	B
11 DSM 14204 *C. frigoris*	MISCEL.
12 DSM 14205 *C. lacusfryxellense*	C
13 DSM 14206 *C. bowmani*	C
14 DSM2 14207 *C.psychrophylum*	C
15 Mde	D
16 Mca	MISCEL.
17 Mba	D
18 MF1	D
19 Mda	D
20 Otago Venison	A
21 PP4	A
22 PP5	A
23 PP5 (2)	A
24 BR 1	B
25 BR 2	B

A técnica de AFLP apresentou maior poder discriminatório entre as espécies e subespécies de *Clostridium* psicrofílicos e psicrotróficos. Algumas amostras foram testadas, inicialmente, utilizando-se na terceira etapa da técnica de AFLP, os 4 pares de *primers* - 5 ´GGT ATG CGA CAG AGC TT**N** 3`, sendo N igual a A, C, G e T, porém, os resultados mais relevantes e que apresentaram maior qualidade dos fragmentos gerados foram proporcionados pelos *primers* das bases C e G. Por isso,somente esses resultados foram citados no presente estudo.

Os resultados da amplificação com o *primer* 5´ GGT ATG CGA CAG AGC TT**C** 3` revelaram similaridade geral de 42%, o que aponta para uma alta diversidade entre as cepas e isolados como pode ser visualisado nas Figuras 9 e 10.

O *Clostridium estertheticum estertheticum* - DSM 8809 o *Clostridium estertheticum laramiense* - ATCC 51254 apresentaram "*cut-off*" de 54,5%.

O grupo A foi representado pelas amostras 1- DSM 8809, 3 - V3, 4 – V1, 5 – 776, 7 – PP4 e amostra Otago Venison, representado pelo número 6 da Figura 9.

O *C. estertheticum estertheticum* e o *C. estertheticum* like apresentaram "*cut-off*" de 66,8%. As DSM 14204 – *C. frigoris* e 14207 – *C. psychrophilum* demonstraram "*cut-off*" 51,3%. Já a similaridade entre as DSM 14204 - *C. frigoris*, 14205 – *C. lacusfryxellense* foi de 47,8%. Os resultados dos suabes de ambiente mostraram variações entre eles e similaridade de 47,8% com o *Clostridium estertheticum* like e Grupo A. Os isolados K21, K24 apresentaram 90,9% de similaridade.

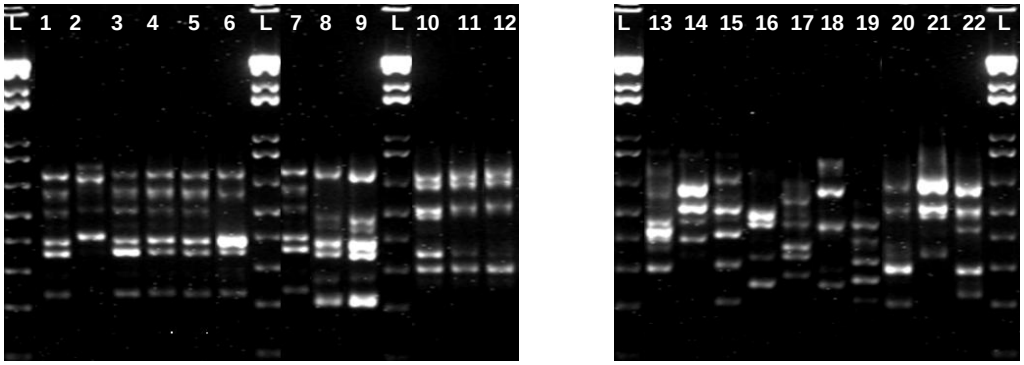

FIGURA 9 – Resultado AFLP - 5 ´GGT ATG CGA CAG AGC TTN 3`, sendo N igual C. L: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 1Kb);1:*C.estertheticum*; 2:*C. estertheticum laramiense*; 3: V3; 4: V1; 5: 776; 6: Otago Venison; 7: PP4; 8: PP5; 9: PP5 2; 10: K21; 11: K24; 12: L6/Ba; 13: V7; 14: *C. frigoris*; 15: *C. lacusfryxellense;* 16: *C. bowmani;* 17: *C.psychrophylum;* 18: Mca; 19: MF1; 20: Mde; 21: Mba; 22: Mda

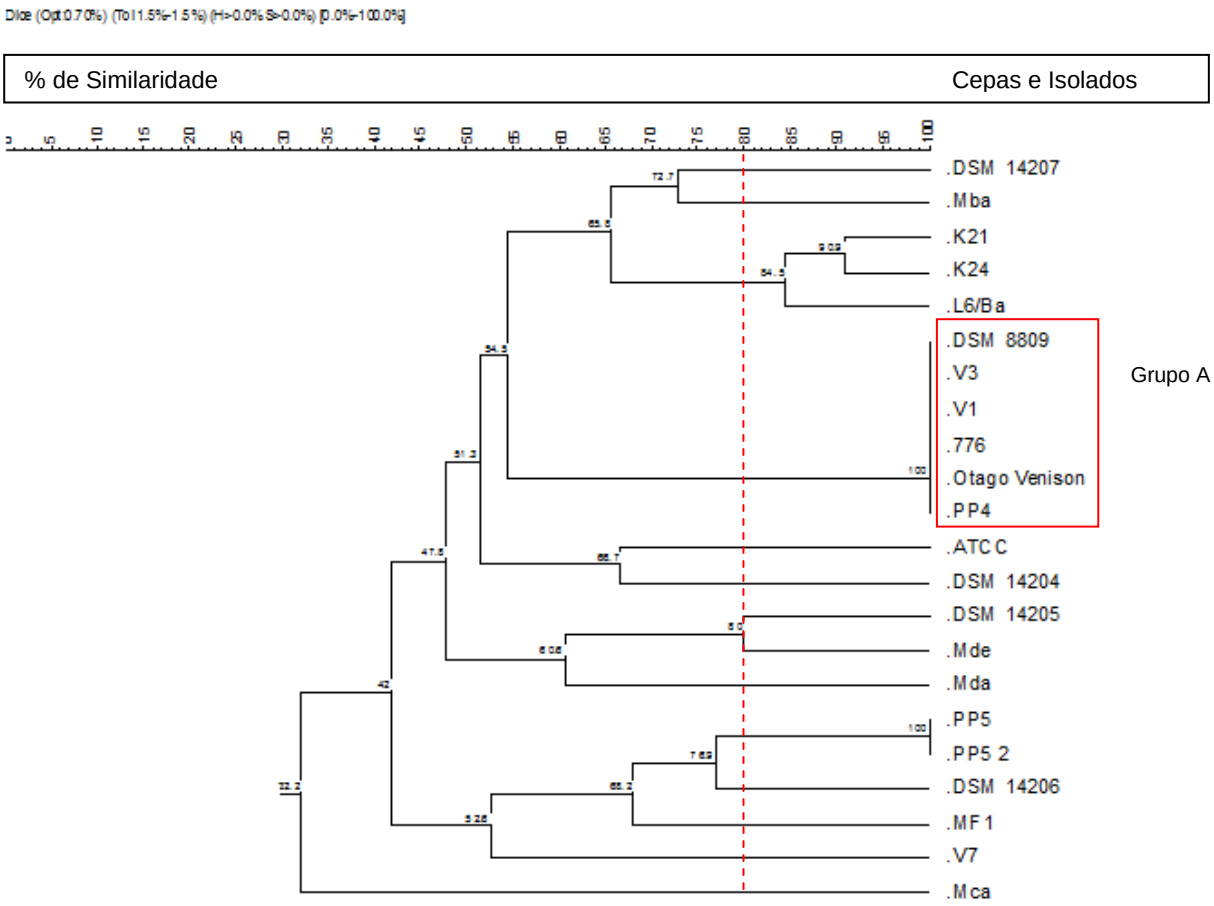

FIGURA 10 – Dendrograma – AFLP – sendo N=C. Apresentando % de similaridade entre as 24 cepas e isolados de culturas puras de carnes deterioradas e ambiente de matadouros-frigorífico da Nova Zelândia. A linha vermelha tracejada indica o valor de *cut-off* de 80% - similaridade com os grupos ancestrais.

Os resultados encontrados quando utilizado o *primer* 5 ´GGT ATG CGA CAG AGC TT**N** 3`, sendo N igual G pode ser visualizado nas Figuras 6 e 7.

O grupo A foi representado pelas amostras DSM 8809, V3 e V1, que continuaram apresentando "*cut off"* de 100%.

O grupo A apresentou similaridade de 47,2% com *Clostridium estertheticum laramiense* - ATCC 51254. O *C. estertheticum estertheticum* e o *C. estertheticum* like apresentaram "*cut-off*" de 43,5% e as DSM 14204 – *C. frigoris* e 14207 – *C. psychrophylum* "*cut-off*" 43,4%.

Já a similaridade entre as DSM 14206 – *C. bowmani* e 14207 foi de 50,5%. O *Clostridium estertheticum* like K21 apresentaram 60% de similaridade com as DSM 14205 – *C. lacusfryxellense* e 50,5% com a DSM 14206 e DSM 14207. Os resultados dos suabes de ambiente mostraram grandes variações

entre eles e similaridade de 43,4% com o *Clostridium estertheticum* like. Os isolados K21 e K24 apresentaram 88,9% de similaridade.

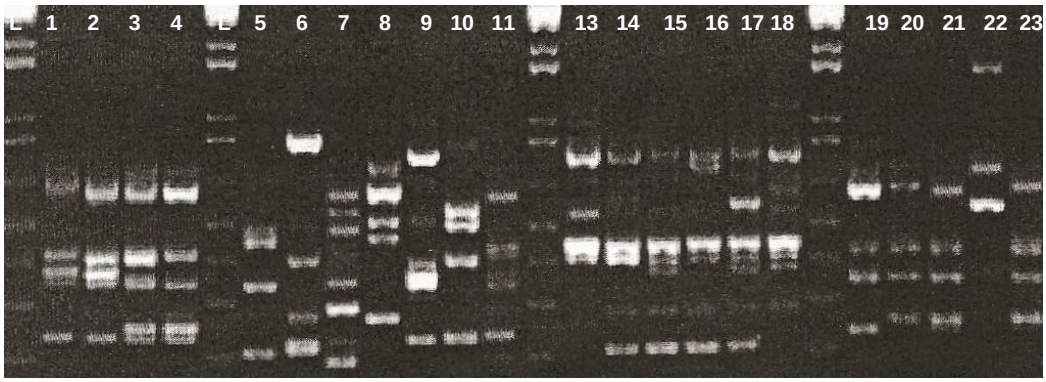

FIGURA 11 – Resultado AFLP - 5´GGT ATG CGA CAG AGC TT**N** 3`, sendo N igual G. L: marcador de peso molecular (DNA *ladder* 1Kb); 1: PP5 2; 2: PP5; 3: PP4; 4: Otago Venison; 5: MF1; 6: *C.psychrophylum*; 7: *C. bowmani*; 8: *C. lacusfryxellense*; 9: *C. frigoris*; 10: V7; 11: V4; 12: L6/Ba; 13: Mba; 14:Mda; 15:Mde; 16:L6/Ba; 17: K21; 18: K24; 19: 776; 20: V3; 21: V1; 22: *C. estertheticum laramiense*; 23: *C.estertheticum*

Quadro 11 – Classificação dos grupos com a utilização do AFLP

Isolate	AFLP Primer C / Primer G Grupos
1 DSM 8809 - *C. estertheticum estertheticum*	A/A
2 ATCC *C. estertheticum laramiense*	MISCEL
3 V3 (B9 panel)	A/A
4 V1 (C4 panel)	A/A
5 V4 (C4 panel)	MISCEL.
6 776 est. (C3 panel)	A/A
7 CTC local strain V7 (D7 panel)	MISCEL.
8 K21 *C. estertheticum* like	B/B
9 K24 *C. estertheticum* like	B/B
10 L6 /Ba	B/B
11 DSM 14204 *C. frigoris*	MISCEL.
12 DSM 14205 *C. lacusfryxellense*	MISCEL
13 DSM 14206 *C. bowmani*	MISCEL
14 DSM2 14207 *C.psychrophylum*	MISCEL
15 Mde	MISCEL
16 Mca	MISCEL
17 Mba	MISCEL
18 MF1	MISCEL
19 Mda	MISCEL
20 Otago Venison	MISCEL
21 PP4	MISCEL
22 PP5	C
23 PP5 (2)	C

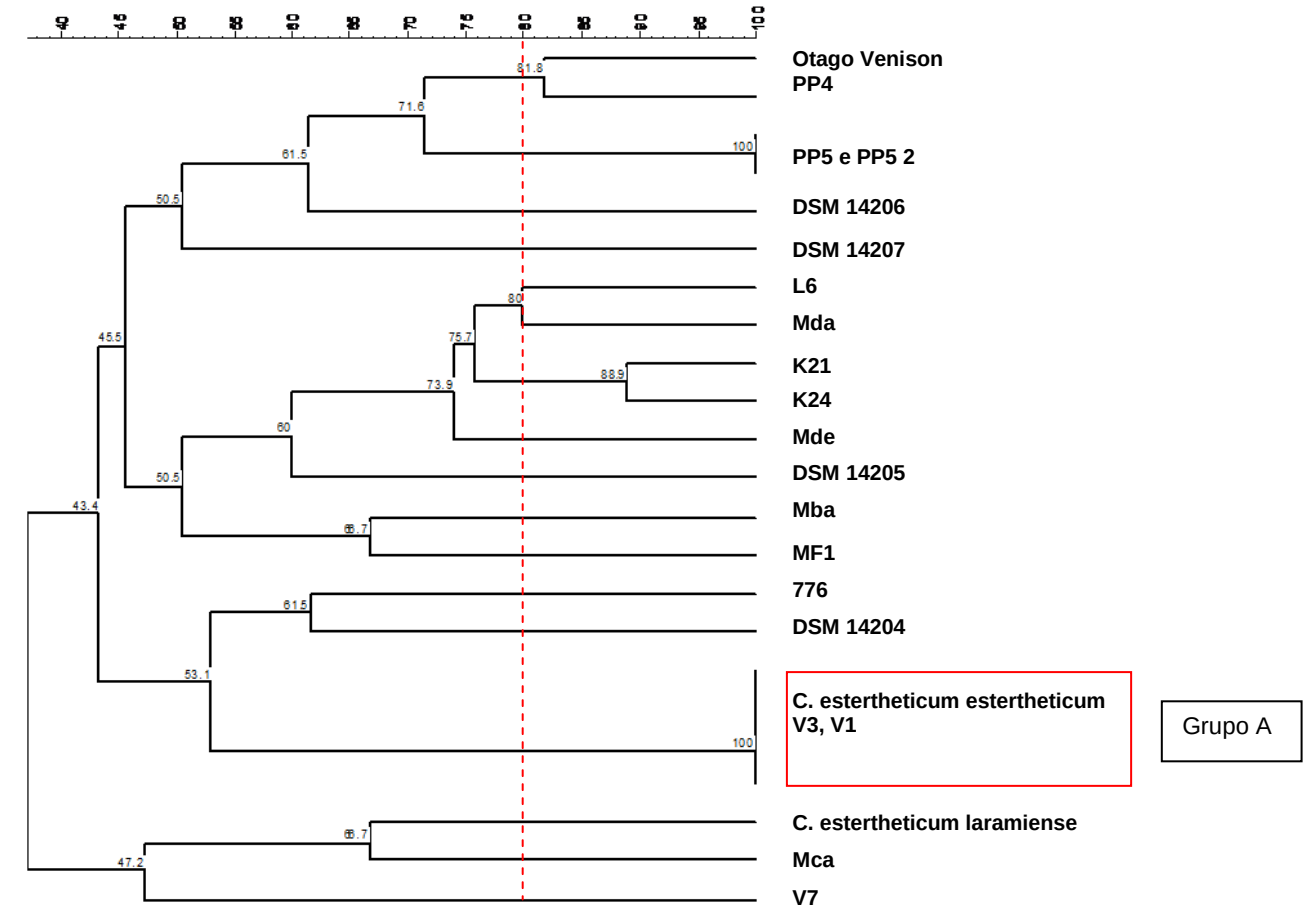

FIGURA 12 – Dendrograma – AFLP – sendo N=G. Apresentando % de similaridade entre as 24 cepas e isolados de culturas puras de carnes deterioradas e ambiente de matadouros-frigorífico da Nova Zelândia. A linha vermelha tracejada indica o valor de *cut-off* de 80% - similaridade com os grupos ancestrais.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo conclui-se:

- A técnica de AFLP é capaz de diferenciar 100% das **espécies** – *C. estertheticum, C. frigoris, C. bowmani, C. lacusfryxellense e C psychrophylum* - e também as **subespécies** - *Clostridium estertheticum estertheticum, Clostridium estertheticum laramiense, Clostridium estertheticum* like K21 e *Clostridium estertheticum* like K24 .

- Quando o conjunto de 4 endonucleases de restrição – *AluI, CfoI, Hae III* e *TaqI*- é utilizado, a técnica de RFLP revela-se bastante discriminatória para **espécies** de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos.

- **Subespécies** do *Clostridium estertheticum* não podem ser diferenciadas pela técnica de RFLP, quando se emprega 3 endonucleases - *AluI, CfoI* e *HaeIII.*

- A enzima de restrição *HaeIII* proporciona maior variedade de fragmentos e capacidade de diferenciar as **espécies** de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos, utilizadas neste estudo.

- A *TaqI* foi a única enzima capaz de diferenciar as **subespécies** *C. estertheticum estertheticum* e *C. estertheticum laramiense* do *C. estertheticum* like.

- As duas amostras brasileiras pertencem ao grupo do *Clostridium estertheticum* like.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

50. AARTS, H., J., M., van LITH, L., A., J., T., KEIJER, J. High – resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP fingerprinting. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.131-135, 1998.

51. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC, O Brasil vende carne com sustentabilidade e mantém a liderança mundial - Brazil Export, 2008. Disponível em: http://www.abiec.com.br. Acesso em: 03 nov. 2008.

52. BOUMEDINE, K., S., RODOLAKIS, A. AFLP allows the identification of genetic markers of ruminant *Chlamydia psittaci* strain useful for typing and epidemiological studies. **Res. Microbiology**, vol. 149, 735-744, 1998.

53. BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portal do MAPA. **Histórico da Cadeia Produtiva de Carne bovina** [oline] 2007. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/. Acesso em: 29 jan. 2008.

54. BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Cordenação Geral de Programas Especiais. Circular n° 175 de 16 de maio de 2005. **Procedimentos de verificação dos programas de auto-controle**. Brasília.

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

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

57. BRODA, D., M., SAUL, D., M., LAWSON, P., A., BELL, R., G., MUSGRAVE, D., R. *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage in vacuum-packed meat. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.107-118, 2000.

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

59. BRODA, D., M., DELACEY, K., M., BELL, R., G., BRAGGINS, T., J., COOK, R., L. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with “Blown pack” spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. **International Journal of Food Microbiology**, *v.*29, p.335-352, 1996.

60. CAVALCANTI, M., A., R., ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC, O Brasil vende carne com sustentabilidade e mantém a liderança mundial - Brazil Export, 2008. Disponível em: http://www.abiec.com.br. Acesso em: 03 nov. 2008.

61. CRANDALL, A., D.; MONTVILLE, T., J. Inhibition of *Clostridium botulinum* growth and toxigenesis in a model gravy system by coinoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection,** v.56, n.06, p.485-488, 1993.

62. DICE, L. R., Measures of the amount of ecological association between species. ***Ecology***, 26 - 297, 1945.
63. DUIM, B., WASSENAAR, T., M., RIGTER, A., WAGENAAR, J. High-resolution genotyping of Campylobacter strain isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. **Appl. Envirom**. **Microbiology**, vol. 65, p. 2369-2375, 1999.

64. FOLKERSTMA, R., T., ROUPPE van der VOORT, J., N., A., M., de GROOT, K., E. Gene pool similarities of potato nematode populations assessed by AFLP analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol. 9, p. 47-54, 1996.

65. GENBANK. Entrez. **Nucleotide.** Capturado em 03 de jan. 2007. On line. Disponível na Internet http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.

66. GEORNARAS, I., KUNENE, N., F., von HOLY, A., HASTINGS, J., W. Amplified fragment length polymosphism fingerprinting of pseudomonas strain from a poultry processing plant. **Appl. Envir. Microbiology**, vol.65, p. 3828-3833, 1999.

67. GERTZ, R. E. J. R., MCELLISTREM, M. C., BOXRUD, D.J., LI. Z, SAKOTA. V., THOMPSON, T. A., FACKLAM, R. R., BESSER, J. M., HARRISON, L. H., WHITNEY, C. G., BEALL, B., Clonal distribution of invasive pneumococcal isolates from children and selected adults in the United States prior to 7-valent conjugate vaccine introduction. **J Clin Microbiol.** vol. 41, p.4194-4216, 2003.

68. GIBSON, J., R., SLATER, E., XERRY, J., TOMPKINS, D., S., OWEN., R., J. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of Helicobacter pylori. **Journal Clin. Microbiology**,vol. 36, p. 2580-2585, 1998.

69. GURTLER, V., WILSON, V., A., MAYALL, B., C, Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. **Journal of General Microbiology**, vol. 137, p. 2673 – 2679, 1991.

70. HELPS, C. R., HARBOUR, D., A., H., CORRY, J., E., L. PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage

en vacuum-packed chill-stored beef. **International Journal of Food Microbiology**, v.52, p.57-65, 1999.

71. HEYNDRICKX, M., VAUTERIN, L., VANDAMME, P., KERSTERS, K., De VOS, P. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 26, p. 247-259, 1996.

72. HOLDEMAN, L., V., CATO, E., P., MOORE, W., E., C. Anaerobe Laboratory Manual, 4th edn, Blacksburg, VA: Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.

73. HUTSON, R., A., THOMPSON, D., E., COLLINS, M., D. Genetic interrelationships of saccharolytic Clostridium botulinum types B, E and F and related clostridia as revealed by small-subunit rRNA gene sequence. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 108, p. 103-110, 1993.

74. HUYS, G., COOPMAN, R., JANSSEN, P., KERSTERS, K. High-resolution genotyping analysis of genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. **International Journal of Systematic Bacteriology**, vol. 4, p. 572-580, 1996. Citado por AARTS et al., 1998.

75. KEIM, P., KALIF, A., SCHUPP, J., HILL, K., TRAVIS, S., E., RICHMOND, K., ADAIR, D., M., HUGH-JONES, M., C., R., JACKSON, P. Molecular evolution and diversity in Bacillus anthracis as detected by amplified fragment length polymorphism markers. **Journal Bacteriology**, vol. 179, p.818-824, 1997.

76. JANSSEN, P., COOPMAN, R., HUYS, G. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, vol. 142, p. 1881-1893, 1996.

77. LIN, J., J., KUO, J., MA, J. A PCR-based DNA fingerprinting technique – AFLP for molecular typing of bacteria. **Nucleic Acids Research**, vol. 24, p. 3649-3650, 1996.

78. LUND, B. M., GRAHAM A. F., GEORGE S. M., BROWN D. The combined effect of incubation temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of non-proteolytic, type B *Clostridium botulinum*. **Journal of Applied Bacteriology,** vol. 69, p.481-492, 1990.

79. McLAUCHLIN, J., RIPABELLI, G., BRETT, M., M., THRELFALL, E., J. Amplified Fragment Lengh Polymorphism (Aflp) Analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 56, p. 21-28, 2000.

80. PICARDEAU, M., PROD`HOM, G, RASKINE, L., LePENNEC, M., P., VICENT, V. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. **Journal of Clin. Microbiology**, vol. 35, p. 25-32, 1997.

81. PUKALL, R., BRAMBILLA, E., STACKEBRANDT, E. Automated fragment length analysis of fluorescently-labeled 16S rDNA after digestion with 4-base cutting restriction enzymes. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 32, p. 55-63, 1998

82. SÁ-LEÃO, R., TOMASZ, A., SANCHES. I.S., BRITO-AVÔ. A, VILHELMSSON. S. E., KRISTINSSON. K. G., DE LENCASTRE. H., Carriage of internationally spread clones of *Streptococcus pneumoniae* with unusual drug resistance patterns in children attending day care centers in Lisbon, Portugal. **J Infect Dis.** vol. 182, p.1153-1160, 2000.

83. SNEATH, P. H. A., & SOKAL, R. R., **Numerical taxonomy**: The principles and practice of numerical classification. San Francisco, W.H Freeman. p 573, 1973.

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

85. STRUELENS, M., J., De GHELDRE, Y., DEPLANO, A., Comparative and library epidemiological typing system. **Infect. Control Hosp. Epidemiology**, vol. 19, p. 565-569, 1998.

86. VAN ELDERE, J., JANSSEN, P., HOEFNAGELS-SCHUERMANS, A., van LIERDE, S., PEETERMANS, W., E. Amplified-fragment length polymorphism analysis versus macro-restriction fragment analysis for molecular typing of *Streptococcus pneumonia* isolates. **J. Clin. Microbiology**. 37, 2053-2057, 1999.

87. VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., van de LEE, T., HORNERS, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.,** v.32, p.4407-4414, 1995.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo dados fornecidos pela FAO e ABIEC, as perspectivas para a cadeia produtiva de carne bovina brasileira em 2009 são promissoras, mesmo com o agravamento da crise internacional, devido a fatores como: a) oferta reduzida da carne; b) abertura de novos mercados; c) preço da carne no mercado externo estável e com perspectiva de aumento. Logo, para atender às exigências do mercado externo, o país vem investindo em programas de qualidade, visando maior controle e segurança na cadeia produtiva da carne. Além disso, o país possui grandes indústrias, que permitem abates em excelentes condições higiênico-sanitárias, habilitadas internacionalmente para exportação.

Apesar de todos os investimentos e cuidados por parte do governo e das indústrias, o Brasil enfrenta alguns entraves de ordem sanitária, sendo a ocorrência de tufamento de embalagens a vácuo de carne refrigerada um dos mais frequentes e preocupantes. Não existem dados conclusivos acerca das perdas econômicas causadas por este tipo de deterioração, mas é inquestionável a sua importância para a cadeia produtiva nacional e internacional. Os prejuízos causados por este tipo de deterioração, além de econômico, são também de credibilidade e confiança devido à depreciação da marca "*Brazilian Beef*".

Assim torna-se de grande importância para a pesquisa nacional a obtenção de um maior número possível de isolados brasileiro visando conhecer as subespécies existentes no Brasil. Ressalta-se que esses isolados devem ser inoculados em cortes cárneos para avaliação da produção de gases. A avaliação de outras técnicas de tipagem também reveste-se de grande valor, pois quanto mais se conhece sobre o agente, mais fácil se torna controlá-lo.

Não restam dúvidas de que os clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos são os microrganismos anaeróbios deteriorantes mais associados aos processos de tufamento de embalagens à vácuo e alteração das carnes refrigeradas, não importando a espécie animal. Logo, os matadouros - frigoríficos são identificados como fonte de contágio destes microrganismos que estão presentes nas fezes dos animais, pele e no ambiente. As partículas do solo impregnadas na pele do animal ou presente nas fezes parecem constituir o reservatório mais importante.

Para as indústrias o diagnóstico rápido e preciso, aliado à medidas de controle viáveis e eficientes constituem metas a serem alcançadas no intuito de evitar os episódios de tufamento de embalagens. O avanço das técnicas moleculares pode atender as necessidades das indústrias, já que o isolamento pela microbiologia convencional requer muito tempo e esforço. Mas, a eficiência do diagnóstico pode ser aumentada por meio do desenho de um novo par de *primers* mais específico do que o proposto por HELPS et al, 1999 – RFP/RFR e mais sensível do que o 16SEF/16SEF e EISRF/EISRR, propostos por BRODA et al, 2003.

Uma vez diagnosticado o microrganismo, medidas de controle devem ser adotadas visando a contenção do agente dentro dos matadouros-frigoríficos e em todos os segmentos da atividade. Devem estar associadas às boas práticas de fabricação e análise de perigos e pontos críticos de controle, porém, essas se tornam ineficientes caso não sejam consideradas como prioridade na rotina dessas indústrias.

Os cuidados higiênicos-sanitários observados antes e durante o abate, o processamento e demais etapas de industrialização são fundamentais para a segurança microbiológica do produto, a fim de se evitar a contaminação cruzada do ambiente para a carne. Higienizações rigorosas com a utilização de sanitizantes em concentrações esporicidas devem fazer parte da rotina das indústrias de alimentos. Pesquisas sobre sanitizantes de ação esporicida são de grande utilidade como medida de controle para as indústrias nacionais e internacionais.

Todavia não se pode ignorar a importância de ações conjuntas desenvolvidas entre laboratórios de pesquisas e de diagnóstico, e às boas práticas de fabricação dentro das indústrias, como medidas efetivas de um programa preventivo e consistente para as indústrias de alimentos.