

## ESTUDO DA DETERIORAÇÃO OCASIONADA POR CLOSTRÍDIOS PSICOTRÓFICOS EM CARNE BOVINA RESFRIADA E EMBALADA A VÁCUO.

THALITA A. OLIVEIRA<sup>1</sup>; MIRIAM MARQUEZINI<sup>2</sup>; MARCELO LANCELLOTTI<sup>3</sup>  
RENATA BROMBERG<sup>4</sup>

Nº 11257

### RESUMO

As carnes bovinas resfriadas embaladas a vácuo produzidas no Brasil são comercializadas também no exterior onde contam com um rígido controle. Com isso uma das maiores preocupações da indústria de carnes brasileira é o controle de bactérias deteriorantes, mais precisamente os clostrídios. A contaminação causada por esses microrganismos deteriorantes provoca um estufamento no filme utilizado para embalar a vácuo a carne, fazendo com que esta se torne pútrida. A contaminação causa impacto negativo às marcas comerciais, além de prejuízos econômicos. Os objetivos deste trabalho foram o de estudar as características da deterioração ocasionada por clostrídios psicrotróficos em carne bovina resfriada embalada a vácuo e também detectar por meio de um método rápido e eficiente a presença destes microrganismos. Neste trabalho verificou-se que o desenvolvimento de *Cl. estertheticum* e conseqüente produção de gás em carne bovina é favorecido pela elevação da temperatura de armazenamento. A concentração de esporos de *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes* teve influência no surgimento do *blown pack* em função da temperatura de incubação. As bacteriocinas 484 e 204 produzidas por bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos mostraram uma ação promissora na inibição da deterioração por produção de gás ocasionada por *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes* em baixas temperaturas de armazenamento. A inoculação realizada com células vegetativas de *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes* ocasionou a produção de gás, porém em quantidades inferiores se comparadas as produzidas pelos esporos nos testes realizados com carne bovina embalada a vácuo. O sanitizante quaternário de amônio nas concentrações de 900ppm e 4.500ppm foi mais eficiente do que o ácido peracético e o hipoclorito de sódio na inibição da germinação dos esporos de *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes*. Nos estudos de detecção molecular dos clostrídios psicrotróficos, apenas o *primer* espécie-específico DBR de *Cl. estertheticum* foi eficiente para a detecção desta cultura. O *primer* SE, específico para *Cl. gasigenes*, não detectou este microrganismo. Um estudo mais aprofundado para se determinar a

razão da não amplificação da sequência genética referente ao *Cl. gasigenes* por seu *primer* específico deverá ser conduzido.

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduanda em Eng. de Alimentos, FAJ, Jaguariúna-SP, thalitaoliveira2@gmail.com

<sup>2</sup> Colaborador: Técnico de Apoio, CTC/ITAL, Campinas-SP, miriam@ital.sp.gov.br

<sup>3</sup> Colaborador: Professor do Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas-SP, mlancell@unicamp.br

<sup>4</sup> Orientadora: Pesquisadora, CTC/ITAL, Campinas-SP, renatab@ital.sp.gov.br

## ABSTRACT

Vacuum-packed chilled beef produced in Brazil is also marketed overseas where it has a strict control. Thus a major concern of the Brazilian meat industry is the control of spoilage bacteria, clostridia more precisely. The contamination produced by these microorganisms causes a vacuum pack distension and the meat becomes putrid. The contamination has a negative impact on trademarks, as well as economic losses. The objectives of this work were to study the characteristics of the deterioration caused by psychrotrophic clostridia in chilled beef packaged under vacuum and also to detect through a rapid and efficient method the presence of these microorganisms. In this work it was found that the development of *Cl. estertheticum* and subsequent gas production in beef is favored by high temperature of storage. The concentration of spores of *Cl. estertheticum* and *Cl. gasigenes* influenced the emergence of “blown pack” according to incubation temperature. The bacteriocins 484 and 204 produced by lactic acid bacteria isolated from meat products showed a promising action in inhibiting the deterioration of gas production caused by *Cl. estertheticum* and *Cl. gasigenes* at low storage temperatures. The inoculation performed with vegetative cells of *Cl. estertheticum* and *Cl. gasigenes* caused the gas production, but in lower amounts compared to those produced by the spores in the tests with vacuum-packed beef. The quaternary ammonium sanitizer in concentrations of 900ppm and 4.500ppm was more effective than peracetic acid and sodium hypochlorite in the inhibition of the spores germination of *Cl. estertheticum* and *Cl. gasigenes*. In studies of molecular detection of psychrotrophic clostridia, only the primer DBR, specific for *Cl. estertheticum* was efficient for the detection of this culture. The primer SE specific for *Cl. gasigenes*, did not detect this microorganism. A further study to determine the reason for the non-amplification of the genetic sequence related to *Cl. gasigenes* should be further conducted.

## INTRODUÇÃO

Para a carne fresca, a embalagem a vácuo comprovou ser eficiente em prolongar a vida útil, preservando as características sensoriais inerentes ao produto durante um período suficientemente longo para seu volume de negócios. Durante a refrigeração, o vácuo permite o aumento da vida útil da carne, evitando a oxidação e o desenvolvimento de microrganismos aeróbios. Dentre os sistemas estabelecidos de acondicionamento de carne, o vácuo é o mais utilizado no mercado institucional para a distribuição de porcionados. A produção de gás em carnes embaladas a vácuo ou *blown pack* é muitas vezes detectada em carnes que sofreram abuso de temperatura no processamento e armazenamento. É fato que, o problema de distensão de embalagens com carne pode ocorrer sem que tenha ocorrido abuso de temperatura, e este tem sido um desafio para a cadeia de produção, processamento e comercialização de carnes.

A deterioração causada por clostrídios psicrófilos e psicrotróficos está associada com a proteólise, perda de textura, acúmulo de líquido nas embalagens acompanhado de um odor desagradável, principalmente de gás sulfídrico.

As bactérias lácticas preservam as carnes por meio da exclusão competitiva com outros microrganismos e também por meio da produção de substâncias inibitórias, incluindo-se as bacteriocinas. A nisina, uma bacteriocina produzida por linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, apresenta amplo espectro de ação. Este composto constitui-se numa bacteriocina tipo lantibiótico (formado por pequenos peptídeos ativos em membranas), possui atividade bactericida sobre muitos microrganismos gram-positivos e previne o crescimento pós-germinativo de esporos, como os de *Clostridium botulinum* (Gould, 1996).

Para isolamento e identificação de *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes* em carnes, o método tradicional é considerado complexo e inespecífico (BRODA *et al.*, 2000). A inserção da técnica de PCR para diagnóstico em alimentos iniciou-se na década de 90, e hoje encontra-se mais difundida, pela redução do tempo de análise frente a métodos tradicionais e, especificidade dos microrganismos detectados. A técnica tornou-se rotina básica dos laboratórios de biologia molecular, após a descoberta da enzima Taq DNA Polimerase. Em si, a importância do PCR é devido a sua sensibilidade ao amplificar pequenas quantidades de DNA em milhões de cópias para seu seqüenciamento, clonagem, diagnóstico e outros (BRODA *et al.*, 2000). Os objetivos desse trabalho foram estudar as características da deterioração ocasionada

por clostrídios psicrotóxicos em meio de cultura e em carne bovina embalada a vácuo. Determinar o potencial inibitório de bacteriocinas sobre a ação dos clostrídios psicrotóxicos em meio de cultura e em carne bovina embalada a vácuo. Avaliar o potencial inibitório de sanitizantes sobre clostrídios psicrotóxicos e detectar por meio de uma técnica de detecção molecular rápida a presença de clostrídios psicrotóxicos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Método de esporulação**

#### **Preparo de esporos**

Os esporos de *Cl. estertheticum*, *Cl. gasigenes* e *Cl. sporogenes* foram preparados conforme a metodologia de MAH *et al.* (2009).

#### **Preparo e quantificação das bacteriocinas**

As culturas de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* e *Lc. lactis* subsp. *hordnae* produtoras das bacteriocinas 204 e 484, foram ativadas em caldo MRS a 30°C por 8 e 12h respectivamente. Após ativação, os caldos brutos das bacteriocinas foram submetidos a choque térmico a 80°C por 5min, sendo em seguida resfriadas em banho com gelo por 5min. O caldo contendo as bacteriocinas após o choque térmico e resfriamento foi centrifugado por 10min a 14.000 rpm a 4°C por 10min e os sobrenadantes contendo bacteriocinas foram utilizados.

A nisina pura apresentava atividade de  $3,2 \times 10^6$ U/g, e a partir da mesma foi preparada uma solução mãe com atividade de  $1,0 \times 10^5$ U/ml a qual foi diluída até  $2,0 \times 10^3$ U/ml e testadas frente a *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes*. Cada poço foi inoculado com 100µL de cada bacteriocina.

A quantificação das bacteriocinas foi determinada pelo método de antagonismo simultâneo em poços segundo TAGG & MCGIVEN (1971), modificado por BENKERROUM *et al.* (1993).

#### **Teste de produção de gás meio de cultura e em carne bovina embalada a vácuo**

Os testes foram realizados com culturas produtoras de gás e *blown pack* (*Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes*).

O meio de carne utilizado no teste de verificação da produção de gás foi preparado de acordo com ROBERTS *et al.* (1981). A emulsão de carne formada, foi distribuída em tubos de 10 x 100mm, em porções de 2mL.

Utilizou-se cortes de contrafilé os quais foram preparados conforme BRIGHTWELL *et al.* (2007) porcionadas em 10g e seladas a vácuo em seladora (Supervac, GK185) com pressão 15atm e acondicionados em sacos termoencolhíveis (Perflex 51 film 4x ½ x 18 taped vácuo).

Em cada tubo contendo 2mL de meio de cultura, foram inoculados 100µL da suspensão do microrganismo a ser testado (na escala de 1MacFarland), estes foram homogeneizados em agitador de tubos tipo vortex e selados com ágar selo a 1,5% e deixados em repouso para solidificação. Os tubos inoculados em triplicata foram incubados nas temperaturas de 4°C, 7°C e 20°C. A leitura dos resultados foi realizada diariamente. Em tubos contendo as células de *Cl. estertheticum*, *Cl. gasigenes*, *Cl. perfringens* e *Cl. sporogenes* foram adicionados em duplicata para cada temperatura 100µL de extrato bruto da bacteriocina 204.

As embalagens contendo as porções de carne foram inoculadas com 1mL da suspensão de células vegetativas *Cl. estertheticum*, *Cl. gasigenes*, *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*, ou solução esporos *Cl. estertheticum*, *Cl. gasigenes* e *Cl. sporogenes*, foram inoculadas com 1mL da bacteriocina 204 e outras com a bacteriocina 484. Junto foram separadas como controle positivo, amostras sem microrganismos, apenas cortadas e seladas a vácuo. As embalagens foram incubadas em três temperaturas 0°C, 4°C e 7°C, e a leitura de avaliação do grau de deterioração foi realizada leitura diariamente baseada na escala de classificação.

#### **Avaliação da eficácia de sanitizantes sobre clostrídios psicrotróficos**

Avaliou-se a ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio, ácido peracético e quaternário de amônio na inibição da germinação de esporos de *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes*. Para tanto utilizou-se a metodologia descrita por WULT *et al.* (2003).

#### **Técnicas moleculares de detecção de clostrídios psicrotróficos**

Avaliaram-se alguns *primers* com o intuito de se detectar os clostrídios psicrotróficos frente a 15 culturas de bactérias produtoras de gás e de *blown pack*. Foram testados na corrida de PCR os *primers* ERIC, Universal 27F, e as sequências de *primers* DBR e SE descritas por BRODA *et al.*, (2003).

Para a extração de DNA foram retiradas alíquotas de 1mL dos tubos das cepas ativas produtoras de gás e *blown pack*. Estes foram centrifugadas a 12.000rpm por 5min. O sobrenadante foi descartado e o inóculo foi ressuspensionado em 200µL de água destilada estéril e a seguir estes foram congelados em ultrafreezer a -80°C por 10min. Em seguida os tubos com os inóculos foram submetidos à fervura a 98°C por 5min em

banho seco e amplificados em termociclador (Bioer Gene Pro Thermal Cycler). Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1x, pH 8,0, em cuba de eletroforese (Electrophoresis Power Supply; Loccus Biotecnologia) com corrida a 100V por 30min.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de viabilidade da bacteriocina mediante a concentração em rotavapor notou-se que a bacteriocina 204 apresentou queda na atividade, passando de  $8 \times 10^2$  na amostra sem concentrar para  $2,0 \times 10^2$ . Já a bacteriocina 484 apresentou elevação na atividade, passando de  $4,0 \times 10^2$  para  $6,0 \times 10^2$ .

No teste de determinação do grau de deterioração com células vegetativas em meio de cultura observou-se que nas amostras com ou sem a bacteriocina incubadas na temperatura de 4°C não houve produção de gás durante os 119d de observação. A 7°C a bacteriocina 204 conseguiu postergar a produção de gás ocasionada por *Cl. gasigenes*. A produção de gás ocasionada por *E. coli*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *Pr. mirabilis*, *Lc. latis* e *Lb. plantarum* foi intensificada com a elevação da temperatura de estocagem. Observou-se que as bacteriocinas 204 e 484 foram inibitórias a produção de gás por células vegetativas de *Cl. estertheticum* nas temperaturas testadas. Segundo YANG *et al.* (2010) em estudo realizado com inoculação de *Cl. estertheticum* junto de *Leuconostoc mesenteroides*, as bactérias lácticas preveniram o desenvolvimento da deterioração de carnes embaladas a vácuo.

O grau de distensão ocasionada por esporos de *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes* mostra que, as bacteriocinas 204 e 484 não foram eficazes para controlar a deterioração ocasionada pelos esporos dos clostrídios psicrotróficos testados em carnes embaladas á vácuo.

O sanitizante a base de quaternário de amônio, apresentou o melhor resultado dentre os sanitizantes, com uma redução de 8 ciclos Log de *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes*.

O *primer* Universal 27F amplificou ambos os clostrídios psicrotróficos. O *primer* ERIC, por sua vez, amplificou o *Cl. gasigenes* porém não o *Cl. estertheticum*. Quando utilizou-se os *primers* espécies-específicos amplificou-se apenas o *Cl. estertheticum* com o *primer* SE, comprovando a eficiência desta sequência. O *primer* DBR, específico para *Cl. gasigenes*, não detectou este microrganismo. Alguns autores (MOSCHONAS *et al.*, 2009).

## CONCLUSÃO

- O desenvolvimento de *Cl. estertheticum* e conseqüente produção de gás em carne bovina é favorecido pela elevação da temperatura de armazenamento.
- A concentração de esporos de *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes* influencia o surgimento do *blown pack* em função da temperatura de incubação.
- As bacteriocinas 484 e 204 mostraram uma ação promissora na inibição da deterioração por produção de gás ocasionada por *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes* em baixas temperaturas de armazenamento. No entanto, estudos com concentrações mais elevadas destes compostos protéicos poderão confirmar a eficácia dos mesmos.
- A inoculação realizada com células vegetativas de *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes* ocasionou a produção de gás, porém em quantidades inferiores se comparadas as produzidas pelos esporos nos testes realizados com carne bovina embalada a vácuo.
- O quaternário de amônio nas concentrações de 900ppm e 4.500ppm foi o sanitizante mais eficiente na inibição da germinação dos esporos de *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes*. Apenas o *primer* espécie-específico DBR de *Cl. estertheticum* foi eficiente para detecção desta cultura. O *primer*, específico para *Cl. gasigenes*, não detectou este microrganismo. Um estudo mais aprofundado para se determinar a razão da não amplificação da sequência genética referente ao *Cl. gasigenes* por seu *primer* específico deverá ser conduzido.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIT, pela bolsa concedida.

Ao CTC – ITAL, pela oportunidade de estágio.

## REFERÊNCIAS

BENKERROUM, N.; GHOUATI, Y.; SANDINE, W.E. & TANTAQUI-ELARAKI. Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. **Letters in Applied Microbiology**, v.17, p.78-81, 1993.



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

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

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.

MAH, J.H., KANG, H., TANG, J., Comparison of viability and heat resistance of *Clostridium sporogenes* stored at different temperatures. **Jornal of Food Science**, v.74, n.1, p. 23-27, 2009.

MOSCHONAS, G., BOLTON, J.D., SHERIDAN, J. J., MCDOWELL, A.D. The effect of storage temperature and inoculums level on the time of onset of blown pack spoilage. **Journal of Applied of Microbiology**, v. 108, p. 532-539, 2009.

TAGG, J. R.; McGIVEN, A. R. Assay System for bacteriocins. **Applied Microbiology**, Washington, v.21, n.5, p.943, 1971.

WULT, M., ODENHOLT, I., WALDER, M. Activity of three disinfectants and acidified nitrite against *Clostridium difficile* spores. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 24, n. 10, p. 765-768, 2003.

YANG, X., BALAMURUGAN, S., GILL, O.C. Effects on the development of blown pack spoilage of the initial number of *Clostridium estertheticum* spores and *Leuconostoc mesenteroides* on vacuum packed beef. **The American Meat Science Association**, 2010.