



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

**Caracterização de bactérias presentes na carne bovina utilizando
o sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA**

TEDDY DE SOUZA PARANHOS

Florianópolis – SC
2019

TEDDY DE SOUZA PARANHOS

Caracterização de bactérias presentes na carne bovina utilizando o sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina apresentado como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Muller

Florianópolis – SC
2019

RESUMO

O presente trabalho descreve como foram identificadas bactérias ao longo da cadeia de processamento de frigoríficos bovinos utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA, com o intuito de verificar a presença de bactérias relacionadas à deterioração do tipo Blown Pack. Para testar se existia diferenças estatísticas na diversidade das amostras foi usado o teste Wilcoxon. A identificação de espécies diferencialmente abundantes nos tratamentos foi realizada com o pacote de programas DESeq2 onde foi aplicado o Walt test com uso do modelo 'negative binomial' para normalização dos dados. A dispersão dos grupos de bactérias relacionadas com estufamento que possuíam maior abundância foi avaliada através da comparação de 100% de semelhança genética na região do 16S rRNA entre as amostras ao longo do processo produtivo. Utilizando métodos estatísticos de comparação genômica a nível de gênero e/ou espécie foi possível demonstrar a presença de bactérias deteriorantes relacionadas com estufamento de carnes embaladas à vácuo, sua abundância, os locais de maior prevalência e diferenças significativas entre as amostras.

Palavras chaves: Sequenciamento de DNA, Bactérias, Carne, Embalagem à vácuo, Deteriorantes, Blown Pack.

ABSTRACT

The present work describes how bacteria were identified along the cattle slaughterhouses processing chain using the high performance sequencing of the V3/V4 regions of the 16S rRNA gene, in order to verify the presence of bacteria related to Blown Pack spoilage. The Wolcoxon test was used to test whether there were statistical differences in the diversity of the samples. The identification of differentially abundant species in the treatments was performed with DESeq2 program package where the Walt test was applied using the 'negative binomial' model for data normalization. The dispersion of the groups of bacteria related to Blown Pack spoilage that had greater abundance was evaluated by comparing 100% of genetic similarity at the 16S rRNA region between the samples throughout the productive process. Using statistical methods of genomic comparason at the genus or/and species level it was possible to demonstrate the presence of spoilage bacteria related to Blown Pack vacum packed meats, their abundance, the sites with highest prevalence and significant diferences between the samples.

Keywords: DNA Sequencing, Bacteria, Meat, Vacuum Packaging, Deteriorating, Blown Pack.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 1 - **MAP**- embalagem com atmosfera modificada
- 2 - **MAPA** - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
- 3 - **dNTP's** - desoxirribonucleotídeos fosfatados (A, G, C T)
- 4 - **PCR** - Polymerase chain reaction - Reação em cadeia da polimerase
- 5 - **RNA** - Ribonucleic acid - Ácido ribonucleico
- 6 - **DNA** - Deoxyribonucleic acid - Ácido desoxirribonucleico
- 7 - **kpb** - mil pares de bases
- 8 - **spp.** - espécies de um gênero
- 9 - **NGS** – Next Generation Sequencing – Sequenciamento de nova geração
- 10 - **LAB** – Lactic Acid Bacteria – Bactérias ácido láticas (BAL)

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	8
1.1 OBJETIVOS	9
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 FLUXOGRAMA DE PROCESSAMENTO E LEGISLAÇÃO	10
2.2 EMBALAGEM E CONSEQUÊNCIAS	11
2.2.1 Embalagem do produto final	11
2.3 DETERIORAÇÃO DA CARNE BOVINA EMBALADA A VÁCUO	12
2.4 DETERIORAÇÃO “BLOWN PACK”	13
2.5 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A CARNE BOVINA EMBALADA À VÁCUO	13
2.5.1 Bactérias ácido-láticas	14
2.5.2 <i>Brochothrix thermosphacta</i>	15
2.5.3 Enterobactérias	15
2.5.4 Clostrídios psicrófilos	16
2.6 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO	18
2.6.1 PCR	18
2.6.2 Sequenciamento de DNA	21
2.6.3 Método Sanger de Sequenciamento	21
2.6.4 Sequenciamento de nova geração - NGS	22
2.6.5 O Princípio Básico da Química NGS	23
2.6.6 Identificação de Bactérias - Genes e Regiões do Sequenciamento de DNA	24
2.6.7 Sequenciamento Illumina	29
2.7 BANCO DE DADOS PÚBLICOS	32
3.0 METODOLOGIA	33
3.1 AMOSTRAGEM	33
3.2 Frigorífico X	33
3.3 Frigorífico Y	34
3.3.1 Coleta da esponja	34
3.3.2 Coleta da água	35
3.3.3 Coleta Produto final	35
3.4 METODOLOGIA UTILIZADA - NGS	35

3.5 METODOLOGIA DE BIOINFORMÁTICA (PIPELINE SENTINEL)	36
3.6 APRESENTAÇÃO DOS DADOS	36
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE FRIGORÍFICOS ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DE AMPLICONS.	38
4.2 ANÁLISE COMPARATIVA DE PERFIS MICROBIOLÓGICOS DE CARNES	41
4.2.1. Espécies encontradas nas 53 amostras de produto com possível relação com estufamento	42
4.3 ANÁLISE COMPARATIVA DE PERFIS MICROBIOLÓGICOS DE CARNES (PRODUTOS FINAIS ESTUFADOS) VERSUS ANIMAL VIVO, CARCAÇA, AMBIENTE, E PRODUTO FINAL NÃO ESTUFADO.	43
4.3.1 – Análises estatísticas dos 10 grupos de amostras	45
4.3.2 Abundância diferencial	48
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7.0 ANEXOS	71

1.0 INTRODUÇÃO

Músculo é o tecido responsável pelo movimento dos animais. A conversão do músculo em carne ocorre de forma gradual após o abate do animal. Algumas funções vitais continuam mesmo após a morte do animal, dessa maneira, modificações bioquímicas e estruturais ocorrem simultaneamente durante a conversão do músculo em carne, e são dependentes dos tratamentos *ante-mortem*, do processo de abate e das técnicas de armazenamento da carne (PETRUS, FERREIRA, 2018).

Durante o abate as transformações bioquímicas continuam, o processo de sangria paralisa a circulação sanguínea e o aporte de O₂ e glicose nas células musculares. Dessa forma, a fonte de energia direta da célula é o glicogênio o qual começa a ser metabolizado pela via anaeróbia. A glicólise anaeróbica é uma reação exotérmica e tem como produto o ácido láctico o que conseqüentemente aumenta a temperatura e reduz o pH do músculo, elevando a concentração de [Ca⁺²⁺] o que favorece a contração até esgotar a adenosina trifosfato (ATP) disponível. Esse processo, faz com se formem pontes de actino-miosina permanentes, etapa a qual caracteriza-se o *Rigor mortis*, onde o músculo converteu-se em carne (PETRUS, FERREIRA, 2018).

Em média, o tempo estabelecido para o *Rigor mortis* de bovinos, é de 6 a 12 horas. E a velocidade de queda de pH é de 24 a 48 h até o pH final ficar constante. O pH no início do abate é por volta de 7, após 5 horas ele reduz para aproximadamente 6,4 e 6,8, e após 24 horas se estabelece entre 5,5 e 5,9 (PETRUS, FERREIRA, 2018).

A queda do pH durante a transformação do músculo em carne determina a qualidade da carne, porém outros aspectos como cor, CRA (capacidade de retenção de água) e gordura intramuscular estão diretamente associados à uma carne de boa qualidade. Dentre outros aspectos como maciez, suculência, aparência e resistência a mastigação (Barton-Gade, 1990; Sellier, 1995).

Os padrões microbiológicos da carne bovina também são utilizados como parâmetros no controle de qualidade na indústria de alimentos e as bactérias presentes no ambiente onde a carne foi processada, que acabam entrando em contato com esse produto por contaminação cruzada, também influenciam na microbiota presente no produto final o que está diretamente correlacionado com a qualidade e a vida de prateleira do mesmo.

A qualidade microbiológica da carne e derivados é altamente influenciada pelas condições higiênicas durante sua produção e manipulação, sem um controle higiênico adequado, o ambiente de abatedouros e açougues pode representar um importante ponto de contaminação (BARROS et al., 2007). E para que se tenha um controle de qualidade preventivo, é preciso entender quais grupos de bactérias são responsáveis por grandes perdas na indústria de carnes, em quais quantidades estão presentes, quais são as suas características e perigos, para poder controlá-los de forma assertiva, entendendo os problemas em sua causa raiz.

Bactérias são encontradas em toda cadeia de produção de carne, e por influência das variáveis encontradas no manejo do animal, das formas de abate e das diferentes práticas de fabricação (BPF) de frigoríficos e processamento, e devido ao fato da carne ser um alimento altamente propício para o desenvolvimento das mesmas, a diversidade microbiológica pode ser

alterada. Vale ressaltar que alguns grupos de bactérias são comumente encontradas no produto final embalado à vácuo refrigerado, devido à suas características. Algumas espécies alvo do controle de qualidade possuem grande potencial deteriorante e são relacionadas com grandes perdas financeiras para a indústria de alimentos e podem ter sua origem relacionada com contaminações cruzadas do processo ou serem provenientes da matéria-prima.

De tal forma, avaliar a diversidade bacteriana presente em cada etapa da cadeia de produção é o primeiro passo para ajudar a indústria de alimentos a entender, medir e aplicar ações corretivas com o intuito de criar barreiras microbiológicas para evitar com microrganismos alvo cheguem até o produto final, garantindo a qualidade e segurança do alimento e evitando desperdícios e perdas significativas.

A cada ano, surgem novos métodos de identificação e a precisão e robustez aumentam revelando uma nova compreensão sobre a microbiologia, identificações precisas e compreensão de problemas complexos em toda cadeia do alimento. Hoje, com a aplicação de métodos qualitativos e quantitativos mais abrangentes como o sequenciamento de DNA em situações reais de produção, tem-se percebido cada vez mais que os problemas não são derivados unicamente de um grupo de microrganismos específicos a ser controlado para cada tipo de matriz, e sim a compreensão dos diferentes grupos que podem estar presentes e das associações entre eles que podem gerar compostos e metabólicos que favoreçam o crescimento de outros grupos, a dinâmica de crescimento dessas populações e suas sucessões.

Em vista disso, este trabalho visou avaliar a diversidade de bactérias presentes no processo de produção de cortes de carne utilizando técnicas de sequenciamento de DNA para identificar os grupos taxonômicos encontrados em todo processo de produção.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral:

Avaliar a diversidade de bactérias em amostras da cadeia de processamento de carne bovina desde o animal vivo ao produto final embalado à vácuo através do sequenciamento de DNA.

1.1.2 Objetivos específicos:

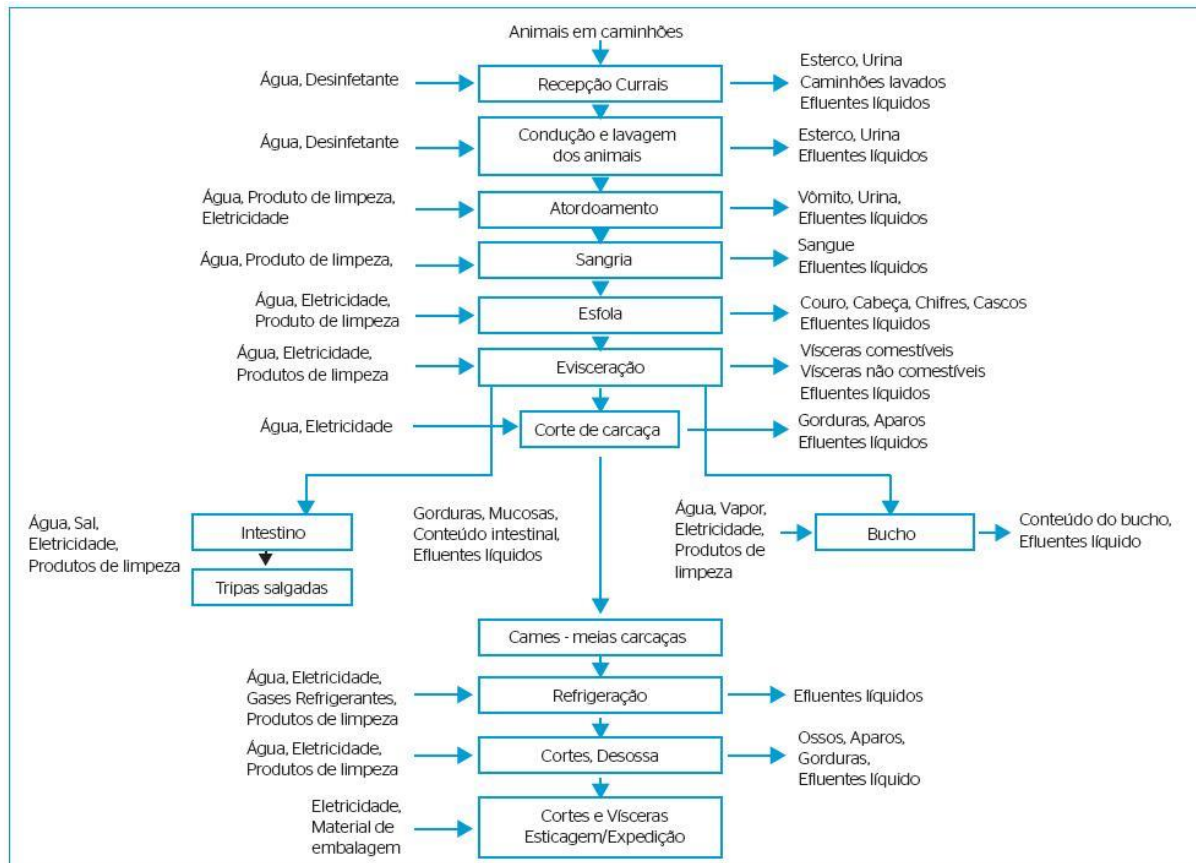
- Identificar bactérias em amostras de cadeia de processamento de carne;
- Identificar bactérias em amostras de carne embalada à vácuo com e sem estufamento;
- Comparar diversidade microbiológica de bactérias entre amostras de matéria-prima, processo, e produto final.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FLUXOGRAMA DE PROCESSAMENTO E LEGISLAÇÃO

O fluxograma de processo básico de abate de bovinos em um frigorífico engloba as etapas apresentadas na Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma do abate de bovinos.



Fonte: (Rabelo, 2014).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou em 2017 os Programas Nacionais de Controle de Patógenos que permitem identificar a prevalência dos patógenos em produtos de origem animal produzidos pelos estabelecimentos brasileiros registrados junto ao SIF. É dessa forma que o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA - identifica, estabelece medidas de controle para o perigo, implementa essas medidas de controle e monitora os resultados obtidos, a fim de garantir a segurança alimentar do consumidor frente aos patógenos.

De acordo com a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 9, DE 8 DE ABRIL DE 2009 os procedimentos de autocontrole definidos são: o conjunto de procedimentos adotados pelo estabelecimento que abrangem as Boas Práticas de Fabricação (BPF), os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), e o Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de

Controle (APPCC) para garantir a inocuidade dos produtos de origem animal prontos para o consumo. Os PCCs são identificados no Diagrama Operacional (Figura 4).

Figura 4 - Diagrama Operacional de abate de bovinos (produção de carne bovina com osso - meia carcaça).

TRANSPORTE DO GADO	
↓	
RECEPÇÃO E DESCANSO DO GADO	•
↓	
BANHO DE ASPERSÃO	PCC
↓	
IÇAMENTO (praia de vômito)	•
↓	
SANGRIA	•
↓	
ESFOLA	PCC
↓	
PRÉ EVISCERAÇÃO / EVISCERAÇÃO	PCC
↓	
FAZES PREPARATÓRIAS DA INSPEÇÃO	•
↓	
DIVISÃO DA CARCAÇA	•
↓	
TOALETE	
↓	
LAVAGEM DA CARCAÇA	•
↓	
RESFRIAMENTO	PCC
↓	
EXPEDIÇÃO E TRANSPORTE	PCC

Legenda: • indica um ponto de contaminação importante, um ponto a ser controlado; PCC indica um ponto crítico de controle.

Fonte: PORTARIA Nº 46, DE 10 DE FEVEREIRO DE 1998 – MAPA

O Controle de Qualidade de cada Frigorífico, baseado em seu fluxograma de processo, deve estabelecer os procedimentos de monitoramento e assegurar que cada PCC está sob controle, aplicando uma sequência planejada de análises, medições, registros e avaliações para verificar desvios críticos e executar as ações corretivas e preventivas.

2.2 EMBALAGEM E CONSEQUÊNCIAS

2.2.1 Embalagem do produto final

A embalagem a vácuo é o método de escolha para estocar e distribuir grandes pedaços de carne resfriada ou cortes comerciais. Nas embalagens a vácuo, o oxigênio residual é rapidamente consumido (a níveis abaixo de 1%) pelo tecido ou respiração microbiana, e

umenta a taxa de CO₂ para até 20%. Condições completamente anaeróbicas são raras de se conseguir, todos os filmes comercialmente utilizados apresentam uma taxa de permeabilidade. A proporção relativa de dióxido de carbono e hidrogênio varia de acordo com sua produção ou como resultado da difusão do hidrogênio através do filme da embalagem e absorção de dióxido de carbono da carne. Durante a estocagem, bactérias aeróbicas Gram negativas são substituídas por bactérias Gram positivas de multiplicação lenta (DAINTY et al., 1983; DAINTY & MACKEY, 1992).

2.3 DETERIORAÇÃO DA CARNE BOVINA EMBALADA A VÁCUO

A deterioração dos alimentos pode ser considerada como a mudança que gera um produto inaceitável para o consumo humano (FELIPE, 2008; HAYES, 1985; GRAM et al., 2002). A deterioração pode ser evidente, por exemplo, um dano físico, desenvolvimento visível de microrganismos com formação de limosidade ou danos causados por insetos. Da mesma forma a deterioração pode ocorrer devido a mudanças na textura ou desenvolvimento de odores indesejáveis causados por reações bioquímicas ou ações microbianas (FELIPE, 2008; HUIS IN'T VELD, 1996; JACKSON et al., 2001; HILARIO et al., 2004). Podem ocorrer alterações da cor, odor e aumento da exsudação, embora muitas vezes imperceptíveis aos consumidores (GILL, 2000). Ou pode ser uma alteração indireta como o estufamento de uma embalagem, consequência da geração de gases, que por sua vez podem ser oriundos do metabolismo de alguns microrganismos deteriorantes.

A deterioração é mais rápida e evidente em alimentos proteínáceos como a carne bovina, de frango, peixe, frutos do mar, leite e alguns produtos de laticínio. Estes alimentos são altamente nutritivos, possuem pH neutro ou levemente ácido e uma elevada umidade que permite o desenvolvimento de uma ampla gama de microrganismos (HUIS IN'T VELD, 1996; CARVALHO, 2001; BORGES; FREITAS, 2002). Após o abate e evisceração, muitas carcaças continuam com suas características microbiológicas inalteradas (ANDERSEN, 1995). É esperado que um animal saudável tenha a parte interna do músculo livre de contaminação. Para, NOTTINGHAM (1982) bem como DICKSON e ANDERSON (1992), o tecido muscular bovino, logo depois do abate, é praticamente estéril. Entretanto os microrganismos podem migrar da superfície da carcaça para os músculos internos como o perimísio (FELIPE, 2008, GUERRERO; TAYLOR, 1994).

Inicialmente, os microrganismos deteriorantes estão presentes em pequenas quantidades e constituem somente a menor parte da microbiota natural da carne. Durante a estocagem, os microrganismos deteriorantes geralmente se multiplicam mais rapidamente que a microbiota remanescente e produzem os metabólitos responsáveis por odores, limo e finalmente a rejeição sensorial (DALGAARD, 1993). Mudanças nas condições extrínsecas (ex. refrigeração, embalagem com atmosfera modificada) somente retardam a deterioração. Por esta razão, baixas temperaturas de estocagem não irão prevenir a deterioração, mas irão predispor a deterioração causada por microrganismos psicotróficos (LEE; YOON, 2001). Da mesma forma quando restringe-se o oxigênio da carne por meio da embalagem a vácuo, o desenvolvimento microbiano é alterado dando lugar para a proliferação de novos gêneros mais aptos àquele ambiente (FELIPE, 2008; JONES, 2004).

A vida de prateleira e a qualidade do produto podem ser estendidas por modificação da atmosfera gasosa que envolve a carne. A embalagem a vácuo e embalagem com atmosfera modificada (MAP) são dois métodos usados comercialmente para modificar o gás da atmosfera que envolve a carne (HOOD; MEAD, 1993). A carne bovina embalada a vácuo normalmente apresenta vida de prateleira em torno de 9 a 12 semanas, quando em temperaturas menores que 1,5°C (FELIPE, 2008; HOLLEY; GILL, 2005).

A embalagem a vácuo é o método de escolha para estocar e distribuir grandes pedaços de carne resfriada ou cortes comerciais. Nas embalagens a vácuo, o oxigênio residual é rapidamente consumido (a níveis abaixo de 1%) pelo tecido ou respiração microbiana, e aumenta a taxa de CO₂ para até 20%. Condições completamente anaeróbicas são raras de se conseguir, todos os filmes comercialmente utilizados apresentam uma taxa de permeabilidade. A proporção relativa de dióxido de carbono e hidrogênio varia de acordo com sua produção ou como resultado da difusão do hidrogênio através do filme da embalagem e absorção de dióxido de carbono da carne. Durante a estocagem, bactérias aeróbicas Gram negativas são substituídas por bactérias Gram positivas de multiplicação lenta (FELIPE, 2008; DAINTY et al., 1983; DAINTY; MACKEY, 1992).

A microbiota típica da carne bovina embalada a vácuo consiste em bactérias ácido-láticas e enterobactérias em níveis de 10⁸ e 10⁶ UFC/g, respectivamente (FELIPE, 2008; BEEBE et al., 1976; NEWTON et al., 1978; SCHILLINGER et al., 1987; SUTHERLAND et al., 1975; YOST; NATTRESS, 2002).

2.4 DETERIORAÇÃO “BLOWN PACK”

Alguns microrganismos produzem grandes quantidades de gases que provocam a deterioração “blown pack”. Caracterizada por provocar estufamento da embalagem em função de uma abundante produção de gases como hidrogênio, dióxido de carbono e nitrogênio, ésteres butíricos, butanol, gás sulfídrico e outros compostos sulfurados provocando a completa distensão da embalagem, sob temperatura de refrigeração (BRODA et al, 1998; BRODA, 2003; RAUECKER, 2006; BUENO, 2009).

2.5 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A CARNE BOVINA EMBALADA À VÁCUO

Segundo a literatura, os gêneros que ocorrem na carne recém cortada frequentemente são *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psicrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, bactérias do ácido láctico (BAL) e diferentes gêneros da família de *Enterobacteriaceae* (Doulgeraki et al, 2012, Blickstad et al., 1981; Blickstad; Molin, 1983; Dainty; Mackey, 1992; Dainty et al., 1983; Enfors et al., 1979; Erichsen; Molin, 1981).

Os microrganismos predominantemente associados à deterioração da carne bovina refrigerada embalada a vácuo são: *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp., algumas

espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, bactérias ácido-láticas, gêneros da família *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas* spp. e espécies psicrófilas e psicrotóricas de *Clostridium*. Esses microrganismos podem multiplicar na carne em alto número e torná-la imprópria ao consumo humano (Bueno, 2009, Kalchayanand et al., 1989; Davies, 1992; Lyhs, 2002; Holley; Gill, 2005; Ercolini et al., 2006).

2.5.1 Bactérias ácido láticas

As BAL pertencem ao grupo das bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, estritamente fermentativas produzindo ácido lático como principal produto final. Elas são destituídas de citocromo e são anaeróbicas naturais, mas toleram o oxigênio, chamadas de microaerófilas. BAL são catalase negativas, embora amostras catalase positivas possam ser encontradas em muitos casos. Filogeneticamente, elas são um grupo muito variado de microrganismos (FELIPE, 2008; LYHS, 2002).

Algumas bactérias deteriorantes produzem como deterioração típica, gás, limosidade e/ou líquido esbranquiçado (FELIPE, 2008; BJÖRKROTH et al., 1998).

Mogensen et al. (2003) estabeleceram que o grupo das bactérias ácido láticas (BAL) é constituído por 11 gêneros sendo estes: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (FELIPE, 2008).

Bactérias ácido láticas são reconhecidas como importantes competidores entre deteriorantes microbiológicos sob condições de vácuo (Doulgeraki et al, 2012, Castellano et al., 2004; Gill, 1996; Nychas; Skandamis, 2005; Stanbridge; Davies, 1998; Tsigarida et al., 2000).

As populações de LAB na carne bovina embalada à vácuo são principalmente representadas por *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* e *Leuconostoc spp.* (Doulgeraki et al, 2012, Fontana et al., 2006; Pennacchia et al., 2011; Yost e Nattress, 2002).

Mais espécies de *Lactobacillus* podem ser encontradas durante o armazenamento sob vácuo a 4 ° C incluindo *Lb. algidus* além de *Lb. sakei*. Além disso, a 1 ° C *Lactobacillus spp.*, *Weissella spp.* e *L. mesenteroides* pode ocorrer indicando a influência da temperatura no desenvolvimento de diferentes espécies sob as mesmas condições de embalagem (Doulgeraki et al, 2012).

Jones (2004) observou que as populações LAB dominantes sofreram uma mudança da população dominante pelas linhagens subsequentes durante o armazenamento, após intervalos de armazenamento de 4 semanas a -1,5 °C. Uma mudança sem que haja um declínio do número total de LAB. Segundo Jones, essa observação é consistente com a capacidade de tais organismos crescerem em menos de 1% do tamanho da população anterior para 100% (aproximadamente oitavas gerações de crescimento) em menos de 4 semanas a -1,5 °C de armazenamento, como observado em seu trabalho sobre dinâmica de sucessão de populações de bactérias do ácido lático em carne bovina embalada a vácuo armazenada sob refrigeração. Os resultados deste estudo mostram que a dinâmica de sucessão das populações LAB em carne bovina embalada a vácuo refrigerada é complexa, mas que os padrões são evidentes no seu desenvolvimento. A complexidade das ecologias de embalagens e, em particular, a diversidade

observada entre as réplicas das mesmas amostras, indica que o desenvolvimento de uma estratégia de intervenção simples e prática para a melhoria das propriedades de armazenamento de carne será um desafio. Estratégias podem então ser desenvolvidas para melhorar as propriedades de armazenamento de carne, promovendo o desenvolvimento de cepas benígnas utilizando métodos precisos de identificação.

2.5.2 *Brochothrix thermosphacta*

A *B. thermosphacta* psicrotrófica é uma importante bactéria de deterioração da carne e comumente associada à deterioração de carnes frescas (DOULGERAKI et al., 2012, CANTONI et al., 2000; ERCOLINI et al., 2006; RATTANASOMBOOM et al., 1999; RUSSO et al., 2006; SAMELIS, 2006; STANBRIDGE; DAVIES, 1998). A capacidade da *B. thermosphacta* de crescer na carne durante o armazenamento aeróbico e a vácuo faz dela um importante colonizador de carne e uma importante porção da microbiota de deterioração (DOULGERAKI et al, 2012, DAINTY et al., 1983; PIN et al., 2002; LABADIE, 1999) e pode ocasionalmente ser o organismo dominante (DOULGERAKI et al, BORCH et al., 1996).

B. thermosphacta é um anaeróbio facultativo que pode crescer em carnes e peixes refrigerados armazenados sob baixa O₂ e sob vácuo (ILLKOUND et al., 2018; BORCH et al., 1996; ERCOLINI et al., 2006). Tem sido descrita como amplamente disseminada ao longo da cadeia alimentar, desde a matéria-prima até o produto final, bem como no ambiente de processamento de alimentos (ILLKOUND, 2018; NYCHAS et al., 2008; STACKEBRANDT; JONES, 2006).

B. thermosphacta pode causar perdas econômicas sérias na indústria de alimentos devido à sua capacidade de produzir metabólitos associados a odores desagradáveis. Por exemplo, em carne bovina, foi demonstrado que produz odores desagradáveis de queijo e produtos cremosos lácteos, associados com a produção de 3-hidroxi-2-butanona (acetoína), 2,3-butanodiona (diacetil) e 3-metil-1-butanol (ILLKOUND et al, 2018; CASABURI et al, 2014; DAINTY; MACKAY, 1992).

No entanto, quando carne bovina é armazenada anaerobicamente em embalagens a vácuo, LAB e *Br. thermosphacta* tornam-se os organismos predominantes de deterioração. Sob condições anaeróbicas, a deterioração Blown pack causada pela germinação e crescimento de uma gama de *Clostridium spp.* psicrotróficos / psicrófilos, freqüentemente associado a odor de sulfito, também pode ocorrer (REID et al., 2017; MOSCHONAS et al., 2011; YANG; GILL; BALAMURUGAN, 2010; BOLTON, CARROL e WALSH, 2015).

2.5.3 Enterobactérias

São características dos membros da família *Enterobacteriaceae* se apresentarem em forma de bacilos Gram-negativos, medindo em geral 0,3-1,8 µm. Estes microrganismos podem ser imóveis ou móveis. Deste último são por meio de flagelos peritríquios, ou são imóveis. São anaeróbios facultativos e quimiorganotróficos, tendo tanto o metabolismo aeróbico como o fermentativo. A maioria das espécies se desenvolve bem a temperatura de 37° C, entretanto

algumas têm temperatura ótima entre 25 e 30° C e são frequentemente mais ativas metabolicamente a estas temperaturas. Existem gêneros psicotróficos frequentemente encontrados no solo, água e trato gastrointestinal dos seres humanos e animais (FELIPE, 2008, ICMSF, 2000; HOLT et al. 1994).

A presença de enterobactérias é frequentemente usada como indicador para possível contaminação fecal decorrente de inadequado processamento ou contaminação pós-processamento (FELIPE, 2008, TORNADIJO et al., 2001). Por esse motivo a etapa de evisceração é um ponto crítico de controle (biológico) no processo produtivo de frigoríficos.

Microrganismos deteriorantes da família *Enterobacteriaceae* podem multiplicar-se em proporções significativas na carne embalada a vácuo ou em atmosfera modificada quando estocada em temperaturas maiores que 10° C (PENNEY et al., 1993).

Certas espécies de enterobactérias psicotróficas comumente ocorrem na carne refrigerada. Estes microrganismos, que são capazes de se multiplicar aerobicamente no tecido adiposo e tecido muscular com pH maior que 6.0 aparecem mais prevalentemente na carne de suíno e ovino (GRAU, 1981; DAINY & MACKEY, 1992). Seu desenvolvimento é favorecido em temperaturas maiores ou igual a 4 °C (BLICKSTAD; MOLIN, 1983).

Em temperaturas acima de 5° C, enterobactérias geralmente predominam sobre as *Pseudomonas* spp. e são responsáveis pela deterioração. Os principais gêneros da família *Enterobacteriaceae* apontados como deteriorantes de carne e produtos cárneos são *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Providência*, *Serratia*, *Escherichia* e *Yersinia* (BRENNER, 1992). Três espécies da família *Enterobacteriaceae* - *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter aerogenes* e *Hafnia alvei*, foram identificadas como deteriorantes de carnes refrigeradas embaladas a vácuo com a deterioração “blown pack” (HANNA et al., 1979). Alguns gêneros da família *Enterobacteriaceae* são: *Citrobacter* spp., *Edwardsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp..

Broda et al. (1994) relataram que alguns episódios comerciais de deterioração da carne in natura foram frequentemente 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, “estufamento de embalagens”, que se caracteriza pela deterioração da carne com grande distensão da embalagem pela produção de gases (BUENO, 2009, BRODA et al., 1996).

Brightwell (2007) relata que seus resultados mostraram que espécies de *Hafnia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Rahnella* e *Ewingella* quando presentes em números iniciais de 10⁵ ufc / cm² foram capazes de produzir deterioração de carne de cordeiro embalada a vácuo armazenado a 4 °C. Indicando um possível envolvimento de bactérias psicotróficas da família *Enterobacteriaceae* na deterioração de embalagens de carnes (de cordeiro) embaladas a vácuo.

2.5.4 Clostrídios psicofílicos

Posteriormente, Broda et al. (1997) constataram o aumento na frequência de casos de estufamento de embalagens a vácuo em produtos refrigerados e mantidos em temperaturas na faixa de -1,5 a 2,0°C, sem relato de abuso de temperatura e embalagens danificadas. Esses autores sugeriram então a participação de microrganismos anaeróbios estritos e/ou facultativos, psicrófilos ou psicrótróficos, que poderiam representar um perigo para a indústria de processamento de carnes (BUENO, 2009).

Bueno (2009), relata em sua tese uma série de trabalhos em que pesquisadores avaliaram suspeitas de deterioração em carnes embaladas à vácuo refrigeradas provenientes de diversos países, onde os mesmos constataram indícios de espécies de *Clostridium* psicrófilos e suspeitas desses microrganismos estarem relacionados com a deterioração apresentada no produto (acúmulo de grande quantidade de gás incluindo H₂S, exsudato na embalagem, odor desagradável, perda da textura e da coloração natural da carne) e comparando com características das *Clostridium spp.* em cada caso em questão. Inclusive presença de ácido butírico decorrente da fermentação de açúcares, característica exclusiva do gênero *Clostridium*.

Embora estes microrganismos sejam frequentemente incapazes de proliferar em temperaturas acima de 22°C, 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 (BUENO, 2009, BRODA et al., 1998; BRODA et al. 2002).

Os clostrídios psicrófilos são bastonetes geralmente móveis, Gram-positivos, formadores de esporos e possuem o metabolismo anaeróbico. Possuem esporos elípticos, terminais ou subterminais (*Clostridium estertheticum subsp. laramiense*); subterminais ou centrais como na espécie *C. estertheticum subsp. estertheticum*. Geralmente estão envolvidos com a deterioração da carne bovina fresca refrigerada embalada a vácuo (KALCHAYANAND et al., 1989). Em ágar sangue de carneiro 5% podem ser beta-hemolíticos ou não hemolíticos. Estes clostrídios psicrófilos são sacarolíticos, capazes de fermentar frutose, glicose, sucrose, xylose e inulina produzindo em grandes quantidades ácido butírico, 1-butanol, ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico e etanol (FELIPE, 2008, SPRING et al., 2003).

Durante o processo de deterioração “blown pack” o gás que se forma no interior da embalagem é constituído principalmente por dióxido de carbono, nitrogênio e hidrogênio e por compostos butíricos resultantes do metabolismo fermentativo, além da descarboxilação de aminoácidos que geram como produtos finais compostos sulfurados voláteis, amônia e diaminas caracterizando o odor desagradável das carnes com deterioração “blown pack” (FELIPE, 2008; BRODA et al., 1997; BRODA et al., 2000).

Os clostrídios podem ser encontrados no solo, tubo digestivo de animais e fezes (HELPS et al., 1999). Seus esporos são bastante resistentes à dessecação, desinfetantes e calor, mantendo-se no ambiente por muito tempo (CORREA; CORREA, 1992). A pesquisa de clostrídios psicrófilos em abatedouros incluem a presença destes em material fecal, pele, tonsilas, embalagens e em vários pontos da planta como ralo da sala de abate, paredes, rolete da esfoladora e outros (Felipe, 2008, BRODA et al., 1996).

Em um trabalho realizado no Brasil, Rauecker (2007) mostrou que as fontes de detecção com maiores índices de positividade para o *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foram fezes bovina,

boxe de atordoamento, carcaças antes da esfolagem, meias carcaças refrigeradas e cortes cárneos deteriorados (FELIPE, 2008).

Estudos têm demonstrado que a principal fonte de contaminação por clostrídios psicrófilos na carne são os próprios animais abatidos, partículas do solo e/ou material fecal aderido à pele do animal (Felipe, 2008, BRODA et al., 2002; BOEREMA et al., 2003).

Clostrídios psicrótróficos tais como *Cl. algidicarnis*, *Cl. algidixilanolictico*, *Cl. estertheticum*, *Cl. frigidicarnis*, *Cl. gasigenes* e *Cl. putrefaciens* foram identificados como os agentes causadores da deterioração tipo "Blown Pack" de carne refrigerada embalada à vácuo (DOULGERAKI et al., 2012, ADAM et al., 2010; BRIGHTWELL et al., 2007; BRODA et al., 1996, 1999, 2000; DAINTY et al., 1989; KALCHAYANAND et al., 1989; LAWSON et al., 1994; SILVA et al., 2011).

Dorn-In (2018), descreve em seu artigo o primeiro relato de detecção e identificação de *C. frigoriphilum* e *C. tagluense* como agentes causadores de deterioração Blown pack.

Os métodos microbiológicos clássicos para detecção de *Clostridium spp.* psicrófilos e psicrótróficos associados a este tipo de deterioração – estufamento 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 (BUENO, 2009, BRODA et al., 1998). Esses microrganismos são tradicionalmente diferenciados e identificados por suas características fenotípicas, as quais são de difícil interpretação para clostrídios (BUENO, 2009, HOLDEMAN et al., 1977; BRODA et al., 1998).

Com o advento dos métodos genômicos de identificação de microrganismos, a evolução da técnica e redução dos custos, surge então a possibilidade de identificação de espécies do Gênero *Clostridium* através de métodos de maior acurácia e com maior escalabilidade dos processos em laboratório, exigindo menor tempo.

2.6 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO

2.6.1 PCR

A PCR é uma técnica que permite a amplificação de regiões do genoma a partir de pequenas quantidades de DNA *in vitro* (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004). Esta técnica foi idealizada em 1983 por Kary Mullins (prêmio Nobel de química de 1993 pelo desenvolvimento dessa técnica), para realizar a amplificação de grandes quantidades de segmentos de DNA, empregando sucessivos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (MULLIS et al., 1986; RUTHS, 2017).

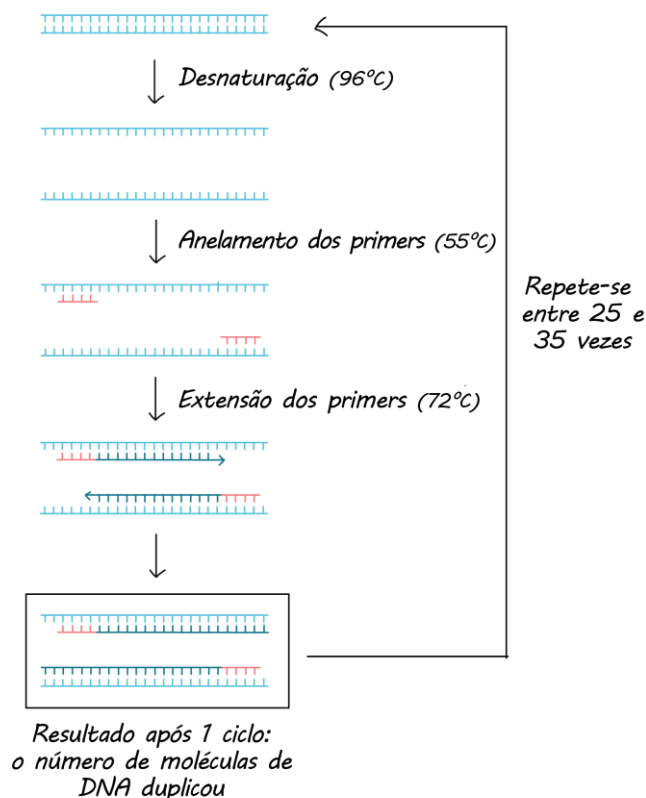
O processo de PCR consiste em uma série de vinte a trinta e cinco ciclos (Figura 5), e cada ciclo dobra a quantidade de DNA presente no meio. Cada um consiste em três etapas (Rahman, 2013).

1. O DNA de filamento duplo deve ser aquecido de 94 a 96°C para separar os filamentos. Este passo é chamado de desnaturação; quebra as ligações de hidrogênio que conectam as duas cadeias de DNA. Antes do primeiro ciclo, o DNA é muitas vezes desnaturado por um longo período de tempo para garantir que tanto o DNA modelo quanto os primers se separaram completamente e agora são apenas fitas únicas. Tempo de 1 a 2 minutos até 5 minutos. Também a Taq-polimerase é ativada por este passo (Rahman, 2013).

2. Depois de separar as fitas de DNA, a temperatura é diminuída para que os primers possam se unir aos únicos filamentos de DNA. Este passo é chamado de anelamento. A temperatura deste estágio depende dos primers e geralmente é 50 °C abaixo da temperatura de fusão (45-60°C). Uma temperatura errada durante o passo de anelamento pode resultar em primers não se ligarem ao DNA modelo ou se ligarem aleatoriamente. Tempo de 1 a 2 minutos (RAHMAN, 2013).

3. Finalmente, a DNA-polimerase tem que preencher os filamentos que faltam. Começa no primer anelado e segue seu caminho ao longo do filamento de DNA. Este passo é chamado de extensão. A temperatura de extensão depende da DNA-polimerase. O tempo para este passo depende tanto da própria DNA-polimerase como do comprimento do fragmento de DNA a ser amplificado. Como regra geral, 1 minuto por 1 kpb (RAHMAN, 2013).

Figura 05 - Ciclo PCR.



Fonte: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

Segundo Rahman (2013) as vantagens do PCR são:

- O PCR pode ser usado para o diagnóstico de muitas doenças, ampla variedade de experimentos e análises;
- A PCR é um auxiliar de diagnóstico confirmatório muito importante para doenças infecciosas como tuberculose, HIV, CMV, Mycoplasma, hepatite, sífilis, fungos e protozoários doença, câncer, especialmente leucemia e linfoma Malária, bacteremia estafilocócica, tuberculose, Toxoplasma Gondic 18, 19, 2021;
- O PCR também é importante para dedicação genética e teste de paternidade;
- PCR tem alta sensibilidade (95-100%) e especificidade (100%)(RAHMAN, 2013).

Segundo Rahman (2013) as desvantagens da PCR são:

- Requer instrumentos caros como termociclador, agargel bandeja de difusão, kit de separação de DNA, outros produtos químicos e reagentes que nem todos os laboratórios podem comprar;
- Requer mão de obra treinada, experiente e qualificada e tecnólogos;
- Espaço adequado com ar condicionado, desumidificador, instalações de fluxo laminar;
- Resultados falso-positivos e falso-negativos podem diminuir especificidade e sensibilidade (RAHMAN, 2013).

A técnica da PCR tem demonstrado aplicações em diversas áreas que necessitam de diagnósticos rápidos e confiáveis, e ainda possibilita que resultados confiáveis sejam obtidos a partir de pequenas quantidades de DNA. Por sua rapidez, especificidade e sensibilidade, a PCR é uma técnica que pode ser aplicada em diversas áreas como: biotecnologia, investigação médica ou forense, detecção de microrganismos, genotipagem, biossegurança, diagnóstico de doenças infecciosas graves ou de origem genética, mapeamento genético, clonagem de genes, elaboração de árvores filogenéticas e detecção de organismos geneticamente modificados (OGMs). Sua aplicação em diversos segmentos se dá pela existência de diferentes tipos de polimorfismo do DNA, que são classificados de acordo com a sua natureza molecular e localização no genoma, permitindo assim que estudos sejam realizados para as mais diversas finalidades. Desta forma, a PCR está cada vez mais presente em laboratórios de análise, pois as tecnologias moleculares oferecem rapidez na emissão de resultados, o que a torna ainda mais desejada pelos setores produtivos e na implantação de ferramentas de qualidade (RUTHS, 2017).

Além disso, existem microrganismos presentes nos alimentos que são difíceis de purificar e cultivar; portanto, um método de sequenciamento rápido sem cultura é altamente vantajoso.

Os métodos comuns de não cultura para identificação incluem sequenciamento de rRNA ou outros genes conservados, sequenciamento por biblioteca de clones, sequenciamento metagenômico e assim por diante.

2.6.2 Sequenciamento de DNA

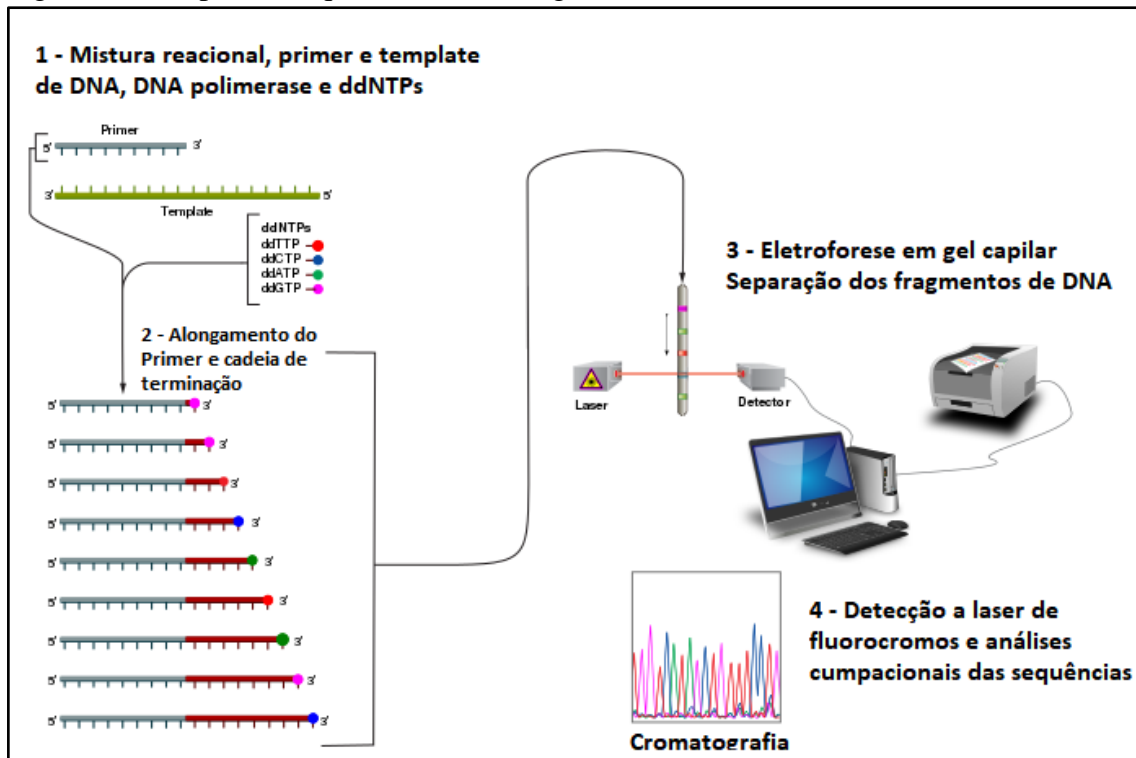
Sequenciamento de DNA é o processo de determinação da sequência de nucleotídeos (A, T, C, e G) em um pedaço de DNA. A era do sequenciamento de DNA começou com o sequenciamento de Sanger em 1977, o que facilita a detecção de bases individuais e a variação do DNA no nível de nucleotídeo único. Após 2005, o NGS foi introduzido na pesquisa e diagnóstico de DNA laboratórios e continuou a desenvolver. Múltiplas plataformas de sequenciamento foram lançadas no mercado, usando diferentes metodologias de sequenciamento e ferramentas computacionais foram desenvolvidas para facilitar a análise de bioinformática e interpretação das enormes quantidades de dados que resultaram do NGS. (SANGER, 1977; REUTER; 2015; KULSKI; 2016; NIGAM, 2018).

2.6.3 Método Sanger de Sequenciamento

O método é referido como sequenciamento didesoxinucleotídeo e sequenciamento de terminação de cadeia, consiste nos seguintes passos:

- extração de DNA (de amostras de tecido, saliva, sangue, etc.) e tratamento de diluição;
- reação em cadeia da polimerase (PCR): um processo efetivo para fazer cópias de segmentos de DNA;
- purificação de produtos de PCR: para remover elementos usados no processo de PCR para obter amostras de DNA de alta qualidade para sequenciamento;
- sequenciamento de DNA: para classificar os fragmentos de DNA por tamanho em um sequenciamento (CARPENTE, 2019).

Figura 06 - Etapas do sequenciamento Sanger.



Fonte: Imagem modificada pelo autor disponível em <https://pt.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/dna-sequencing>. Acessada em 18/05/2019.

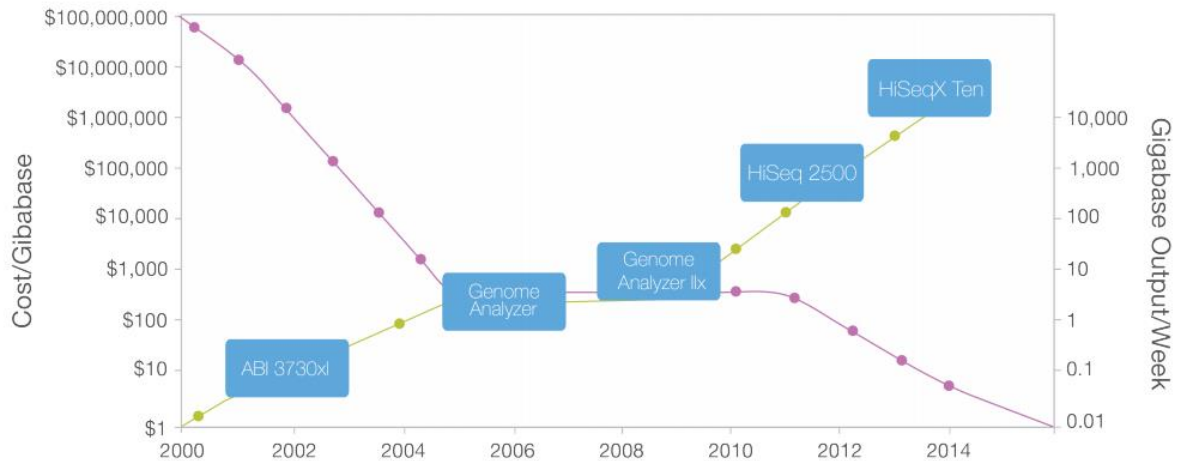
Vantagens do NGS incluem versus Sanger incluem: maior sensibilidade para detectar variantes de baixa frequência (JAMUAR, 2014; RIVAS, 2011); Tempo de resposta mais rápido para volumes de amostra altos (KÖNIG, 2015). Menor limite de detecção (SHENDURE, 2008; SCHUSTER, 2008).

2.6.4 Sequenciamento de nova geração - NGS

O sequenciamento de DNA já percorreu um longo caminho desde os dias da cromatografia bidimensional nos anos 70. Com o advento do método de terminação da cadeia de Sanger em 1977, os cientistas obtiveram a capacidade de reduzir a quantidade de DNA de forma confiável e reproduzível. Mais tarde, a Applied Biosystems introduziu os primeiros instrumentos de sequenciamento automatizados, baseados em eletroforese capilar (CE), o AB370 em 1987 e o AB3730xl em 1998, instrumentos que se tornaram os principais pilares dos projetos Human Genome liderados pelos NIH e pela Celera (COLLINS, 2003). "Os instrumentos foram considerados de alto rendimento para o tempo de antena, o Analisador de Genoma surgiu em 2005 e fez sequenciamento de 84 kilobases (kb) para 1 gigabase (Gb) por unidade. 3 A técnica de sequenciamento massivo de leitura curta foi uma abordagem fundamentalmente diferente da capacidade de sequenciamento evolucionada que lançou a

“próxima geração” da ciência do genoma. Daquele ponto em diante, a saída de dados do sequenciamento de nova geração (NGS) ultrapassou a lei de Moore, mais do que duplicando a cada ano (Figura 07) (ILLUMINA, 2017).

Figura 07 - Custo de SeqUenciamento e Dados de Output desde 2000 - O aumento dos dados de saída e o custo decrescente simultâneo de sequenciamento desde 2000. Os eixos Y em ambos os lados do gráfico são logarítmicos.



Fonte: (ILLUMINA, 2017)

As técnicas de Sequenciamento de Última Geração são novas abordagens feitas em grande escala que aumentam a velocidade e diminuem os custos do sequenciamento.

2.6.5 O Princípio Básico da Química NGS

Em princípio, o conceito por trás da tecnologia NGS é similar ao sequenciamento CE (Capillary Electrophoresis). A DNA polimerase catalisa a incorporação de trifosfatos de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) marcados fluorescentemente no DNA durante o ciclo sequencial durante a síntese de DNA. Durante o ciclo, no ponto de incorporação, os nucleotídeos são identificados pela excitação do fluoróforo. A diferença crítica é que, em vez de sequenciar um único fragmento de DNA, a NGS estende esse processo através de milhões de fragmentos de uma forma maciçamente paralela. Mais de 90% dos dados de sequenciamento do mundo são gerados pelo sequenciamento da Illumina por síntese química (SBS - Sequenciamento por Síntese). Ele oferece alta precisão, leituras livres de erros de alto rendimento e uma alta porcentagem de chamadas de base acima de Q30 (ILLUMINA, 2017; ROSS, 2013; NAKAZATO, 2013).

Os escores Q são definidos como uma propriedade logaritmicamente relacionada às probabilidades de erro de base call (P). E indica a probabilidade de uma determinada base nitrogenada ser chamada incorreta pelo sequenciador (ILLUMINA, 2011; EWING, 1998).

$$(1) Q = - 10 \log_{10} P$$

Tabela 3- Pontuações de qualidade e acurácia na identificação das bases nitrogenadas.

Pontuação de qualidade de phred	Probabilidade de erro de base	Acurácia das bases
10	1 in 10	90%
20	1 in 100	99%
30	1 in 1,000	99.9%
40	1 in 10,000	99.99%
50	1 in 100,000	99.999%

Fonte: Figura modificada pelo autor, disponível em (ILLUMINA, 2011).

2.6.6 Identificação de Bactérias - Genes e Regiões do Sequenciamento de DNA

Uma ferramenta valiosa na taxonomia bacteriana para determinar relacionamentos entre grupos bacterianos e identificar espécies é o sequenciamento do gene 16S rRNA (DOULGERAKI, 2012; BAYLIS, 2006; ERCOLINI, 2004; HUGENHOLTZ et al., 1998; MAUKONEN; SAARELA, 2009; NOCKER et al., 2007).

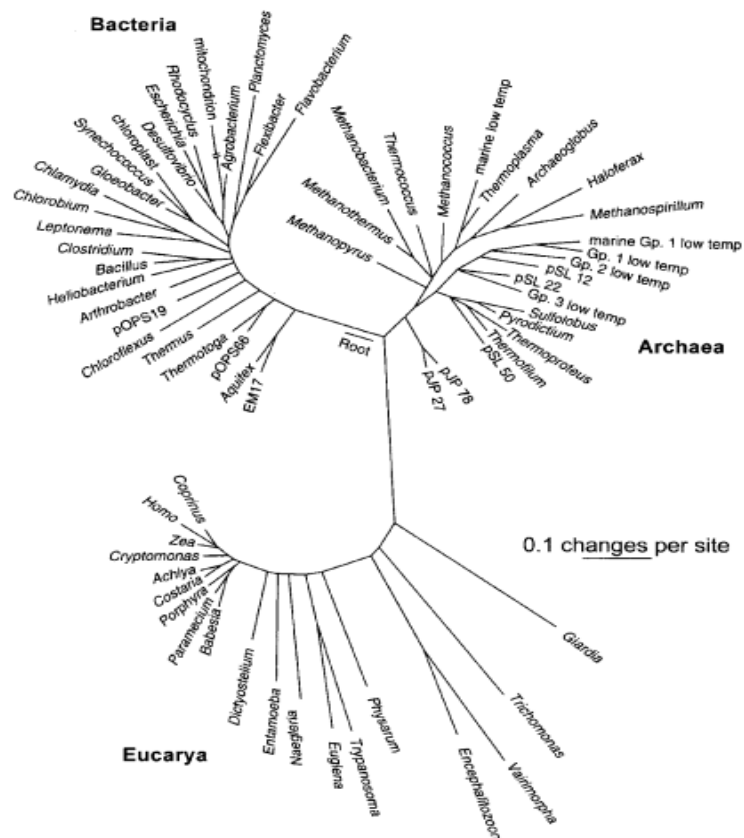
Isso é porque o gene 16S rRNA tem regiões conservadas e variáveis e pode permitir o desenvolvimento de primers direcionados a todas as bactérias e regiões de abrangência com seqüências específicas de espécies (ERCOLINI, 2004). Mais de 30 milhões de seqüências completas e parciais podem ser encontradas em bancos de dados públicos, enquanto as seqüências de outros genes contêm apenas um número limitado de seqüências limitando seu uso em estudos ecológicos microbianos (DOULGERAKI, 2012, MAUKONEN; SAARELA, 2009; NOCKER ET AL., 2007).

O sequenciamento de rRNA ou outros genes conservados tem sido amplamente aplicado na identificação microbiana. Os microorganismos procarióticos incluem principalmente rRNA 16S, 23S e 16Se23S, enquanto os microorganismos eucarióticos incluem principalmente 5S, 18S, 28S rRNA (26S para leveduras) e região espaçadora interna transcrita (ITS). (ZHANG; YOU, 2018; HAN, SCHEPARTZ, PELLEGRINI, & DERVAN, 1994).

O RNA ribossômico 16S (ou 16S rRNA) o componente da subunidade pequena 30S de um ribossoma procariótico que se liga na seqüência Shine-Dalgarno. Os genes que a codificam são denominados gene 16S rRNA e são utilizados na reconstrução de filogenias, devido às baixas taxas de evolução dessa região do gene (WOESE; FOX, 1977).

Na década de 1980, um novo padrão para identificação de bactérias começou a ser desenvolvido. Nos laboratórios de Woese e outros, foi mostrado que as relações filogenéticas de bactérias, e, de fato, todas as formas de vida, poderiam ser determinadas comparando parte estável do código genético (CLARRIDGE, 2004; WOESE ET AL., 2000; WOESE ET AL. 1987). Candidatos para este área genética em bactérias incluídos os genes que codificam para o 5S, o 16S (também chamado de subunidade pequena) e o 23S rRNA e os espaços entre esses genes. A parte do DNA agora mais comumente usada para fins taxonômicos para bactérias é o gene 16S rRNA (CLARRIDGE, 2004, BOTTGER, 1989; GARRITY, 2001; HARMSSEN, 2004; KOLBERT, 1999; PALYS, 1997; TORTOLI, 2003). O 16S rRNA gene também é designado 16S rDNA, e os termos são usados de forma intercambiável: a atual política de ASM é que “16S rRNA gene” seja utilizado. O gene 16S rRNA pode ser comparado não apenas entre todas as bactérias, mas também com o gene 16S rRNA de arqueobactérias e o gene 18S rRNA de eucariotos. A Figura 8 mostra a relação dos principais ramos da vida, o Archaea, Bactérias (procariotas) e Eucarya, bem como as principais ramificações dentro dos procariotas com base nessas seqüências gênicas (CLARRIDGE, 2004, PACE, 1997; PALYS, 1997; WOESE ET AL., 2000; WOESE ET AL. 1987).

Figura 08. - Árvore filogenética universal baseada nas comparações da seqüência do gene 16S rRNA



Fonte: (PACE, 1997).

O gene 16S rRNA é universal em bactérias e assim relacionamentos podem ser medidos entre todas as bactérias (WOESE ET AL., 2000; WOESE ET AL. 1987). Em geral, a

comparação do gene 16S rRNA seqüências permite a diferenciação entre organismos do gênero em todos os principais filós de bactérias, além de classificar cepas em vários níveis, incluindo o que hoje chamamos de espécies e nível de subespécies. As exceções ocasionais à utilidade seqüenciamento do gene 16S rRNA usualmente se relacionam com mais de um espécies bem conhecidas com seqüências iguais ou muito semelhantes (CLARRIDGE, 2004).

A seqüência do gene 16S rRNA tem cerca de 1.550 pb de comprimento e é composto de regiões variáveis e conservadas. O gene é grande o suficiente, com polimorfismos interespecíficos suficientes de Gene 16S rRNA, para fornecer dados diferenciados e válidas medições estatísticas. Primers universais são geralmente escolhidos como complementares às regiões conservadas no início do gene e na região de 540 pb ou no final de toda seqüência (cerca da região de 1.550 pb) e a seqüência da região variável entre elas é usada para a taxonomia comparativa (CHEN et al., 1989, RELMAN, 1999). Embora 500 e 1.500 pb sejam comprimentos comuns para seqüenciar e comparar, as seqüências em bancos de dados podem ser de vários comprimentos. (CLARRIDGE, 2004).

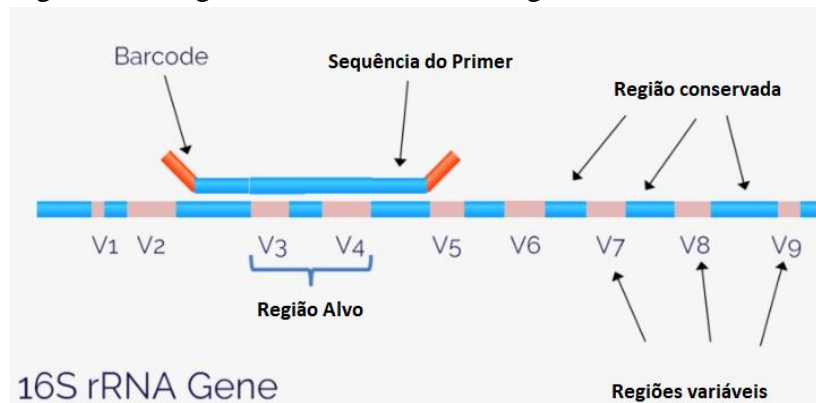
Também é importante considerar se é necessário seqüência de todo o comprimento de 1.500-bp ou se as mais comumente seqüências mais curtas relatadas podem fornecer informações comparáveis. Às vezes, o seqüenciamento de toda a região de 1.500 pb é necessário para distinguir entre taxonomias ou cepas particulares. (CLARRIDGE, 2004; SACCHI et al., 2002; SACCHI et al., 2002).

Para além dos locais de ligação de iniciadores altamente conservados, as seqüências do gene 16S rRNA contêm regiões hipervariáveis que podem fornecer seqüências de assinatura específicas da espécie, úteis para a identificação de bactérias (PEREIRA et al., 2010; KOLBERT, 1999).

As regiões mais utilizadas para identificação taxonômica de bactérias são as regiões, V3, V4 e V6 (ZHANG et al., 2018). Uma grande quantidade de seqüências de DNA de procariontes está disponibilizada nos bancos de dados de seqüências públicos como o NCBI, SILVA, etc. (Figura 9 e Figura 10)

As regiões V3-V4 são regiões hipervariadas as quais auxiliam nos estudos de taxonomia, e entre elas existe uma região conservada do Gene 16S rRNA (ZHANG et al., 2018).

Figura 09 - Região 16S, mostrando as regiões conservadas e variáveis do gene.

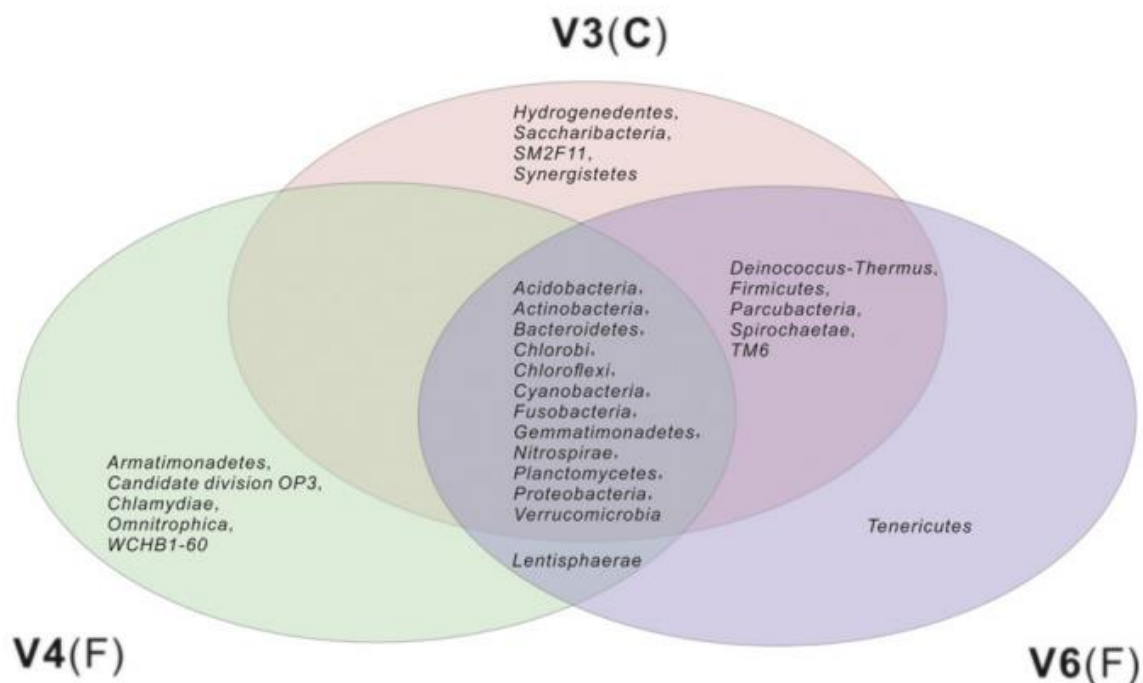


Fonte: Modificada pelo autor.

Disponível em https://www.nicepng.com/ourpic/u2e6a9y3a9w7r5y3_16s-gene-v3-v4-16s-rrna/

Acessado em: 14/05/2019.

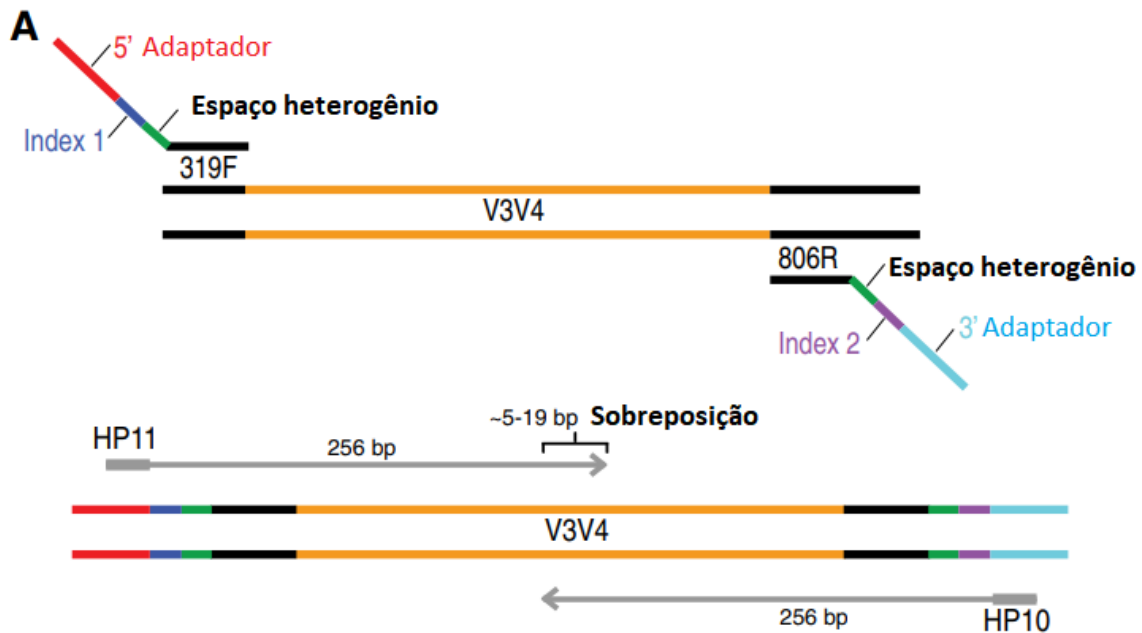
Figura 10 - Diagrama de Venn de V3(C), V4(F), e V6(F) primers baseados nos filos detectados nas sequências depositadas/disponíveis no database SILVA.



Fonte: (ZHANG et al., 2018).

O perfil de comunidades bacterianas independentemente da cultura depende da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA universalmente considerado e aumentou muito a apreciação da complexidade escondida até mesmo em associações microbianas aparentemente simples. O gene 16S rRNA consiste em nove regiões hipervariáveis cercadas por regiões de sequência mais conservada. As estratégias de sequenciamento MiSeq baseadas no 16S rRNA mais amplamente utilizadas incluem uma abordagem single (CAPORASO, 2012) ou a recentemente desenvolvida de dupla-indexação visando a região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA (ZHANG ET AL., 2018; KOZICH; 2013) (Figura 11).

Figura 11 - (A) Iniciadores de amplificação por PCR de indexação dupla visando as regiões hipervariáveis de V3-V4 do gene 16S rRNA contêm uma região heterogênea espaçadora e sequência de adaptadores otimizada para sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq.

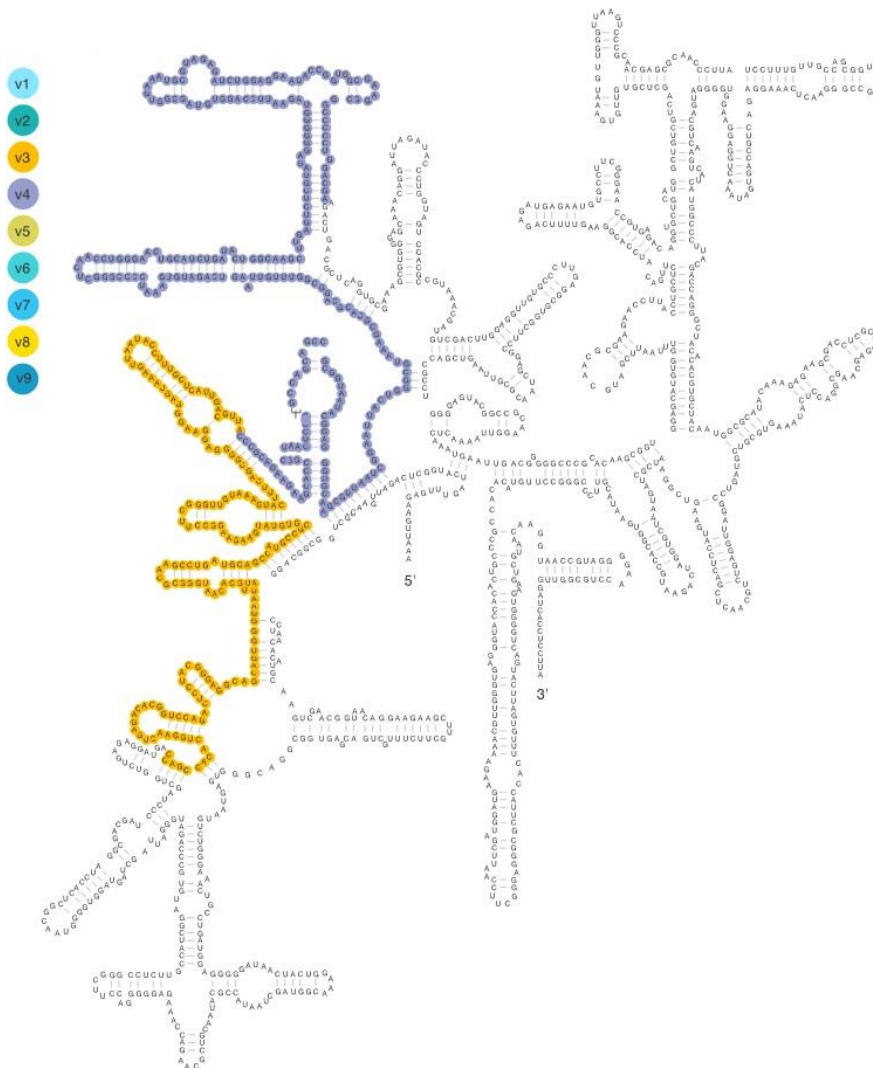


Fonte: modificada pelo autor disponível em (FADROSH et. al, 2014).

O uso dessa abordagem permite o sequenciamento usando primers de sequenciamento padrão Illumina HP10 e HP11 que permitem flexibilidade adicional de sequenciamento. A sequência de adaptadores que permite que os amplicons se liguem a flow cell e ser sequenciada usando o padrão Illumina HP10 ou HP11 (FADROSH et. al, 2014).

No site themicrobiome.com é possível visualizar todas as regiões do gene 16S com facilidade conforme Figura 12.

Figura 12 - Figura representativa da região 16S, com a cor roxa indicando a região V4 e a cor laranja indicando a região V3.



Fonte - Disponível em: http://themicrobiome.com/media/16S_viewer.cfm. Acessado em 28/05/2019.

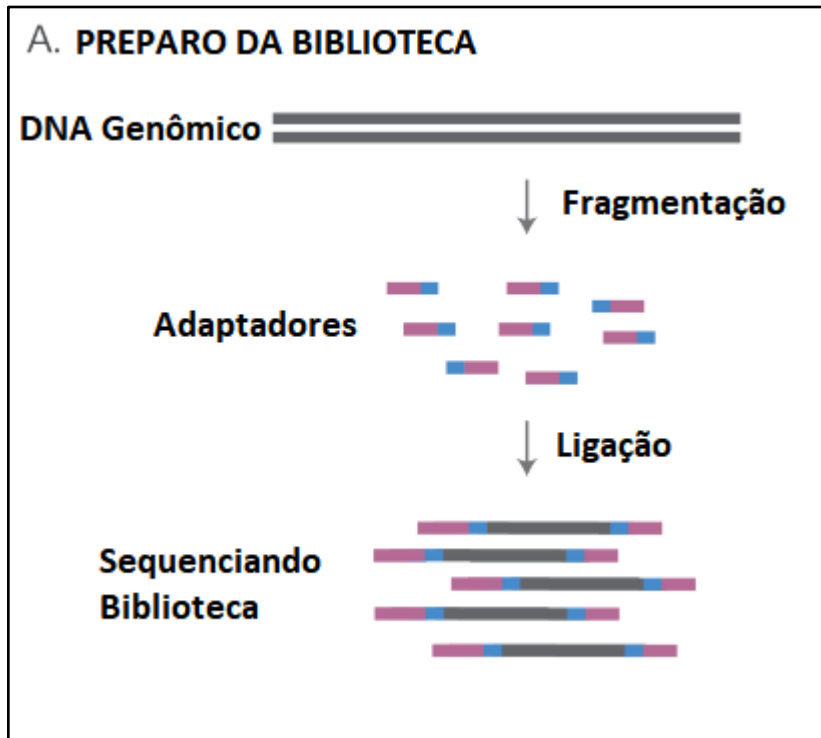
2.6.7 Sequenciamento Illumina

Os fluxos de trabalho do Illumina NGS (Figura 13) incluem quatro etapas básicas:

1. Preparo da Biblioteca - A biblioteca de sequenciamento é preparada por fragmentação aleatória da amostra de DNA ou cDNA, seguida de ligação de adaptador de 5' e 3'. Alternativamente, “tagmentation” combina as reações de fragmentação e ligadura em uma única etapa que aumenta muito a eficiência do processo de preparação da biblioteca. 9

fragmentos ligados por adaptador são depois PCR amplificado e purificado em gel (ILLUMINA, 2017).

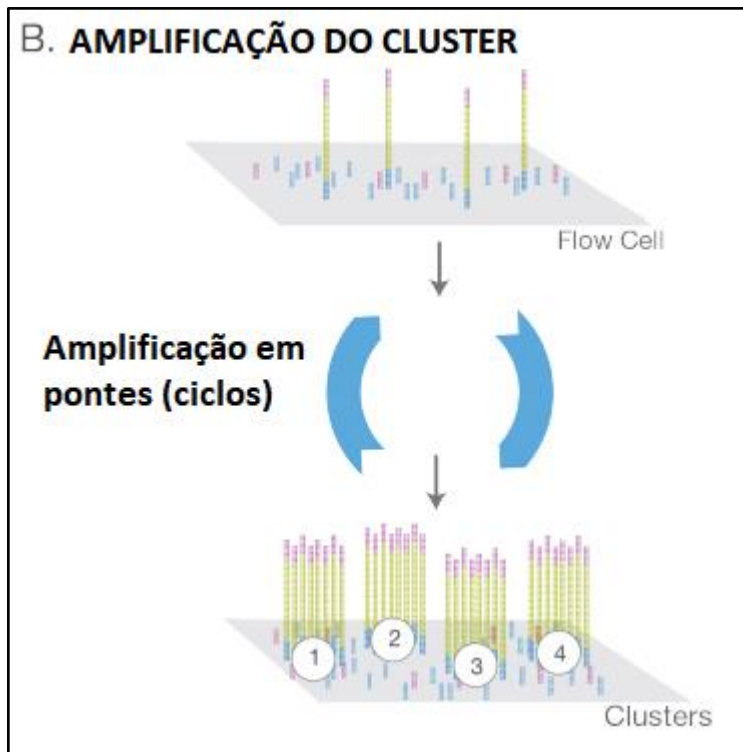
Figura 13 - Visão geral da química de seqüenciamento de próxima geração - O Illumina NGS etapa: (A) preparação de biblioteca.



Fonte: Figura modificada pelo autor, disponível em (ILLUMINA, 2017).

2. Geração de Cluster - Para geração de cluster, a biblioteca é carregada em uma célula de fluxo onde os fragmentos são capturados em um gramado de oligos ligados à superfície complementares aos adaptadores da biblioteca. Cada fragmento é então amplificado em clusters clones distintos através da amplificação da ponte. Quando a geração do cluster é concluída, os modelos estão prontos para o sequenciamento (ILLUMINA, 2017) (Figura 14).

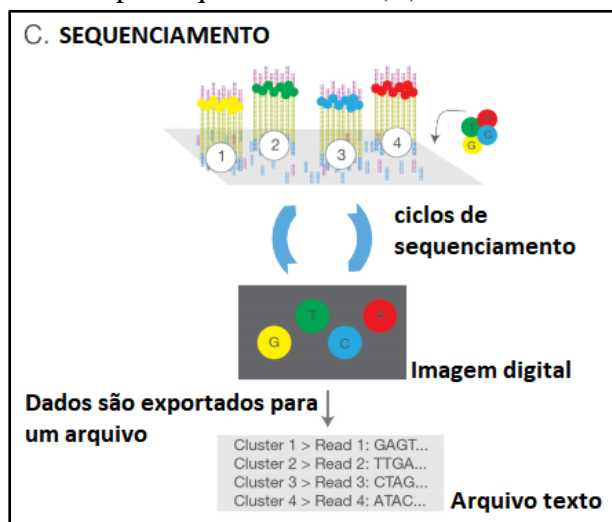
Figura 14 - Visão geral da química de seqüenciamento de próxima geração - O Illumina NGS etapa: (B) geração de cluster.



Fonte: Figura modificada pelo autor, disponível em (ILLUMINA, 2017).

3. Sequenciamento - A tecnologia Illumina SBS usa um método proprietário baseado em terminador reversível que detecta bases simples como eles são incorporados em fitas de modelo de DNA. Como todos os quatro dNTPs reversíveis ligados ao terminador são presentes durante cada ciclo de sequenciamento, a competição natural minimiza o viés de incorporação e reduz muito o erro bruto taxas em comparação com outras tecnologias. O resultado é um sequenciamento base-por-base altamente preciso que virtualmente elimina erros específicos de contexto de seqüência, mesmo dentro de regiões de seqüência repetitiva e homopolímeros (ILLUMINA, 2017) (Figura 15).

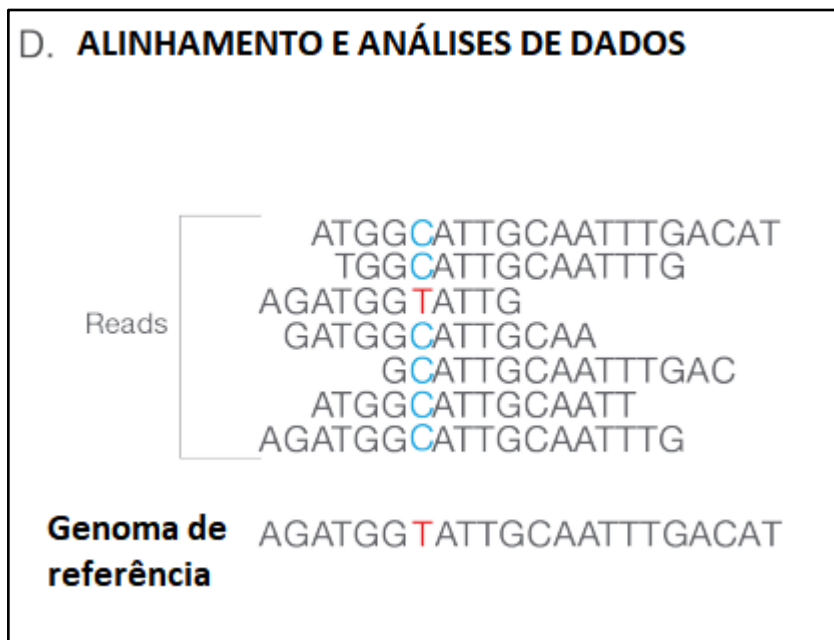
Figura 15. - Visão geral da química de sequenciamento de próxima geração - O Illumina NGS etapa: sequenciamento (C).



Fonte: Figura modificada pelo autor, disponível em (ILLUMINA, 2017).

4. Análise de dados - Durante a análise e alinhamento de dados, as leituras de sequência recém-identificadas são alinhadas a uma referência do genoma. Após o alinhamento, muitas variações de análise são possíveis, como um single nucleotide polymorphism (SNP) ou identificação de deleção de inserção (indel), leitura de contagem para métodos de RNA, filogenética ou análise metagenômica e mais (ILLUMINA, 2017) (Figura 16).

Figura 16 - Visão geral da química de seqüenciamento de próxima geração - O Illumina NGS etapa:(D) alinhamento e análise de dados.



Fonte: Figura modificada pelo autor, disponível em (ILLUMINA, 2017).

2.7 BANCO DE DADOS PÚBLICOS

O GenBank® é o banco de dados de seqüências genéticas do NIH (National Institutes of Health), uma coleção anotada de todas as seqüências de DNA publicamente disponíveis (Nucleic Acids Research, 2013 Jan; 41 (D1): D36-42). O GenBank faz parte da Colaboração Internacional de Banco de Dados de Seqüência de Nucleotídeos, que compreende o DNA DataBank do Japão (DDBJ), o European Nucleotide Archive (ENA) e o GenBank no NCBI. Essas três organizações trocam dados diariamente. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Como outros:

- SILVA - QUAIST et al. (2013) - Banco de dados especializado em sequências de procariotos (16S).
- Greengenes DeSANTIS et al. (2006) - Banco de dados especializado em sequências de procariotos (16S).

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

As amostras foram fornecidas por 8 unidades frigoríficas. De duas empresas de processamento de carne bovina, Frigorífico X (4 unidades) e Frigorífico Y (4 Unidades).

Os produtos finais enviados de todas as unidades são cortes de carne embalados à vácuo refrigerados, somando um total de 53 amostras. Sendo que 8 delas já possuíam algumas semanas de armazenamento. Todas as outras foram recém embaladas.

As amostras ambientais foram de equipamentos, ralos, juntas de piso, racks, utensílios, aventais, botas, luvas, ganchos, mesas, esteira, balança, carrinho de mão, água do esterilizador de facas, guilhotinas, esteiras, e embalagens.

As amostras de produto de processo: animal sujo, animal após o banho, carcaça antes e depois de processos mecânicos e manuais, carne na câmara de maturação, carne na câmara de refrigeração, entrada da desossa, depois da manipulação da desossa e produto final.

3.2 AMOSTRAGEM NO FRIGORÍFICO X

No Frigorífico X amostras foram coletadas de carcaças, amostras ambientais, de equipamentos, de processo, e produto final. Swabs secos com solução estéril de soro fisiológico foram enviados para o Frigorífico realizar as coletas, seguindo o procedimento abaixo:

- 1 - Tubos de transporte contendo um swabs secos de algodão e frascos de solução estéril de soro fisiológico foram enviados.
- 2 - Antes da coleta, o swab foi umedecido com solução estéril de soro fisiológico. Foram utilizadas luvas de procedimento para retirar o swab do tubo de transporte e foi umedecida a ponta de algodão, de todos os lados, com algumas gotas da solução.
- 3 - Esfregou-se o swab por toda a superfície escolhida para a coleta. Importante: o excesso de pó, sujidade ou matéria orgânica pode atrapalhar a recuperação do DNA dos microrganismos, por isso evita-se a coleta excessiva desse tipo de material.
- 4 - Esfregou-se o swab no cartão FTA e acomodou-se o cartão no envelope de envio.
- 5 - O envelope foi lacrado e enviado a temperatura ambiente, com prazo máximo de chegada no laboratório em 48 h para o laboratório realizar as análises de sequenciamento de DNA.

3.2.1 Coleta de produto final

Foram enviados frascos estéreis adequados para a coleta da amostra de alimento.

1 - O frigorífico enviou 300 g de cada amostra de produto final em bag estéril;

2 - As amostras coletadas foram acomodadas na caixa de isopor contendo gelo reciclável previamente congelado e devidamente lacradas para envio respeitando o prazo de 24 h após o horário da coleta até chegada no laboratório para análise de sequenciamento de DNA;

Os pontos de coleta estão identificados na Tabela 1, conferir nos anexos. As outras unidades seguiram coletas em pontos semelhantes.

3.3 AMOSTRAGEM NO FRIGORÍFICO Y

No Frigorífico Y amostras foram coletadas desde o animal vivo ao do produto final, passando por amostras ambientais de processo, amostras de equipamentos. Para amostras de superfície e de equipamento foram utilizadas esponjas com solução estabilizante e swabs com soros fisiológicos. A escolha do material foi baseada na área da superfície a ser coletada. Áreas pequenas, swab. Áreas maiores, esponja.

1 - Foram enviados tubos de transporte contendo swabs secos de algodão e frascos de solução estéril de soro fisiológico;

2 - Antes da coleta, o swab foi umedecido com solução estéril de soro fisiológico. Foram utilizadas luvas de procedimento para retirar o swab do tubo de transporte e foi umedecida a ponta de algodão, de todos os lados, com algumas gotas da solução;

3 - Esfregou-se o swab por toda a superfície escolhida para a coleta. Importante: o excesso de pó, sujidade ou matéria orgânica pode atrapalhar a recuperação do DNA dos microrganismos, evite a coleta excessiva desse tipo de material;

4 - O swab foi retornado para o tubo de coleta identificado com o código da amostra, fechada a tampa firmemente;

5 - O swab foi enviado à temperatura ambiente, em um prazo de 48 h para o laboratório realizar as análises de sequenciamento de DNA.

3.3.1 Coleta da esponja

Foram enviadas bags com esponja de coleta em solução neutralizante.

1 - Esfregou-se a esponja por toda a superfície a ser amostrada, utilizando os dois lados da esponja.

2 - Após a coleta a esponja foi inserida de forma asséptica na bag e o cabo retirado.

3 - A amostra foi encaminhada refrigerada com gelo reciclável previamente congelado em um prazo de 48 h para o laboratório realizar as análises de sequenciamento de DNA.

3.3.2 Coleta da água

Para a coleta de água, foram utilizados frascos estéreis adequados para a coleta da amostra de água.

- 1 - Foram coletados 150 mL de água nos frascos estéreis;
- 2 - A amostra foi encaminhada refrigerada, com gelo reciclável previamente congelado em um prazo de 48 h para o laboratório realizar as análises de sequenciamento de DNA.

3.3.3 Coleta do produto final

Foram enviados frascos estéreis adequados para a coleta da amostra de alimento.

- 1 - O frigorífico enviou 300 g de cada amostra de produto final em bag estéril;
- 2 - As amostras coletadas foram acomodadas na caixa de isopor contendo gelo reciclável previamente congelado e devidamente lacradas para envio respeitando o prazo de 24 h após o horário da coleta até chegada no laboratório para análise de sequenciamento de DNA.

Pontos de coleta na unidade 01 do Frigorífico Y podem ser visualizados na Tabela 2, conferir nos anexos. As outras unidades seguiram coletas em pontos semelhantes.

3.4 METODOLOGIA UTILIZADA - NGS

As bactérias utilizadas eram provenientes das amostras, que foram analisadas individualmente. A identificação de bactérias foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq (Illumina Inc., USA), utilizando o kit V2 de 300 ciclos, single-end, sem normalização das bibliotecas. As sequências de DNA dos microrganismos foram analisadas por meio de um pipeline de identificação e quantificação de bactérias proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil), considerando no máximo 1% de erro acumulado no sequenciamento. Para a identificação das espécies de microrganismos presentes nas amostras, as sequências de DNA obtidas foram comparadas com um banco de dados contendo outras sequências de DNA acuradas e já caracterizadas para uma ampla faixa de espécies de interesse. Posteriormente às análises de bioinformática, os resultados foram carregados na plataforma Neobiome para visualização.

3.5 METODOLOGIA DE BIOINFORMÁTICA (PIPELINE SENTINEL)

Os arquivos fastq são avaliados quanto a qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). A seguir, os arquivos fastq são submetidos à trimagem de primers e sequências com baixa qualidade (QP<30). O software proprietário (desenvolvido pela Neopropecta) utilizado para tal finalidade foi construído em Python v.3.6, sendo este inspirado nas funcionalidades do projeto BioPython (COCK et al. 2009). Clusters com abundância menor do que 5 são removidos das análises, pois tais estruturas normalmente são relacionadas a sequências quimeras (SMYTH et al., 2010). As identificações taxonômicas são realizadas com blastn v.2.6.0+ (ALTSCHUL et al., 1990), usando como referência um banco de dados proprietário ou público. Quanto a definição de uma espécie, dentre os 20 hits retornados para cada cluster, uma instrução em Python avalia se um dos três quesitos seriam atendidos pelos hits: 1) maior bit-score; 2) menor e-value; e 3) taxonomias com maior representação. Os hits que atenderam um dos itens anteriores, foram escolhidos como espécie representante. Essas análises foram realizadas na plataforma computacional da Amazon, onde a estrutura de bioinformática da Neopropecta está hospedada.

3.6 APRESENTAÇÃO DOS DADOS

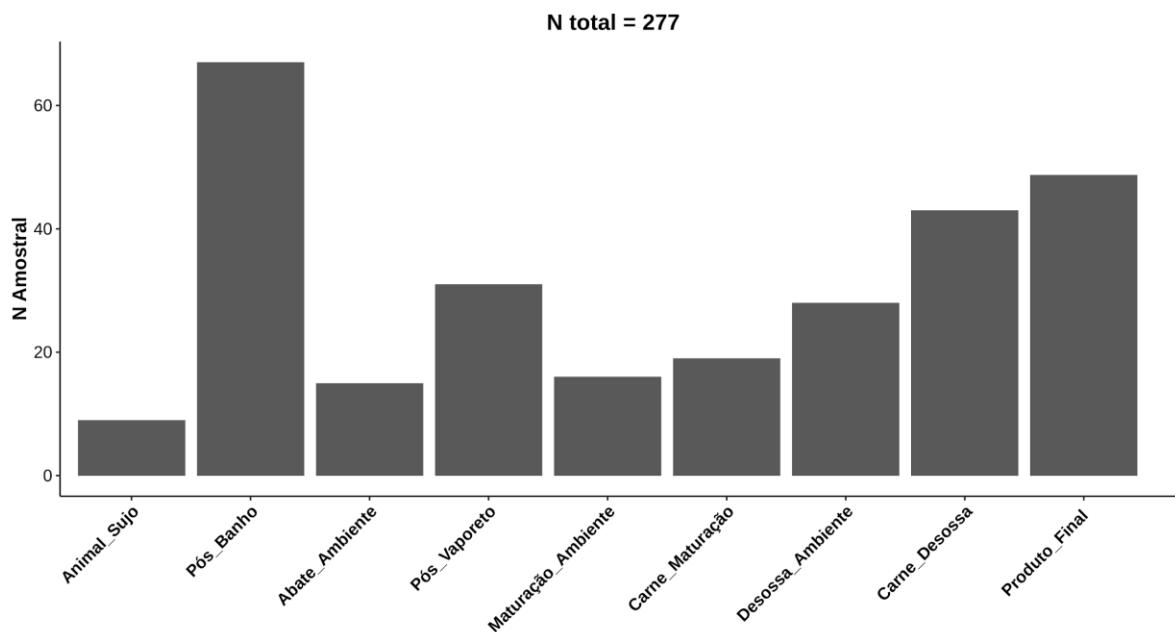
Após o término das identificações taxonômicas no pipeline Sentinel, a tabela de taxonomia, tabela de OTU's, sequências fasta (apenas os clusters) e tabela de metadados foram introduzidas no pipeline de análise de alfa e beta-diversidade no R version 3.4.4 (R Development Core Team, 2008). A árvore filogenética foi construída a partir do alinhamento das sequências fastas dos clusters exibidos no perfil microbiológico (plataforma). Para o alinhamento das sequências foi usado o programa Clustal Omega version 1.2.3 (Sievers et al., 2011) e, para a construção da árvore filogenética foi usado o programa FastTree version 2.1.10 (Price et al., 2009). O enraizamento da árvore foi realizado com a técnica mid-point contida no programa Retree version 3.697 do pacote Phylip (Felsenstein, 2005). Para a produção do índice de Shannon foi usado o pacote de programas Phyloseq version 1.22.3 (McMurdie e Holmes, 2013). Para testar se existia diferenças estatísticas na diversidade das amostras (Shannon) foi usado teste Wilcoxon. Tal teste foi selecionado devido a ser um teste não paramétrico, logo não depende da normalidade dos dados (dados de sequenciamento tendem a ter distribuição não-normal). A identificação de espécies diferencialmente abundantes nos tratamentos foi realizada com o pacote de programas DESeq2 version 1.18.1 (Love et al., 2014), onde foi aplicado o Walt test com uso do modelo 'negative binomial' para normalização dos dados. Para as análises, foram consideradas como diferencialmente abundantes apenas as bactérias que tivessem p-value < 1% e logFoldChanged > +/-2.

3.5 CATEGORIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Devido à quantidade de pontos de coleta diferentes entre unidades frigoríficas diferentes, foi necessário eliminar esses pontos das análises estatísticas, para poder agrupar as amostras com pontos semelhantes e o resultado final representar a área a ser avaliada. Para que o resultado fosse observado como a soma das áreas de abate em comum de cada unidade, representando o abate como um todo, por exemplo. E assim por diante com todas as outras amostras que formavam uma categoria. Como não foram apenas amostras de ambientes, também foi avaliado o animal vivo e produtos finais, foram criadas 9 categorias.

Das 1500 amostras onde foram realizadas análises de sequenciamento NGS (16S) provenientes de 8 unidades industriais de frigoríficos, foram selecionadas 277 (Figura 17) das quais eram etapas em comum entre 7 unidades para avaliar significância estatística entre bactérias do produto final (categoria 09) em relação a todas as etapas do processo produtivo (amostras de carcaça e ambiente).

Figura 17 - Número de amostras por categoria.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Categorização

Foram categorizadas todas as 277 amostras em 10 grupos distintos como observado na Figura 18.

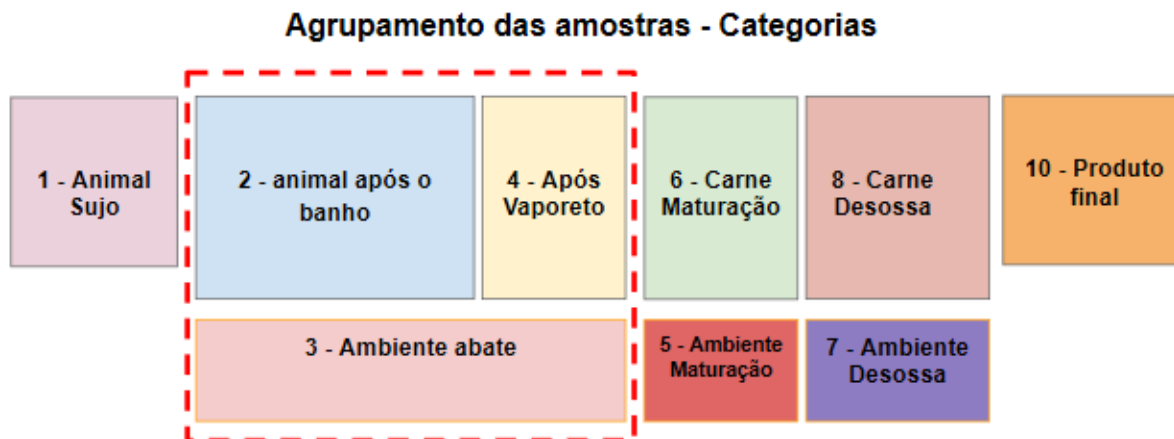


Figura 18 - Categorização das amostras visando acompanhar etapas do processo produtivo e separando amostras ambientais de produto de processo em grupos distintos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

*O ambiente de abate considerou amostras desde o animal após o banho até a carcaça pós vaporeto.

Com base nessa categorização, foi feita uma análise de dados de abundância diferencial Log2FC comparando bactérias presentes no produto final contra todos os outros 9 grupos. A identificação de espécies diferencialmente abundantes nos tratamentos foi realizada com o pacote de programas DESeq2 version 1.18.1 (Love et al., 2014).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

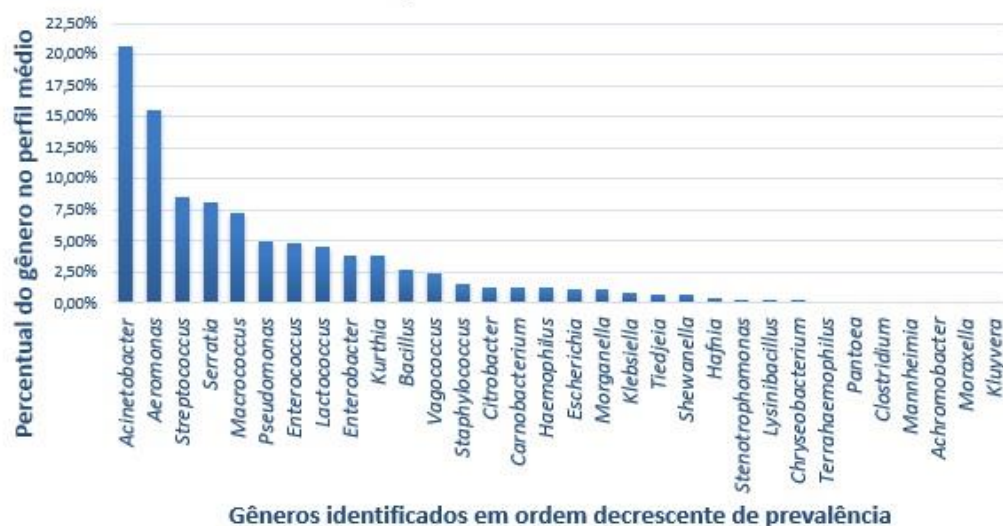
4.1 CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE FRIGORÍFICOS ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DE AMPLICONS.

Das 1500 amostras que foram coletadas, 53 eram produtos finais, sendo que 41 produtos finais foram recém embalados no frigorífico e enviados para análise (24 h a 48 h). Os outros que apresentavam algumas semanas a mais, possuíam uma perda de diversidade bacteriana nas amostras.

Nos 41 produtos finais foram identificados 47 gêneros de bactérias, dentre os mais prevalentes podemos observar na Figura 19.

Figura 19 - Gêneros mais abundantes em um perfil médio de 41 amostras de produtos finais analisados.

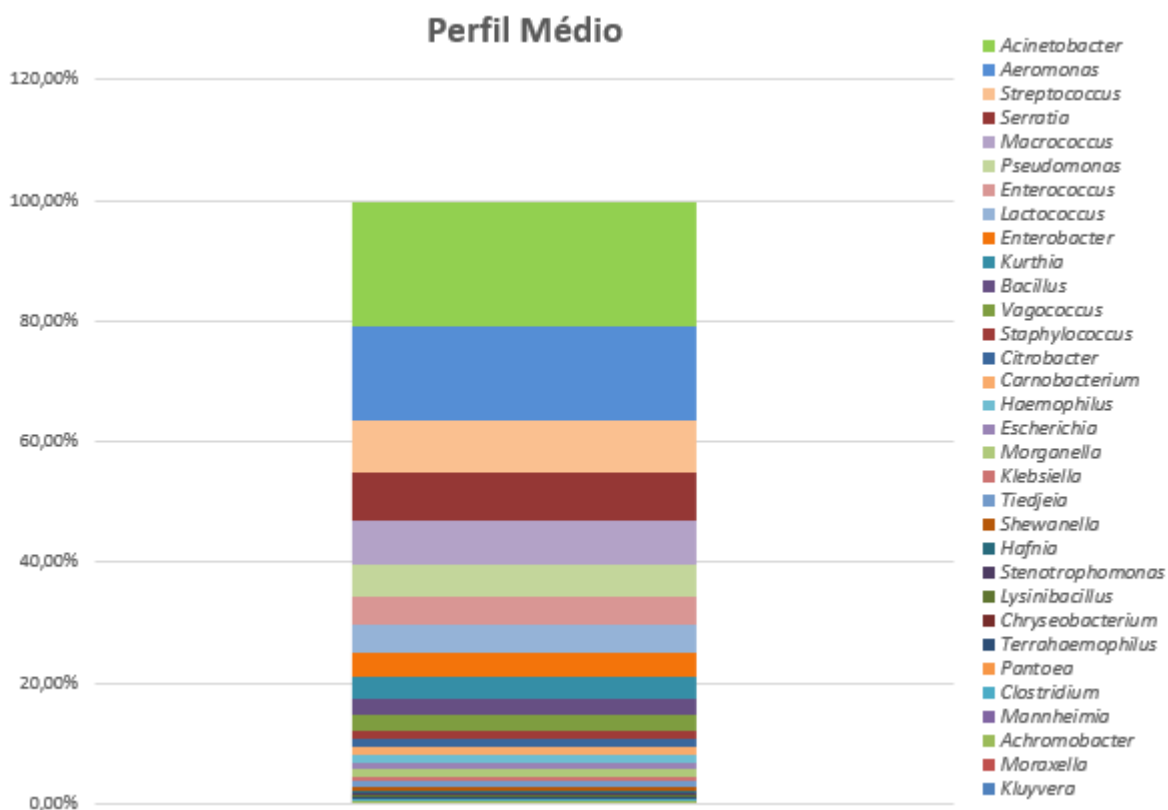
Gêneros mais abundantes em um perfil médio de 41 produtos finais



Fonte: Elaborada pelo autor

Com o intuito de criar um perfil microbiológico médio (Figura 20), foi retirada a média aritmética das sequências de DNA lidas de todos os gêneros identificados para criar uma amostra única representativa de um perfil microbiológico das carnes analisadas.

Figura 20 - Perfil médio de bactérias encontradas nas 41 amostras de produto final recém embalados (24-48h).

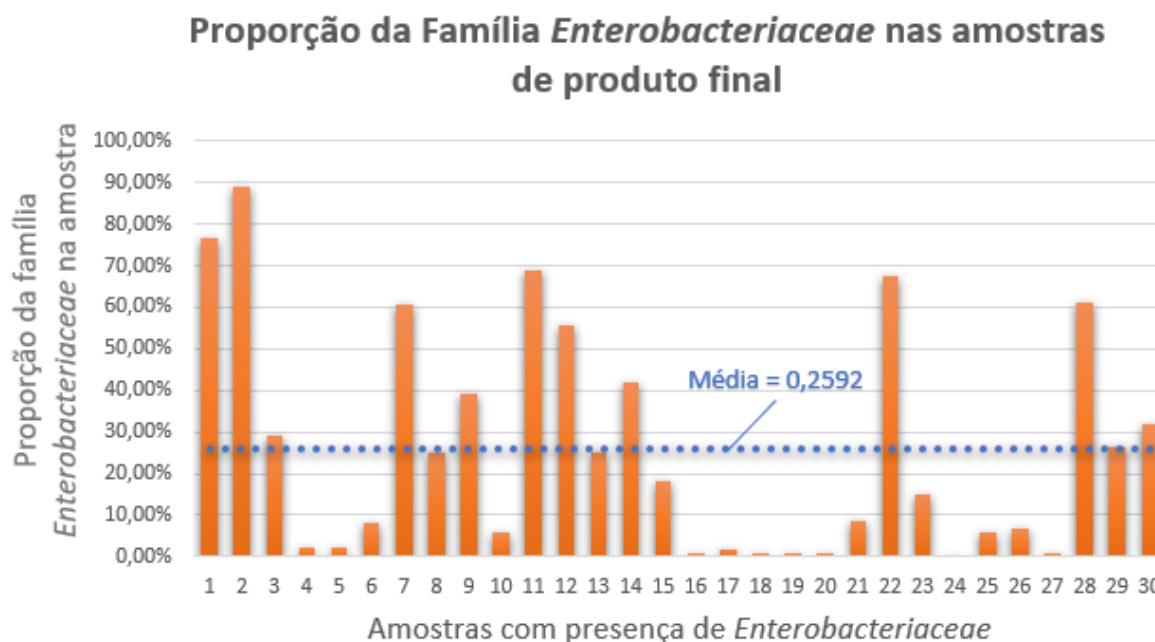


Fonte: Elaborado pelo autor

Segundo a literatura, os gêneros que ocorrem na carne recém cortada frequentemente são *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psicrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, bactérias do ácido láctico (BAL) e diferentes gêneros da família de *Enterobacteriaceae*. A maioria deles encontrados. Variações estas que ocorrem devido a diversos fatores desde o manejo do animal, a forma que foi abatido, os tipos de corte, as variações das características físico-químicas e microbiológicas de como foi processada e embalada. Porém, o relevante para esse trabalho é avaliar a prevalência de grupos de deteriorantes mais conhecidos e relacionados a blown pack nos produtos finais analisados e identificar diferenças significativas dos mesmos nas etapas do processo.

Pesquisando a presença da Família *Enterobacteriaceae* em produtos finais, foi observado que 56,6% (30 de 53 avaliadas) das amostras possuía pelo menos uma espécie dessa família. Entre as 30 amostras com esses microrganismos, do total de bactérias identificadas em média 25,92% pertenciam a essa família conforme Figura 21.

Figura 21 - Proporção de Enterobacteriaceae nas amostras positivas para essa família.



Fonte: Elaborada pelo autor

Depois da família *Enterobacteriaceae* uma das famílias mais frequentes tanto em quantidade quanto em dispersão nas amostras de produto final é a família *Moraxellaceae*, onde quase 100% dos gêneros encontrados foram de *Acinetobacter*. As espécies *A. baumannii* estavam presentes em 20 das 53 amostras avaliadas, em uma proporção média de 12,59% do total de bactérias identificadas nas 20 amostras. Outras espécies de *Acinetobacter* também encontradas em 35 amostras e em proporções menores como: *Acinetobacter xylosoxidans*, *A. wautersii*, *A. beijerinckii*, *A. bereziniae*, *A. bouvetii*, *A. calcoaceticus*, *A. guillouiae*, *A.*

gyllenbergii, *A. haemolyticus*, *A. jhonsonii*, *A. junii*, *A. nosocomialis*, *A. oleivorans*, *A. seohaensis*, *A. soli*, *A. tjernbergiae*, *A. ursingii*, *A. venetianus*.

Segundo Lupo et al. (2014), *Acinetobacter baumannii* é um dos patógenos gram-negativos mais letais, e está espalhando pelo mundo causando surtos em hospitais. Em geral, faltam dados sobre a clonalidade de *A. baumannii* a partir de alimentos, o que impede qualquer especulação sobre a eventual troca de clones de *A. baumannii* entre alimentos e ambientes clínicos. Porém a presença de *A. baumannii* na carne pode representar uma preocupação adicional para a saúde pública, porque a carne pode servir como um veículo para *A. baumannii*, que poderia se espalhar para a comunidade e hospitais. Lupo et al. pela primeira vez, determinou a clonalidade de *A. baumannii* identificado em carne. Parte dos identificados constituíam três novos complexos clonais (isto é, CC277, CC360 e CC346), que eram todos isolados de carne de aves, sugerindo um possível novo reservatório, bem como a difusão clonal de *A. baumannii* na cadeia alimentar. Incluindo cepas resistente à piperacilina-tazobactam, ceftazidima, ciprofloxi-acin, colistina e / ou tetraciclina.

Microrganismos como *Acinetobacter spp.* e *Enterobacteriaceae* além de já terem sido relatados como microrganismos associados a deterioração de carne bovina em determinadas condições que acabam gerando grandes perdas financeiras para frigoríficos. São também relatados no estudo de Gupta et. al (2019) que pesquisou na grande base de dados de hospitais dos EUA, e encontrou altas taxas de resistência antimicrobiana de *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter spp.* isolados de pacientes internados.

A *Brochothrix thermosphacta* não foi encontrada em produtos finais mesmo tendo sido encontrada em amostras de ralo no ambiente de desossa, ralo no ambiente de abate, na base de racks da câmara de resfriamento, exsudado do piso na câmara de resfriamento, colméia do evaporador na desossa e em utensílios na sala de utensílios.

4.2 ANÁLISE COMPARATIVA DE PERFIS MICROBIOLÓGICOS DE CARNES

No conjunto de 1500 amostras analisadas por sequenciamento rRNA (16S), 53 eram produtos finais (carne embalada à vácuo). E de fato o perfil de bactérias presentes nas amostras apresenta uma alta diversidade. Porém, com o objetivo de observar as bactérias alvo foi avaliada a presença de microrganismos apontados na literatura como deteriorantes de carnes embaladas à vácuo relacionados a grandes perdas econômicas na indústria ou com possível relação com estufamento Blown-Pack.

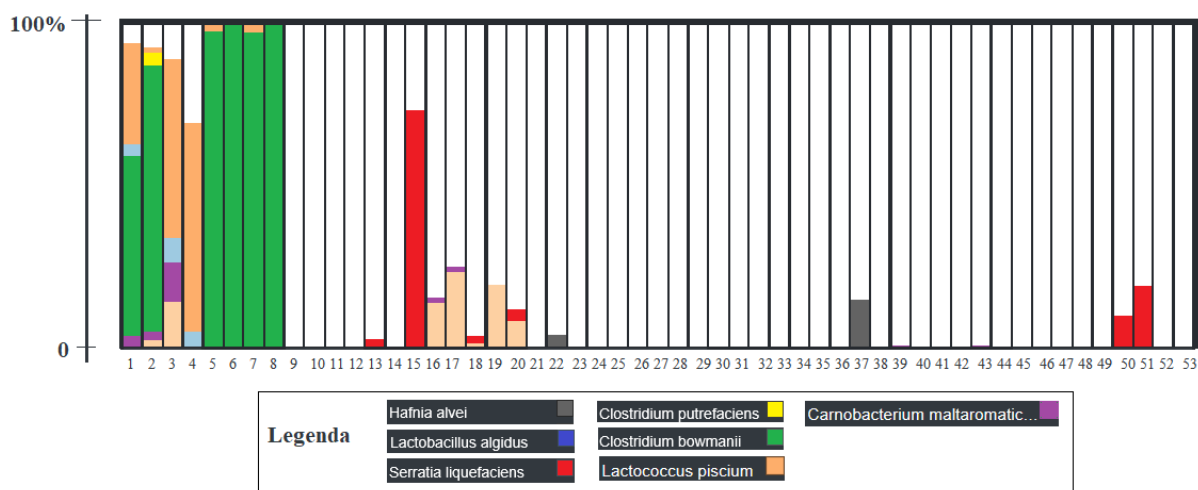
Abaixo espécies com possível relação com Blown Pack indicada pela revisão bibliográfica desse trabalho:

Espécies avaliadas (microrganismos alvo): *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus algidus*, *Clostridium algidicarnis*, *Clostridium algidixilanolictico*, *Clostridium estertheticum*, *Clostridium frigidicarnis*, *Clostridium gasigenes*, *Clostridium putrefaciens*, *Clostridium frigoriphilum*, *Clostridium tagluense-like*, *Clostridium bowmanii*, *Lactococcus piscium*, *Carnobacterium divergens* e *C. maltaromaticum*, *Brochothrix thermosphacta*.

4.2.1. Espécies encontradas nas 53 amostras de produto com possível relação com estufamento

Os possíveis indicadores de estufamento Blown Pack encontrados nas 53 amostras de produto final. Das 53 amostras avaliadas, 21 amostras apresentavam microrganismos típicos de estufamento Blown Pack em quantidades diversas, sendo que 10 amostras das 21 apresentavam mais de um microrganismo alvo pesquisado. Conforme Figura 22 abaixo:

Figura 22 - Plotagem da abundância relativa de cada bactéria alvo em sua respectiva amostra. Sendo 100% o total de bactérias identificadas na amostra. *A plotagem na figura significa a presença e ausência apenas das bactérias alvo da legenda selecionadas para todas as 53 amostras.



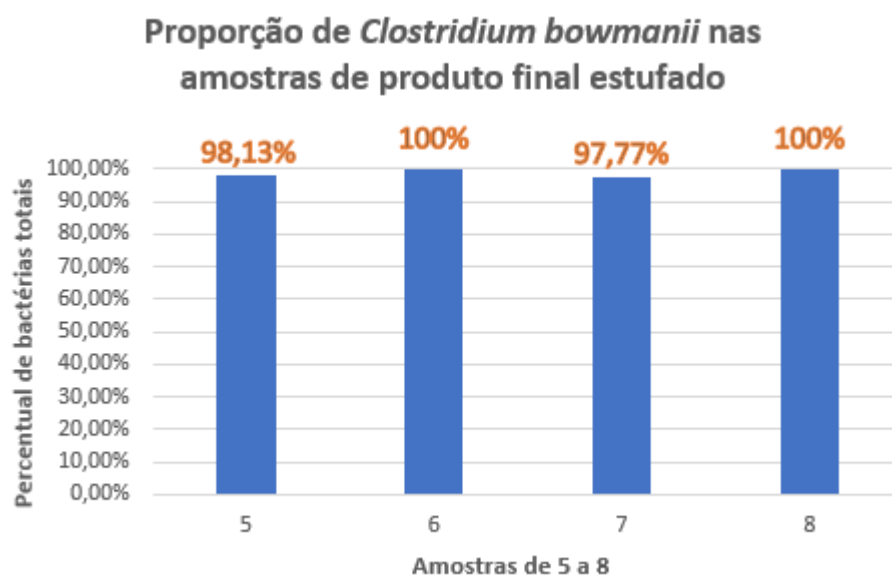
Fonte: Elaborada pelo autor

Vale observar que o *Clostridium bowmanii* apresenta o maior número de contagem de sequências de DNA lidas por amostra de todas as outras bactérias alvo (Blown Pack) selecionadas. Com uma média de 100.326 sequências de DNA lidas nas 4 amostras que apresentaram estufamento. A bactéria que apresenta o segundo maior número de contagens de sequências de DNA lidas por amostra é a *Serratia liquefaciens*, amostra 15, que visualmente não estava estufada, muito provavelmente devido a relativo baixo número de sequências desse microrganismo para causar o estufamento. Lembrando que o objetivo desse estudo, não é medir a quantidade exata em que uma bactéria causadora de Blown Pack estufaria visualmente um produto cárneo embalado à vácuo, mas sim chamar atenção para a presença e quantidades expressivas delas nos produtos, e avaliar posteriormente onde as mesmas foram identificadas no processo, na carcaça, e no animal. E além disso, observar a presença de deteriorantes e patógenos.

Spring, S. (2003) descreve em seu estudo um *Clostridium bowmanii* que possui os produtos de fermentação formados são butirato, acetato, formiato, etanol, lactato, 1-butanol, hidrogênio e dióxido carbono.

Das 53 amostras de carne embalada à vácuo, as embalagens que estavam visualmente estufadas tinham a presença do *Clostridium bowmanii*. Esse trabalho não exclui a possibilidade do *Clostridium bowmanii* estar associado ao estufamento dos 4 produtos finais (carne embalada à vácuo) devido às características fermentativas desse microrganismo e por essa espécie apresentar uma proporção maior que 97% das bactérias totais encontradas em todas as 4 amostras sequenciadas que apresentaram estufamento, além de ser um *Clostridium psicrotrófico* (Figura 23). Fica a sugestão para o desenvolvimento de novas pesquisas com um n amostral maior, na direção de caracterizar o *Clostridium bowmanii* e observar seu comportamento na matriz carne bovina embalada a vácuo refrigerada.

Figura 23 - Percentual de *Clostridium bowmanii* em 4 amostras de carne bovina embalada a vácuo visualmente estufadas analisadas por sequenciamento de DNA (16S).



Fonte: Elaborada pelo autor

Como a única outra espécie de DNA bacteriano encontrado nessas 4 amostras, além do *Clostridium baumannii*, foi da espécie *Lactococcus piscium* (na amostra 05 com 1,87% e na amostra 07 com 2,23%), que já foi relatado em casos de Blown Pack, levanta-se a hipótese de sucessão bacteriana. Existindo a possibilidade do *Lactococcus piscium* ter estufado as embalagens, e na sucessão das espécies, por competitividade o *Clostridium baumannii* teria eliminado ou reduzido a população de *Lactococcus piscium*.

4.3 ANÁLISE COMPARATIVA DE PERFIS MICROBIOLÓGICOS DE CARNES (PRODUTOS FINAIS ESTUFADOS) VERSUS ANIMAL VIVO, CARÇAÇA, AMBIENTE, E PRODUTO FINAL NÃO ESTUFADO.

Os microrganismos selecionados na revisão bibliográfica com possível relação com estufamento Blown Pack foram avaliados em termos de presença e ausência em outras etapas do processo produtivo, com as amostras desde o animal vivo ao produto final.

Dentro do n amostral de 1500 amostras foram utilizadas ferramentas biocomputacionais ®Neoprosecta para selecionar apenas as espécies a serem avaliadas em termos de presença ou ausência no processo.

Espécies avaliadas (microrganismos alvos): *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus algidus*, *Clostridium algidicarnis*, *Clostridium algidixilanolictico*, *Clostridium estertheticum*, *Clostridium frigidicarnis*, *Clostridium gasigenes*, *Clostridium putrefaciens*, *Clostridium frigoriphilum*, *Clostridium tagluense-like*, *Clostridium bowmanii*, *Lactococcus piscium*, *Carnobacterium divergens* e *C. maltaromaticum*.

A primeira ferramenta Biocomputacional utilizada foi o perfil genético que avalia a presença da espécie bacteriana em mais de um local. Ou seja, não aparecem no Perfil Genético espécies que estão em apenas uma amostra. Como resultado, foram encontradas as espécies: *Clostridium bowmanii*, *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter aerogenes*, *Lactobacillus sakei*, *Clostridium putrefaciens*, e *Lactobacillus algidus*, *Lactococcus piscium*, *Carnobacterium divergens* e *C. maltaromaticum*.

Tabela 4 - Quantidade de amostras onde foram encontradas as espécies e número de sequências de DNA total das espécies em todas as 1500 amostras.

Microrganismo	Quantidade de amostras	Quantidade de Sequências de DNA
Clostridium bowmanii	10	431.373
Hafnia alvei	14	25.553
Serratia liquefaciens	15	42.783
Enterobacter aerogenes	17	3.789
Lactobacillus sakei	2	11.159
Clostridium putrefaciens	4	2201
Lactobacillus algidus	3	334
Lactococcus piscium	7	59225
Carnobacterium maltaromaticum	16	6606
Carnobacterium divergens	13	39040

Fonte: Elaborado pelo autor

Pode-se observar que a espécie quantitativamente mais abundante dentre as espécies alvo avaliadas no perfil genético foi o *Clostridium bowmanii*, que tinha sua presença em 10 amostras. Dentre eles: produtos finais estufado, produtos finais sem estufamento, ralo central da câmara pulmão, exsudado do piso da câmara de resfriamento, junta do piso da parede de entrada da câmara de resfriamento. Com maior incidência nos produtos finais do que no ambiente. Importante ressaltar que existia uma semelhança genética de 100% na região 16S de todas as espécies de *Clostridium bowmanii* em 9 pontos identificados.

Observa-se que o segundo genótipo mais presente em termos quantitativos das espécies alvo avaliadas é o da *Serratia liquefaciens*. Inclusive é também o segundo mais disperso, estando presente em 15 amostras, sendo elas: amostras de produto final sem estufamento, na carcaça área de maturação, na plataforma de desossa, na esteira da desossa, na esteira rolante 03 da desossa, na esteira de osso, na esteira rolante da raspagem dos ossos e na bandeja de inox da coleta de recortes. Importante ressaltar que existia uma semelhança genética de 100% na região 16S de todas as espécies (o mesmo cluster) de *Serratia liquefaciens* nos 15 pontos identificados desde a carne na câmara de maturação, até a desossa e produto final embalado à vácuo.

A *Hafnia alvei* foi a terceira com maior número de sequências de DNA encontradas, e com presença em 14 amostras. Diferente da *Serratia liquefaciens* que possuía apenas um cluster de microrganismos semelhantes geneticamente, a *Hafnia alvei* apresentou 12 clusters desse microrganismo indicando espécies com diferenças genéticas na região 16S. Esses clusters não estavam presentes em apenas amostras independentes, alguns deles compartilhavam a mesma amostra. O que pode ocorrer devido à diversos fatores, dentre eles contaminação cruzada. O que chama a atenção, é que os 3 maiores clusters estavam presentes nas mesmas 11 amostras: desde a carne na câmara de maturação, carnes na entrada da desossa, evaporador da desossa, plataforma da desossa, aos produtos finais.

As principais espécies LAB detectadas neste estudo foram *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus piscium*, *Carnobacterium divergens* e *C. maltaromaticum*, que foram relatadas como ocorrendo na carne embalada a vácuo (HERNÁNDEZ-MACEDO et al., 2012; JIANG et al. 2010) e produzem gás a baixas temperaturas (HERNÁNDEZ-MACEDO et al., 2012; MONNET et al., 2002; SAKALA et al., 2002).

O *Lactococcus piscium*, das espécies com possibilidades de associação com estufamento blown pack, foi a segunda mais abundante encontrada com presença em 7 amostras e todas elas de produto final.

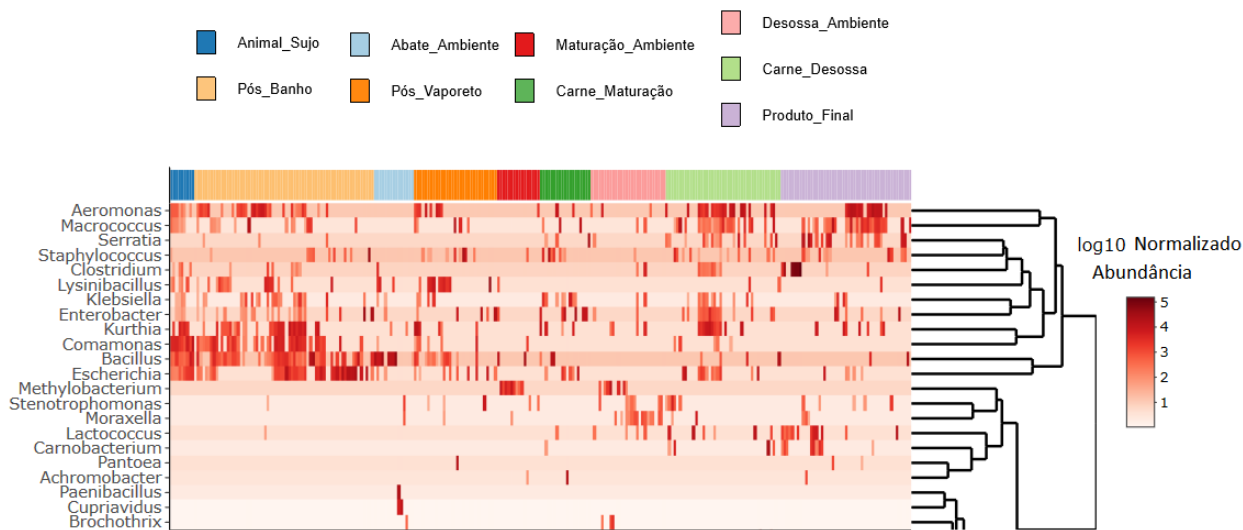
O genótipo das espécies alvo mais disperso foi o da *Carnobacterium maltaromaticum*, sendo identificado em 16 amostras, sendo elas: praticamente todas em produtos finais, com exceção de uma amostra do ralo e um corte na entrada da desossa.

4.3.1 Análises estatísticas dos 10 grupos de amostras

Vale ressaltar que devido à quantidade de pontos de coleta diferentes entre unidades frigoríficas diferentes foi necessário eliminar esses pontos das análises estatísticas, para poder agrupar as amostras em pontos semelhantes, e o resultado final representar o grupo de amostra a ser avaliado e esse grupo representar a região do frigorífico como descrito na metodologia desse trabalho.

Nesse grupo de 277 amostras, 137 gêneros de bactérias foram identificados, os 22 gêneros com maior abundância estão plotados no Heatmap de abundância da Figura 24.

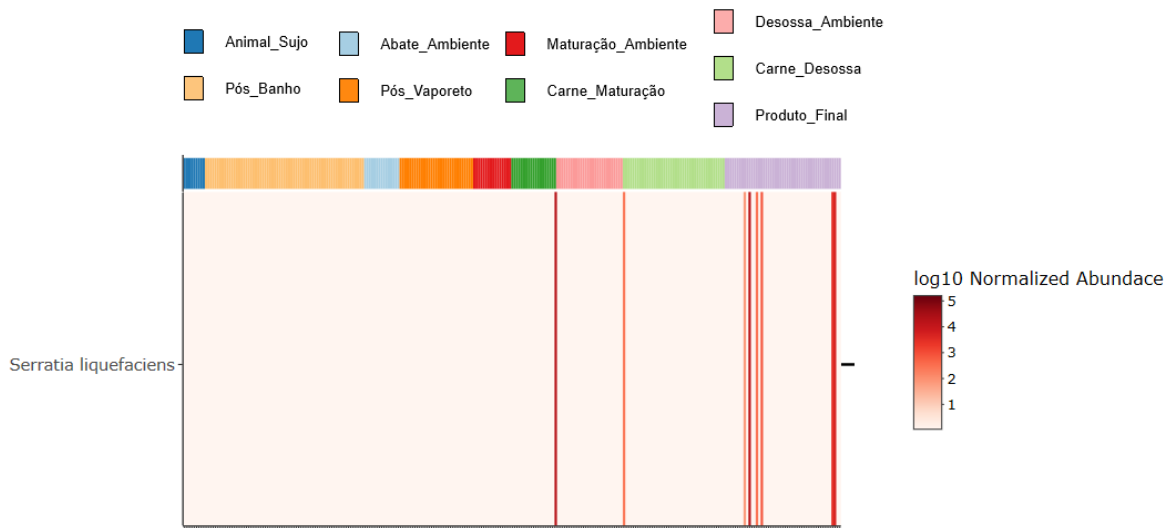
Figura 24 - Heatmap de abundância de todo processo, dos gêneros mais abundantes nas amostras.



Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 24 é um heatmap da abundância de gêneros para identificar os pontos de maior abundância de um determinado gênero ao longo do processo. O gráfico foi plotado com base em número de reads totais das espécies do gênero e por amostra. Como muitos gêneros foram encontrados, foram selecionados os gêneros com maior número de reads para a figura. Cada traço vermelho é uma amostra em sua região respectiva ao longo do processo. Mas o interessante é olhar a abundância do gênero ao longo do processo. Essa visualização, quando o desenho experimental da coleta é bem construído, consegue passar uma ideia do fluxo de dispersão dos microrganismos no processo, eficácia de barreiras microbiológicas, quais espécies ou gêneros estão mais presentes em cada etapa, e em alguns casos visualizar ocorrência de possíveis contaminações cruzadas que depois podem ser validadas analisando a clonalidade das espécies por sequenciamento completo de DNA. Esse perfil não é uma regra geral e sim uma “fotografia” que representa o momento da produção de um lote de produto. A plotagem por espécie ficou com muitos detalhes por esse motivo foi plotada por espécie, conforme Figura 25.

Figura 25 - Heatmap de abundância de espécie específica por amostra ao longo do processo.

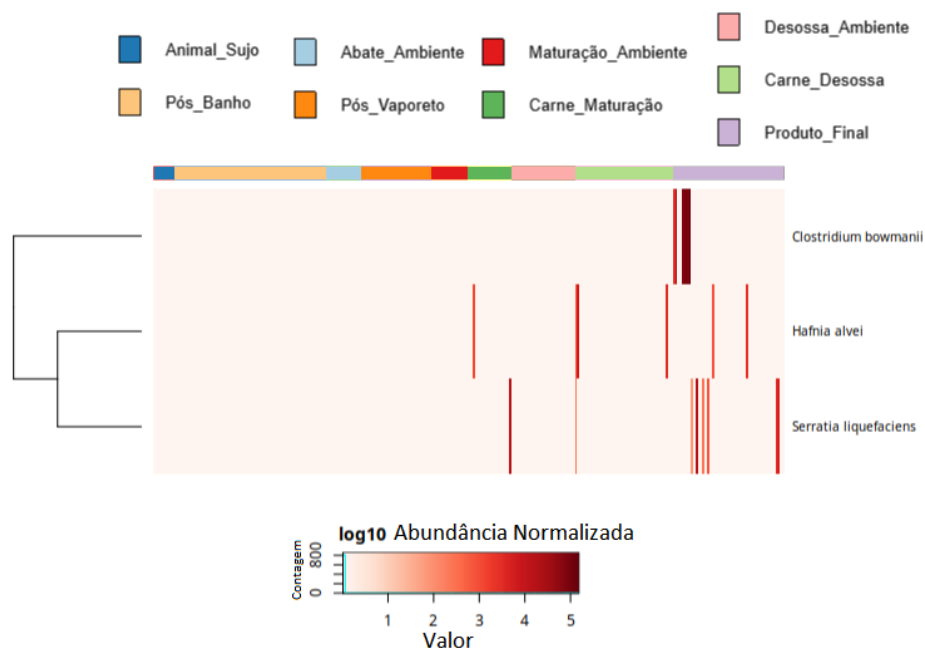


Fonte: Elaborada pelo autor.

O heatmap da Figura 25 também é a abundância em número de reads e avaliou onde foram identificadas as espécies e as quantidades dela em cada amostra ao longo do processo. Por exemplo, a *serratia* foi identificada com um número alto de reads pela primeira vez no processo na zona verde do heatmap, em uma amostra de carne na câmara de maturação, pela segunda vez em uma carne na entrada da desossa e depois em grande quantidade de reads no produto final embalado à vácuo.

Avaliando de forma global na Figura 26 é possível perceber que a abundância das espécies *Hafnia alvei* e *Serratia liquefaciens* apresentam abundância em amostras a partir da câmara de maturação (*H. alvei*) e carne na maturação (*S. liquefaciens*) até o produto final.

Figura 26 - Heatmap de abundância de algumas espécies específicas relacionadas a Blown Pack por amostra e ao longo do processo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O *C. bowmanii* apresenta abundância em amostras do produto final que estavam estufados por isso a cor vermelha mais intensa, e 2 amostras que não estavam estufadas e tinham quantidades relativamente menores desse microrganismo. O heatmap, por ter sido plotado utilizando as 277 amostras, algumas amostras da unidade frigorífica que foram identificadas espécies de *C. bowmanii* ficaram de fora dessa análise. Porém nestas amostras ambientais, o *C. bowmanii* foi encontrado no ralo da Câmara pulmão, no ralo da paletização, nas juntas do piso e exsudado em dois lugares do piso na câmara de resfriamento.

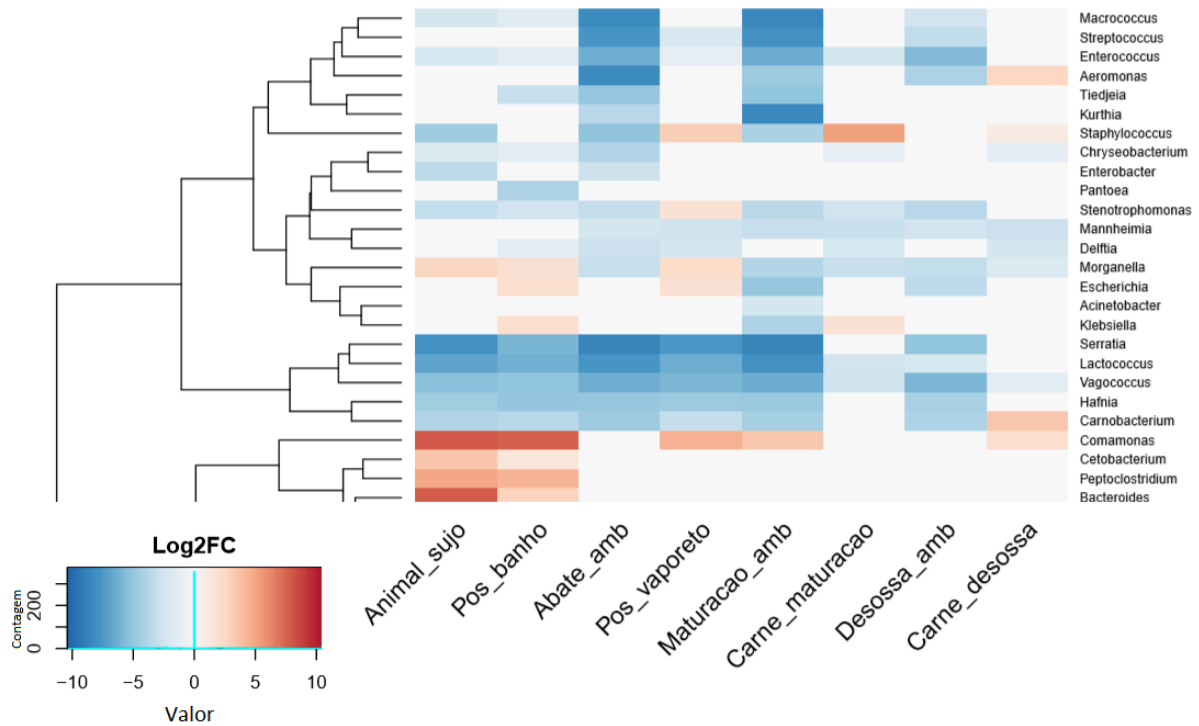
4.3.2 Abundância diferencial

Com base na categorização dos 10 grupos de amostras, uma análise de dados de abundância diferencial Log2FC foi feita comparando bactérias presentes no produto final contra todos os outros 8 grupos. A identificação de espécies diferencialmente abundantes nos tratamentos foi realizada com o pacote de programas DESeq2 version 1.18.1 (LOVE et al., 2014). E o resultado pode ser observado na Figura 27.

A abundância diferencial em Log2FC é um método estatístico de comparação genômica que facilita a visualização das diferenças realmente significativas entre amostras ou grupos de amostras. Nesse caso foi feita uma comparação do grupo de amostras do produto final com todas as etapas do processo para comparar abundâncias significativamente diferentes entre os grupos. As diferenças se tornam significativas quando Log2FC é maior que 2 ou menor que -2. A cor azul para quando o gênero ou espécie está mais abundante significativamente no produto final que no categoria avaliada. E a cor vermelha quando o gênero ou espécie está mais abundante significativamente na categoria analisada do que nos produtos finais. E quando a cor

é branca, a abundância diferencial entre os grupos não é significativa (o que poder ser 0 contra 0, ou quantidades parecidas nos dois grupos).

Figura 27 - Heatmap abundância diferencial dos gêneros - PRIMEIRO BLOCO

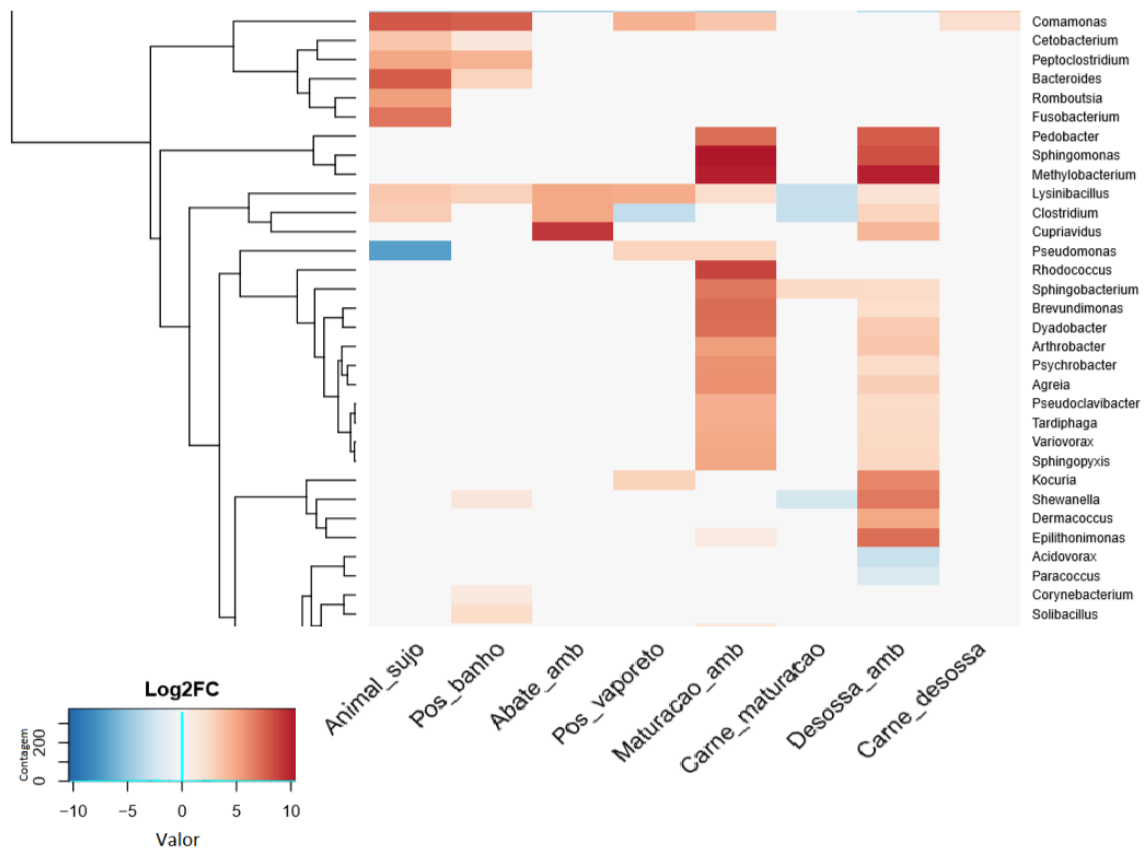


Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 27 observamos que o gênero *Macrococcus* e *Streptococcus* está diferencialmente mais abundante nas amostras do produto final do que no ambiente do abate e do ambiente da maturação. Já a *Comamonas* é um gênero que está diferencialmente mais abundante nas amostras de animal sujo e após o banho do que no produto final.

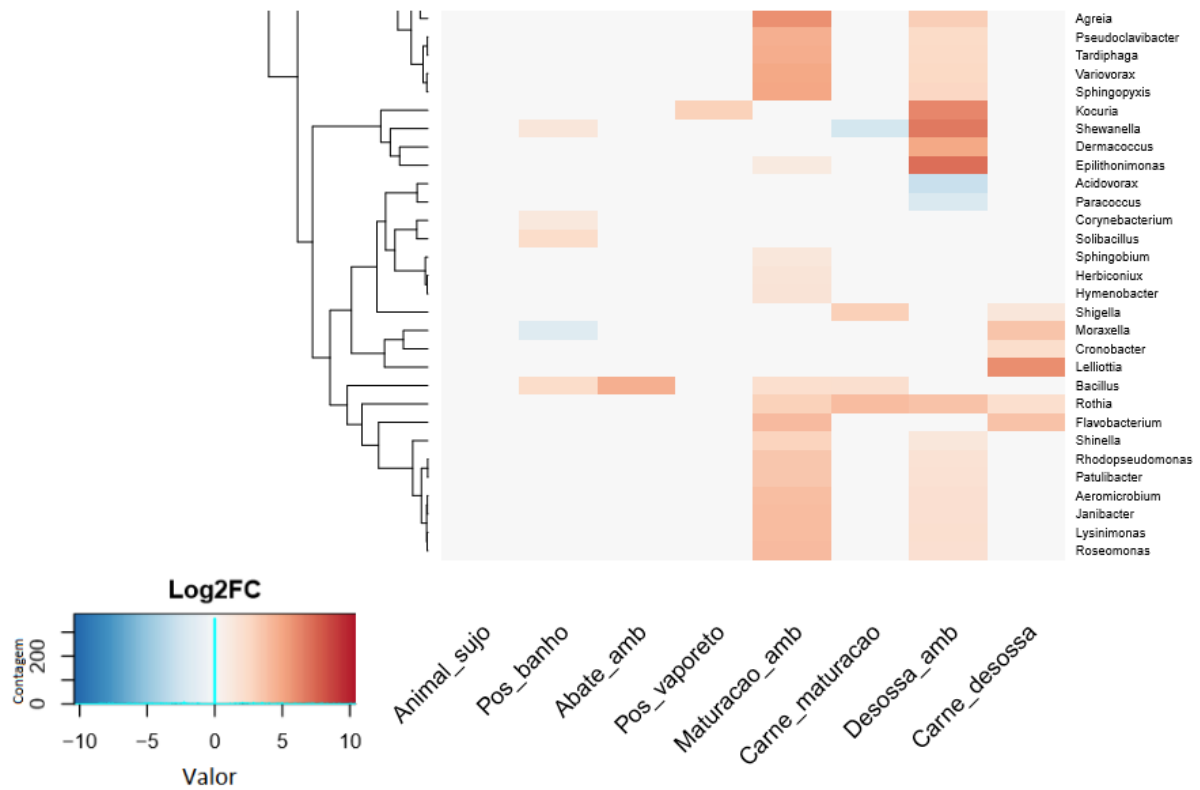
Na figura 28 - segundo bloco - é possível perceber a presença de vários gêneros no ambiente da maturação e ambiente de desossa que estavam mais abundantes significativamente nos ambientes do que no produto final. No abate há uma diferença significativa do gênero *Cupriavidus*.

Figura 28 - Heatmap abundância diferencial dos gêneros - SEGUNDO BLOCO.



Fonte: Elaborada pelo autor.

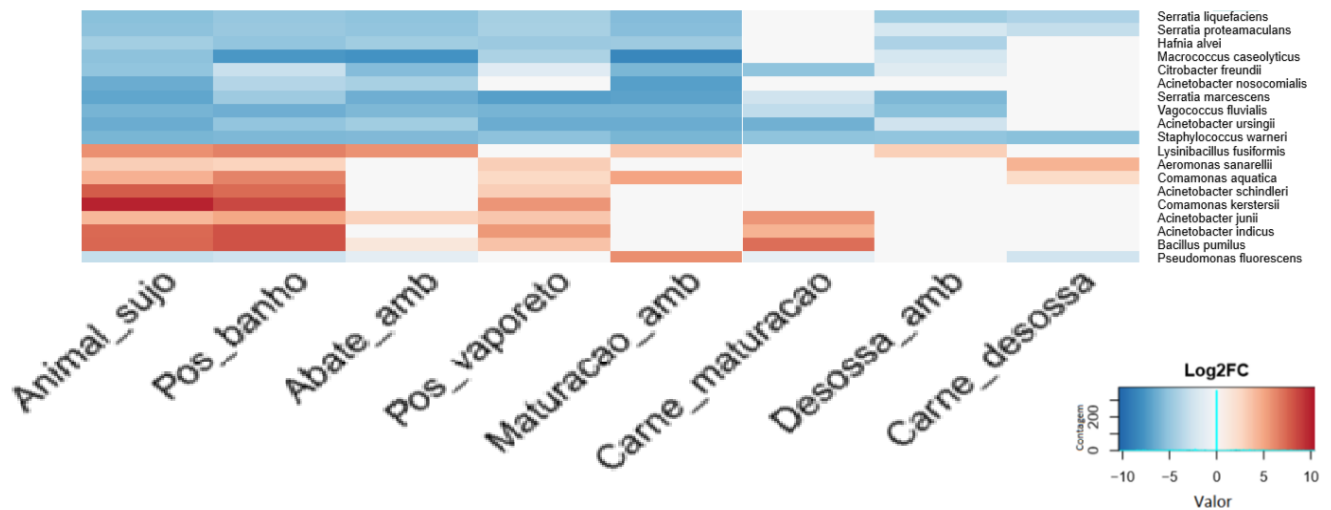
Figura 29 - Heatmap abundância diferencial dos gêneros - TERCEIRO BLOCO.



Fonte: Elaborada pelo autor.

As comparações de abundância diferencial entre os grupos ajudam a mapear as reais diferenças significativas entre as categorias versus o produto final, de forma complementar à abundância representada na Figura 24, abundância total em número de reads. A visualização por espécie auxilia em comparações mais precisas quando conhecemos características das mesmas e podemos correlacionar com a sua presença em ambientes ou carne. Como por exemplo, a Figura 30.

30 - Heatmap abundância diferencial por espécie.



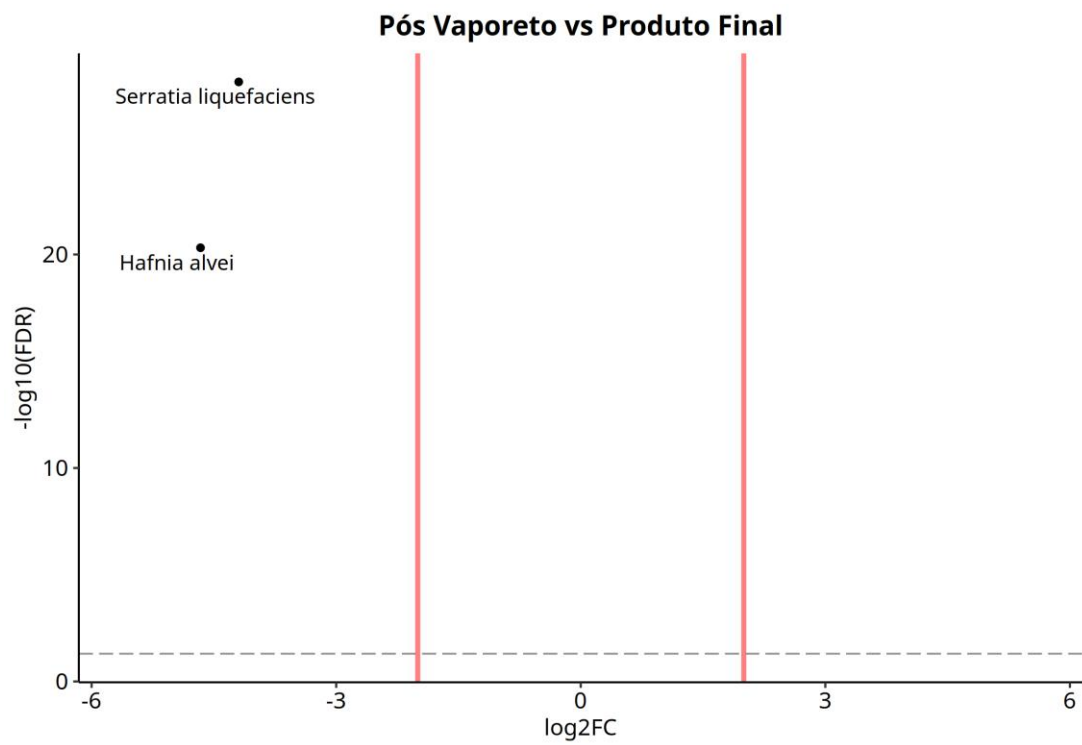
Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 30, a visualização por espécie permite observar que a *Hafnia alvei* e a *Serratia liquefaciens*, por exemplo, estavam menos abundantes significativamente no início do processo do que no final. E o inverso ocorre com as *Comamonas aquatica*, *Comamonas kerstersii* e *Acinetobacter schindleri*, *A. juni*, e *A. indicus*.

A visualização por espécie permite avaliar melhor o gênero. Espécies do mesmo gênero podem ter relações inversas como a *Acinetobacter nosocomialis* que estava mais abundante significativamente no produto do que no início do processo (nas primeiras categorias).

Analisando as Figuras 31, 32 e 33 podemos perceber as espécies com abundâncias diferenciais entre o grupo de amostras do produto final versus todas as categorias criadas. A interpretação se dá com espécies mais abundantes diferencialmente no alto do gráfico e o mais afastado possível do centro. Aplicando o mesmo corte do Log2FC maior que 2 e menor que -2 para significância estatística. E o eixo y é a falsa taxa de descoberta (FDR).

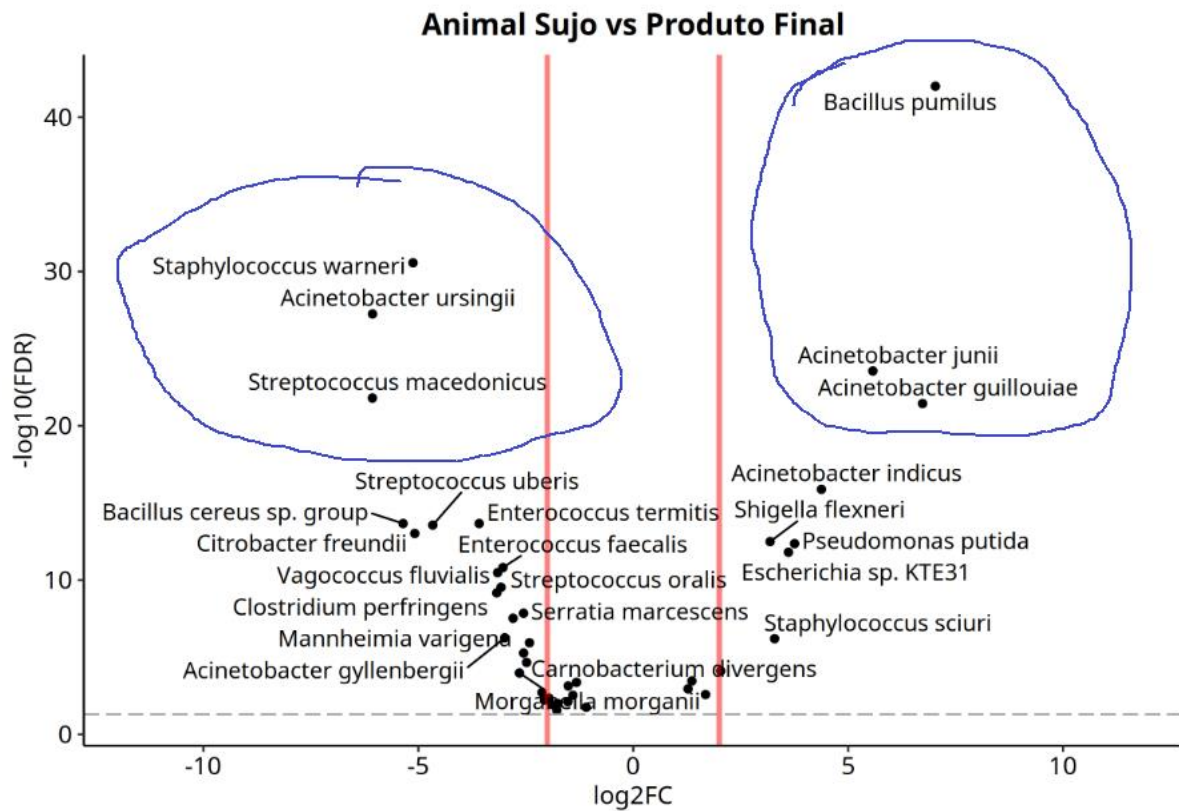
Figura 31 - Abundância diferencial entre amostras da categoria pós Vaporeto Vs Produto Final.



Fonte: Elaborado pelo autor.

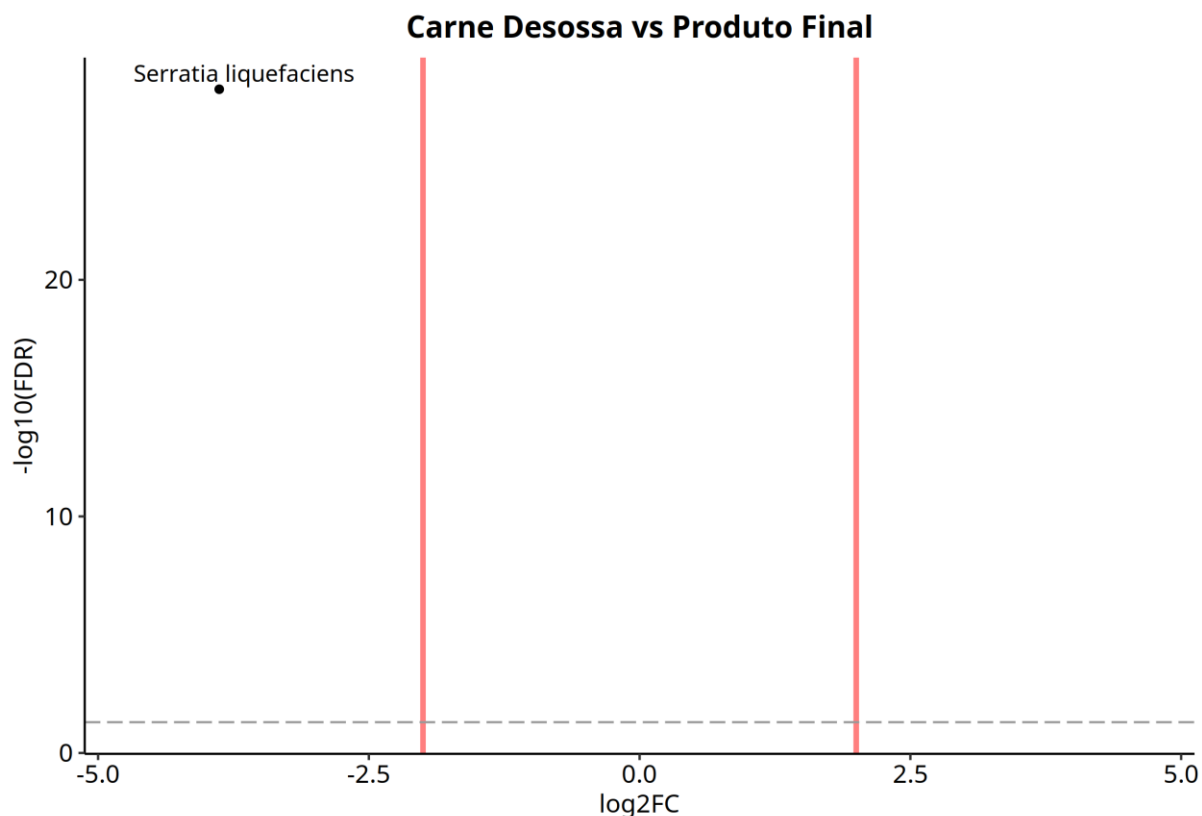
A *Hafnia alvei* e a *Serratia liquefaciens* são abundantemente significativas no produto final do que no pós vaporeto.

Figura 32 - Abundância diferencial entre amostras da categoria Animal Sujo Vs Produto Final.



As espécies circuladas em azul ao lado esquerdo da figura 30 possuem maior significância estatística e maior prevalência no produto final que no animal sujo. Já as espécies circuladas de azul à direita são mais prevalentes no animal sujo.

Figura 33 - Abundância diferencial entre amostras da categoria Carne Desossa Vs Produto Final.



Conforme Figura 33, a única espécie significativamente mais abundante no produto que na carne da desossa foi a *Serratia liquefaciens*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além das preocupações da indústria de carnes com a segurança dos alimentos em relação às bactérias patogênicas, existem perdas financeiras relacionadas com microrganismos deteriorantes que reduzem a vida de prateleira das carnes embaladas impactando diretamente o custo de produção, ocasionando embargos comerciais prejudiciais ao negócio e causando danos indiretos como danos à Marca.

A identificação de grupos e espécies de modo a observar a prevalência deles em determinados ambientes e suas diferenças significativas auxilia o controle de qualidade da indústria de alimentos. Isso pode auxiliar no projeto de novas soluções para aplicação de barreiras microbiológicas dimensionadas para os processos baseadas nos resultados medidos e posteriormente sendo validadas para os microrganismos de interesse.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, K.H., FLINT, S.H., BRIGHTWELL, G., 2010. Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packaged beef, lamb and venison. *International Journal of Food Science and Technology* 45, 1539–1544.

ALMEIDA, L., WALUS, C., BITTENCOURT, J. V. M., PICININ, C. T., 2017. Frequência de contaminação microbiológica em frigorífico. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. ISSN: 1981-3686.

ALTSCHUL et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

ANDERSEN, L. Preservation of meat products with a lactic acid bacteria culture: FloraCarn L-2. In: *Proceeding of 41 st International Congress of Meat Science and Technology*, v.2, p.303-304, San Antonio, TX., 1995.

BAYLIS, C.L., 2006. Enterobacteriaceae. In: Blackburn, C.W. (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 213–286

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São José do Rio Preto, v. 26, n. 4, p. 274-284, 2004.

BARROS, M. A. F., NERO, L. A., MONTEIRO, A. A., NELOTI, V., 2007. Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(4): 856-862, out.-dez. 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000400028>.

BEEBE, S. D.; VANDERZANT, C.; HANNA, M.O.; CARPENTER, Z.L.; SMITH, G.C. Effect of initial internal temperature and storage temperature on microbial-flora of vacuum packaged beef. *Journal of Milk and Food Technology*, Ames, v.39, p.600– 605, 1976.

BLICKSTAD, E., MOLIN, G., 1983. The microbial flora of smoked pork loin and frankfurter sausage stored in different gas atmospheres at 4 °C. *Journal of Applied Bacteriology* 54, 45–56.

BLICKSTAD, E., ENFORS, S.O., MOLIN, G., 1981. Effect of hyperbaric carbon dioxide pressure on the microbial flora of pork stored at 4 or 14 °C. *Journal of Applied Bacteriology* 50, 493–504.

BOEREMA, J.A., BRODA, D.M., BELL, R.G. Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing ‘blown pack’ spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culturebased and molecular detection procedures. *Letters in Applied Microbiology* v.36, p.406–411, 2003.

BJÖRKROTH, K. J., VANDAMME, P. & KORKEALA, H. J. Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, p.3313–3319, 1998.

BOTTGER, E. C. 1989. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 65:171–176.

BORCH, E., KANT-MUEMANS, M.-L., BLIXT, Y., 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 103–120.

BORGES, J. T. S; FREITAS A. S. Aplicação do sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) no processamento de carne bovina fresca. *Boletim de Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*. Curitiba, v. 20, n.1, p.1-18, 2002.

BRENNER, D.J. Introduction to the family Enterobacteriaceae, in the Prokaryotes. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W; SCHLEIFER, K.H. (Ed.). *A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. 2 ed. New York: Springer Verlag, 1992. p. 2673-95.

BRIGHTWELL, G., CLEMENS, R., URLICH, S., BOEREMA, J., 2007. Possible involvement of psychrotolerant Enterobacteriaceae in blown pack spoilage of vacuum-packed raw meats. *International Journal of Food Microbiology* 119, 334–339.

BRODA, D.M.; DeLACY, K. M.; COOK, R.L. The Microbiology of Blown Packs. In: *MEAT INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE*, 28., 1994, New Zeland. Fresh meat, p.467-471, 1994.

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.

BRODA, D. M. Prevalence of cold-tolerant clostridia associated with vacuum-packed beef and lamb stored at abusive and chill temperatures. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.40, p.93-98, 1997.

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.

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.

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.

BOLTON, D. J., CARROLL, J., & WALSH, D. (2015). A four-year survey of blown pack spoilage *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* on beef primal cuts. *Letters in Applied Microbiology*, 61(2), 153–157. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12431>.

BUENO, C. P., 2009. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ISOLAMENTO DE CLOSTRÍDIOS PSICROFÍLICOS E PSICROTRÓFICOS ASSOCIADOS À DETERIORAÇÃO DE CARNES REFRIGERADAS EMBALADAS A VÁCUO. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Ciência Animal.

CASABURI, A., DE FILIPPIS, F., VILLANI, F., & ERCOLINI, D. (2014). Activities of strains of *Brochothrix thermosphacta* in vitro and in meat. *Food Research International*, 62, 366–374. doi:10.1016/j.foodres.2014.03.019.

CANTONI, C., BERSANI, C., BREGOLI, M., BERNARDINI, M., 2000. *Brochothrix thermosphacta* in meat and some meatproducts. *Industrie Alimentari* 39, 976–979.

CARPENTE, L., CERDEIRA-PENA, A., LORENZO-FREIRE, S., PLACES, A. S. Optimization in Sanger sequencing. *ELSEVIER Journal. Computers and Operations Research* 109 (2019) 250–262

CAPORASO JG, LAUBER CL, WALTERS WA, BERG-LYONS D, HUNTLEY J, FIERER N, OWENS SM, BETLEY J, FRASER L, BAUER M, GORMLEY N, GILBERT JA, SMITH G, KNIGHT R: Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012, 6:1621–1624.

CARVALHO, E.P. Textos acadêmicos: Microbiologia de alimentos. Lavras: UFLA. 128 p. 2001.

CASTELLANO, P.H., HOLZAPFEL, W.H., VINGOLO, G.M., 2004. The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL705. *Food Microbiology* 21, 291–298.

CHEN, K., H. NEIMARK, P. RUMORE, AND C. R. STEINMAN. 1989. Broad-range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 57:19–24.

CLARRIDGE, J.E., (October 2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews.* 17 (4): 840–62, table of contents. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004. PMC 523561. PMID 15489351.

COCK, P. J. A et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, v. 25, n. 11, p. 1422–1423, 2009.

Collins, F. S., Morgan M., Patrinos A., 2003. The human genome project: lessons from large-scale biology. *Science.* 300(5617):286–290.

CORREA, W. M.; CORREA, C. N. *Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos.* Botucatu : Editora Medsi, 1992.

DALGAARD, P. Evaluation and prediction of microbial fish spoilage. 1993. Thesis (PhD) - Royal veterinary and Agricultural University, Copenhagen, 1993.

Dalton, H.K., Board, R.G., Davenport, R.R., 1984. The yeasts of British fresh sausage and minced beef. *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 50, 227 e 248.

DAINTY, R.H; EDWARDS, R.A; HIBBARD, C.M. The relationship of bacterial numbers and types to diamine concentration in fresh and aerobically stored beef, pork and lamb. *Journal of Food Technology*, Oxford, v. 18, n. 6, p. 777-788. 1983.

Dainty, R.H., Edwards, R.A., Hibbard, C.M., 1989. Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 49, 473–486.

DAINTY, R.H.; MACKEY, B.M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.73, p. 1035-1145, 1992.

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

DeSANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

DICKSON, J. S.; ANDERSON, M. E. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: A review. *Journal of Food Protection*, v. 55, n. 2, p. 133-140, 1992.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acessado em 17/06 de 2019.

DORN-IN, S., SCHWAIGER, K., SPRINGER, C., BARTA, L., ULRICH, S., GAREIS M.. Development of a multiplex qPCR for the species identification of *Clostridium estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. bowmanii* and *C. tagluense*-like from blown pack spoilage (BPS) meats and from wild boars. *International Journal of Food Microbiology*, v. 268 (2018) p. 162-165, 2018.

DOULGERAKI, A.I., ERCOLINI, D., VILLANI, F., NYCHAS, G.J. E., 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology* 157 (2012) 130–141.

DROSINOS, E.H., Nychas, G.J.E., 1997. Production of acetate and lactate in relation to glucose content during modified atmosphere storage of gilt-head seabream (*Sparus aurata*) at 0±1°C. *Food Res. Int.* 30, 711e717.

ERCOLINI, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food: a review. *Journal of Microbiological Methods* 56, 297–314.

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

ENFORS, S.-O., MOLIN, G., TERNSTROEM, A., 1979. Effect of packaging under carbon dioxide, nitrogen or air on the microbial flora of pork stored at 4 °C. *Journal of Applied Bacteriology* 47, 197–208.

ERICHSEN, I., MOLIN, G., 1981. Microbial flora of normal and high pH beef stored at 4 °C in different gas environments. *Journal of Food Protection* 44, 866–869.

ERLICH, H. A. (1 de novembro de 1989). Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Immunology (em inglês)*. 9 (6): 437–447. ISSN 0271-9142. doi:10.1007/bf00918012.

EWING B, GREEN P. (1998): Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8(3):186–194.

FADROSH, D. W., MA, B., GAJER, P., SENGAMALAY, N., OTT, S., BROTMAN, R. M., RAVEL, J., 2014. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform.

FELIPE, L. M., 2008. ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DA FAMÍLIA Enterobacteriaceae E Clostridium estertheticum COM A DETERIORAÇÃO “BLOWN PACK” EM CORTES CÁRNEOS EMBALADOS A VÁCUO. Dissertação de Mestrado (Medicina Veterinária). UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Julio de Mesquita Filho”. JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL.

FELSENSTEIN, J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

FONTANA, C., COCCONCELLI, P.S., VIGNOLO, G., 2006. Direct molecular approach to monitoring bacterial colonization on vacuum-packaged beef. Applied and Environmental Microbiology 72, 5618–5622.

GARRITY, G. M., AND J. G. HOLT. 2001. The road map to the manual, p. 119–166. In G. M. Garrity (ed), Bergey’s manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag, New York, N.Y.

GILL, C.O., 1996. Extending the storage life of raw chilled meats. Meat Science 43, 99–109.

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

GRAM, L., L. RAVN, M. RASCH, J. B. BRUHN, A. B. CHRISTENSEN, AND M. GIVSKOV. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology, v. 78, p.79–97, 2002.

GRAU, F.H. Role of pH, lactate, and anaerobiosis in controlling the growth of some fermentative Gram-negative bacteria on beef. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.42, p. 1043- 50, 1981.

GUERRERO, I.; TAYLOR, A. J. Meat surface decontamination using lactic acid from chemical and microbial sources. Lebensm. – Wiss. Technol. v.27 , p.201-209, 1994.

GUPTA V., YE G., OLESKY M., LAWRENCE K., MURRAY J., YU K., National prevalence estimates for resistant Enterobacteriaceae and Acinetobacter species in hospitalized patients in the United States. International Journal of Infectious Diseases (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.06.017>.

HAN, H., SCHEPARTZ, A., PELLEGRINI, M., & DERVAN, P. B. (1994). Mapping RNA regions in eukaryotic ribosomes that are accessible to methidiumpropyl-EDTA.Fe(II) and EDTA.Fe(II). *Biochemistry*, 33, 9831e9844.

HANNA, M.O; SMITH, G.C.; HALL, L.C.; VANDERZANT, C. Role of hafnia alvei and Lactobacillus species in the spoilage of vacuum-packaged striploin steaks. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 42, n.7, p. 569-571, 1979.

HARMSSEN, D., AND H. KARCH. 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News* 70:19–24.

HAYES, P.R. *Food Microbiology and Hygiene*. Elsevier: London, 1985. p. 80-139.

HUGENHOLTZ, P., GOEBEL, B.M., PACE, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180, 4765–4774.

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

HERNÁNDEZ-MACEDO, M. L., CONTRERAS-CASTILLO, C. J., TSAI, S. M., DA CRUZ, S. H., SARANTOPOULOS, C. I. G. L., PADULA, M., & DIAS, C. T. S. (2012). Gases and volatile compounds associated with micro-organisms in blown pack spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *Letters in Applied Microbiology*, 55(6), 467–475. doi:10.1111/lam.12004

HILARIO, E.; BUCKLEY, T. R; YOUNG, J. M. Improved resolution of the 4670 ERCOLINI et al. *Applied and Environmental Microbiology* phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of atpD, carA, recA and 16S rDNA. *Antonie Leeuwenhoek* v. 86, p. 51–64, 2004.

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.

HOOD, D.E.; MEAD, G.C. Modified atmosphere storage of fresh meat and poultry. In: PARRY, R.T. (Ed.). *Principles and applications of modified atmosphere packaging of food*. London: Blackie Academic & Professional, 1993. p.269-298.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9. ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HUIS IN'T VELD, J.H.J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*. v. 33, p. 1-18, 1996.

ILLUMINA. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. Nota Técnica. Pub. No. 770-2012-008-B, 2017.

Disponível em: www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html. Acessado em: 02/05/2019.

ILLUMINA. Quality Scores for Next-Generation Sequencing Assessing sequencing accuracy using Phred quality scoring. Nota Técnica. Pub. No. 770-2011-030 Current as of 31 October 2011.

Disponível em: www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html. Acessado em: 02/05/2019.

ILLIKOUD, N., ROSSERO, A. CHAUVET, R., COURCOUX, P., PILET, M.F., CHARRIR, T., JAFFRES, E., ZAGOREC, M., 2018. Genotypic and phenotypic characterization of the food spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*, *Food Microbiology*.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.015>.

ILLIKOUD, N., KLOPP, C., ROULET, A., BOUCHEZ, O., MARSAUD, N., JAFFRÈS, E., & ZAGOREC, M. (2018). One complete and three draft genome sequences of four *Brochothrix thermosphacta* strains, CD 337, TAP 175, BSAS1 3 and EBP 3070. *Standards in Genomic Sciences*, 13(1). doi:10.1186/s40793-018-0333-z.

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.

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 9, DE 8 DE ABRIL DE 2009. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA.

JACKSON, T. C., ACUFF, G. R.; DICKSON, J.S. Meat, poultry, and seafood, p. 83–100. In M. P. Doyle and T. J. Beuchat (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington, D.C., 2001.

JAMUAR SS, LAM AT, KIRCHER M, ET al. Somatic mutations in cerebral cortical malformations. *N Engl J Med*. 2014;371(8):733-743.

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.

KABISCH, J., ERL-HONING, C., WENNING, M., BOHNLEIN, C., GAREIS, M., PICHNER, R. Spoilage of vacuum-packed beef by the yeast *Kazachstania psychrophila*. Alemanha: Kulmbach, 2015.

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.

KOLBERT, C. P., PERSING, D. H. (June 1999). "Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens". *Current Opinion in Microbiology*. 2(3): 299–305. doi:10.1016/S1369-5274(99)80052-6. PMID 10383862.

KÖNIG K, Peifer M, Fassunke J, et al. Implementation of amplicon parallel sequencing leads to improvement of diagnosis and therapy of lung cancer patients. *J Thorac Oncol*. 2015;10(7):1049-1057.

KOZICH J.J., WESTCOTT S.L., BAXTER N.T., HIGHLANDER S.K., SCHLOSS P.D.: Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 2013, 79:5112–5120.

KULSKI, J.K., Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications, (2016), <https://doi.org/10.5772/61964>.

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

LAWSON, P., DAINTY, R.H., KRISTIANSEN, N., BERG, J., COLLINS, M.D., 1994. Characterization of a psychrotrophic clostridium causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov. *Letters in Applied Microbiology* 19, 153–157.

LEE, K. T.; YOON, C.S. Quality changes and shelf life of imported vacuum-packaged beef chuck during storage at 0°C. *Meat Science*, Barking, v.59, p. 71–77, 2001.

LOVE, M.I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 550, 2014.

LUPO A., VOGT, D., SEIFFERT, S. N., ENDIMIANI, A., PERRETEN, V.. Antibiotic Resistance and Phylogenetic Characterization of *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Commercial Raw. *Journal of Food Protection*, Vol. 77, No. 11, 2014, Pages 1976-1981.

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.

- MAUKONEN, J., SAARELA, M., 2009. Microbial communities in industrial environment. *Current Opinion in Microbiology* 12, 238–243.
- MCMURDIE, P.J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217, 2013.
- MOSCHONAS, G., BOLTON, D. J., SHERIDAN, J. J., & MCDOWELL, D. A. (2011). The effect of heat shrink treatment and storage temperature on the time of onset of “blown pack” spoilage. *Meat Science*, 87(2), 115–118.doi:10.1016/j.meatsci.2010.09.007.
- MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J. et al. Food microorganisms - health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. *Bulletin of International Dairy Federation*, n.377, p.4-9, 2003.
- MULLIS, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA In vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, v. 51, p. 263, 1986.
- NAKAZATO T, OHTA T, BONO H. Experimental design-based functional mining and characterization of high-throughput sequencing data in the sequence read archive. *PLoS One*. 8(10):e77910, 2013.
- NEWTON, K. G.; GILL, C. O. Development of anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology, Oxford*, v.44, p.91–95, 1978.
- NOCKER, A., BURR, M., CAMPER, A.K., 2007. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology* 54, 276–289.
- NIGAM, A., KNOERS, N. V. A. M., & RENKEMA, K. Y. (2018). Impact of next generation sequencing on our understanding of CAKUT. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.doi:10.1016/j.semcdb.2018.08.013
- NOTTINGHAM, P. M. Microbiology of carcass meats. In: BROWN, M. H. *Meat microbiology*, London: Applied Science, 1982. p.13-65.
- NYCHAS, G.-J.E., SKANDAMIS, P., 2005. Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In: Sofos, J.N. (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Meat*. CRC/ Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 461–502.
- NYCHAS, G.-J.E., SKANDAMIS, P.N., TASSOU, C.C., KOUTSOUMANIS, K.P., 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science* 78, 77–89.
- PACE, N. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734–740.

PALYS, T., L. K. NAKAMURA, AND F. M. COHAN. 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1145–1156.

PEREIRA, F., CARNEIRO, J., MATTHIESEN, R., VAN ASCH, B., PINTO, N., GUSMÃO, L., AMORIM, A. (December 2010). "Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences". *Nucleic Acids Research*. 38 (22): e203. doi:10.1093/nar/gkq865. PMC 3001097. PMID 20923781.

PENNACCHIA, C., ERCOLINI, D., VILLANI, F., 2011. Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiology* 28, 84–93.

PENNEY, N.; HAGYARD, C.J.; BELL, R.G. Extension of shelf life of chilled sliced roast beef by carbon dioxide packaging. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v.28, n.2, p. 181-91, 1993.

PETRUS, J. C. C., FERREIRA, S. R. S., Propriedades da carne. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC, 2018. 39 slides.

PIN, C., GARCIA DE FERNANDO, G.D., ORDONEZ, J.A., 2002. Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4441–4447.

PORTARIA Nº 46, DE 10 DE FEVEREIRO DE 1998. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA.

PRICE, M.N.; DEHAL, P.S.; ARKIN, A.P. FastTree: Computing Large Minimum-Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. *Molecular Biology and Evolution*, v. 26, p. 1641-1650, 2009.

QUAST C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.*, v. 41, n. D1, D590-D596, 2013.

RABELO, M. H. S., SILVA, E. K., PERES, A. P., 2014. Análise de Modos e Efeitos de Falha na avaliação dos impactos ambientais provenientes do abate animal. *Eng. Sanit. Ambient.* vol.19 no.1 Rio de Janeiro Jan./Mar. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522014000100009>.

R Development Core Team (2008). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

RAHMAN, M. T., UDDIN, M. S., SULTANA, R., MOUE, A., & SETU, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1).doi:10.3329/akmmcj.v4i1.13682.

RATTANASOMBOON, N., BELLARA, S.R., HARDING, C.L., FRYER, P.J., THOMAS, C.R., AL-RUBEAI, M., MCFARLANE, C.M., 1999. Growth and enumeration of the meat spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology* 51, 145–158.

RAUECKER, U. N.; DEL'ACQUA, T. V.; MESQUITA, A. Q., NUNES, I. A.; MESQUITA, A. J.. Detecção de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* incriminados na deterioração de carnes bovinas refrigeradas embaladas a vácuo através da técnica de PCR. In: III CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3, 2006, Goiânia. Anais eletrônicos do III Seminário de Pós-graduação da UFG [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006.

REID, R., FANNING, S., WHYTE, P., KERRY, J., & BOLTON, D. (2017). Comparison of hot versus cold boning of beef carcasses on bacterial growth and the risk of blown pack spoilage. *Meat Science*, 125, 46–52. doi:10.1016/j.meatsci.2016.11.012.

RELMAN, D. A. 1999. The search for unrecognized pathogens. *Science* 284: 1308–1310.

REUTER, J.A., SPACEK, D., SNYDER, M.P., High-throughput sequencing technologies, *Mol. Cell* 58 (2015) 586–597, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>.

RIVAS MA, BEAUDOIN M, GARDET A, et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent low-frequency variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet.* 2011;43(11):1066-1073.

ROSS MG, RUSS C, COSTELLO M, et al. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biol.* 2013;14(5):R51.

ROSA, V. P., 2009. *Clostridium estertheticum* E *Clostridium gasigenes*: DETECÇÃO, ISOLAMENTO, RASTREAMENTO E CONTROLE NO PROCESSAMENTO DE CARNE BOVINA RESFRIADA EMBALADA A VÁCUO. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos. CAMPINAS – SP 2009.

RUTHS J. A., MACEDO, L. M., NASCIMENTO, M. M. F. REAÇÃO DE POLIMERASE (PCR) EM CADEIA. GESTÃO DA INOVAÇÃO AGROINDUSTRIAL DIAGNÓSTICO MOLECULAR. p 11. Editora da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017. Disponível em:

<<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/>>

RUSSO, F., ERCOLINI, D., MAURIELLO, G., VILLANI, F., 2006. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in the presence of other meat spoilage microbial group. *Food Microbiology* 23, 797–802.

SACCHI, C. T., A. M. WHITNEY, L. W. MAYER, R. MOREY, A. STEIGERWALT, A. BORAS, R. S. WEYANT, AND T. POPOVIC. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.* 8:1117–1123.

SACCHI, C. T., A. M. WHITNEY, M. W. REEVES, L. W. MAYER, AND T. POPOVIC. 2002. Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. *J. Clin. Microbiol.* 40:4520–4527.

SACCHI, C. T., A. M. WHITNEY, L. W. MAYER, R. MOREY, A. STEIGERWALT, A. BORAS, R. S. WEYANT, AND T. POPOVIC. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.* 8:1117–1123.

SAMELIS, J., 2006. Managing microbial spoilage in meat industry. In: Blackburn, C.W. (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 213–286.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (1977) 5463–5467.

SANTOS, E. A. et al. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA AMBIENTE NA ANÁLISE DO TERMOCICLADOR. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, p. 1522–1525, 2014.

SCHUSTER S.C.. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods.* 2008;5(1):16-18.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. K. Lactic-acid bacteria on vacuum packaged meat their influence on shelf-life. *Fleischwirtschaft, Frankfurt*, v.67, p. 1244–1248, 1987.

SHENDURE J AND JI H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1135-1145.

SIEBERT, P. D., CHENCHIK, A., KELLOGG, D. E., LUKYANOV, K. A., & LUKYANOV, S. A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 23, 1087e1088.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.*, v. 7, p. 539, 2011.

SILVA, A.R., PAULO, E.N., SANT'ANA, A.S., CHAVES, R.D., MASSAGUER, P.R., 2011. Involvement of *Clostridium gasigenes* and *C. algidicarnis* in 'blown pack' spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *International Journal of Food Microbiology* 148, 156–163.

SMYTH, R. P. et al. Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. *Gene*, v. 469, p. 45–51, 2010.

SPRING, S. (2003). Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic 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*, 53(4), 1019–1029.doi:10.1099/ijs.0.02554-0.

STACKEBRANDT, E., JONES, D., 2006. The genus *Brochothrix*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*, third ed. Springer US, New York, NY, pp. 477e491.

STANBRIDGE, L.H., DAVIES, A.R., 1998. The microbiology of chill stored meat. In: Davies, A.R., Board, R.G. (Eds.), *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 174–219.

SUTHERLAND, J. P.; PATTERSON, J.T.; MURRAY, J.G. Changes in microbiology of vacuum packaged beef. *Journal Applied Bacteriology*, Oxford, v. 39, p. 227–237, 1975.

SELLIER, P. Genetics of pork quality. In: *CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E INDUSTRIALIZAÇÃO DE SUÍNOS*, 1., 1995, Campinas. Anais. Campinas: ITAL, 1995. p. 1–36.

BARTON-GADE, P. Danish experience in meat quality improvement. In: *WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION*, 4., 1990, Edinburgh. Proceedings... Edinburgh: [s.n.], 1990. v.15, p. 511-520.

TORNADIJO, M.E.; GARCÍA, M.C.; FRESNO, J.M.; CARBALLO, J. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiology*, London, v.18, p. 499–509, 2001.

TORTOLI, E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:319–354.

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

YANG, X., BALAMURUGAN, S., & GILL, C. (2011). Effects on the development of blown pack spoilage of the initial numbers of *Clostridium estertheticum* spores and *Leuconostoc mesenteroides* on vacuum packed beef. *Meat Science*, 88(3), 361–367.

University of Oxford - Genomic University Center. Disponível em: <https://www.well.ox.ac.uk/ogc/sequencing-quality-monitoring-run/sequencing-fig1/>. Acessado em 07/06/2019.

WOESE, C. R., E. STACKEBRANDT, T. J. MACKE, AND G. E. FOX. 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.* 6:143–151.

WOESE, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221–271.

WOESE, C. R., FOX, G. E.. Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms Author(s): Carl R. Woese and George E. Fox Source: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 74, No. 11 (Nov., 1977), pp. 5088-5090.

WOESE, C. R., G. J. Olsen, M. Ibba, and D. Soll. 2000. Comparisons of complete genome sequences allow the most objective and comprehensive descriptions possible of a lineage's evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:202–236.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002. Food safety: A revolution of the executive board of the world health organization. Resolution EB 105.

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

ZHANG, H., & YOU, C. (2018). A universal PCR method and its application in sequence-based identification of microorganisms in dairy. *International Dairy Journal*, 85, 41–48.doi:10.1016/j.idairyj.2018.05.004.

ZHANG J., DING, X., GUAN, R., ZHU, C., XU, C., ZHU, B., ZHANG, H., XIONG Z., XUE, Y., TU J., LU, Z., 2018. Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of the Total Environment* 618 (2018) 1254–1267.

7.0 ANEXOS

7.1 TABELAS

Tabela 1 - **Pontos de coleta na Unidade 1 do Frigorífico X:**

Local	Amostra
Câmara de resfriamento	Amostra 01 - ambiental
Câmara de resfriamento	Amostra 02 - ambiental
Câmara de resfriamento	Amostra 03 - ambiental
Câmara de resfriamento	Amostra 04 - ambiental
Câmara de resfriamento	Amostra 05 - ambiental
Câmara de resfriamento	Amostra 06 - ambiental
Câmara de resfriamento	Amostra 07 - ambiental
Câmara de resfriamento	Amostra 08 - ambiental
Paletização	Amostra 09 - ambiental
Paletização	Amostra 10 - ambiental
Paletização	Amostra 11 - ambiental
Paletização	Amostra 12 - ambiental
Carrinhos de mão	Amostra 13 - ambiental
Carrinhos de mão	Amostra 14 - ambiental
Empilhadeiras	Amostra 15 - ambiental
Empilhadeiras	Amostra 16 - ambiental
Produto Final	Amostra 17 – produto final
Produto Final	Amostra 18 – produto final
Produto Final	Amostra 19 – produto final
Produto Final	Amostra 20 – produto final

Câmara pulmão	Amostra 21 – ambiental
Câmara pulmão	Amostra 22 – ambiental
Câmara pulmão	Amostra 23 – ambiental
Câmara pulmão	Amostra 24 – ambiental

Tabela 2 - Pontos de coleta na Unidade 1 do Frigorífico Y:

Local	Amostra
Abate	Amostra 25 – produto de processo
Abate	Amostra 26 – produto de processo
Abate	Amostra 27 – produto de processo
Abate	Amostra 28 – produto de processo
Abate	Amostra 29 – produto de processo
Abate	Amostra 30 – produto de processo
Abate	Amostra 31 – produto de processo
Abate	Amostra 32 – produto de processo
Abate	Amostra 33 – produto de processo
Abate	Amostra 31 – produto de processo
Abate	Amostra 32 – produto de processo
Abate	Amostra 33 – produto de processo

Abate	Amostra 34 – produto de processo
Abate	Amostra 35 – produto de processo
Abate	Amostra 36 – produto de processo
Abate	Amostra 37 – produto de processo
Abate	Amostra 38 – produto de processo
Abate	Amostra 39 – produto de processo
Abate	Amostra 40 – produto de processo
Abate	Amostra 41 – produto de processo
Abate	Amostra 42 – produto de processo
Abate	Amostra 43 – produto de processo
Abate	Amostra 44 – produto de processo
Câmara de maturação	Amostra 45 – produto de processo
Câmara de maturação	Amostra 46 – produto de processo
Câmara de maturação	Amostra 47 – ambiental
Câmara de maturação	Amostra 48 – produto de processo
Câmara de maturação	Amostra 49 – ambiental
Câmara de maturação	Amostra 50 – ambiental
Câmara de maturação	Amostra 51 – ambiental
Câmara de maturação	Amostra 52 – ambiental
Câmara de maturação	Amostra 53 – ambiental

Câmara de maturação	Amostra 54 – produto de processo
Câmara de maturação	Amostra 55 – produto de processo
Câmara de maturação	Amostra 56 – ambiental
Câmara Pulmão	Amostra 57 – ambiental
Câmara Pulmão	Amostra 58 – ambiental
Câmara Pulmão	Amostra 59 – ambiental
Câmara Pulmão	Amostra 60 – produto de processo
Câmara Pulmão	Amostra 61 – produto de processo
Câmara Pulmão	Amostra 62 – produto de processo
Desossa	Amostra 63 – produto de processo
Desossa	Amostra 64 – produto de processo
Desossa	Amostra 65 – produto de processo
Desossa	Amostra 66 – produto de processo
Desossa	Amostra 67 – produto de processo
Desossa	Amostra 68 – produto de processo
Desossa	Amostra 69 – produto de processo
Desossa	Amostra 70 – produto de processo
Desossa	Amostra 71 – produto de processo
Desossa	Amostra 72 – produto final
Desossa	Amostra 73 – produto final
Desossa	Amostra 74 – produto final

Desossa	Amostra 75 – produto final
Desossa	Amostra 76 – produto final
Desossa	Amostra 77 – produto final
Desossa	Amostra 78 – produto final
Desossa	Amostra 79 – produto final
Desossa	Amostra 80 – produto final
Desossa	Amostra 81 – produto final
Desossa	Amostra 82 – produto final
Desossa	Amostra 83 – produto final
Desossa	Amostra 84 – produto final
Desossa	Amostra 85 – produto final
Desossa	Amostra 86 – produto final
Desossa	Amostra 87 – produto final
Desossa	Amostra 88 – produto final
Desossa	Amostra 89 – produto final
Desossa	Amostra 90 – produto final
Desossa	Amostra 91 – produto final

Desossa	Amostra 92 – produto final
Abate	Amostra 93 – ambiental
Abate	Amostra 94 – ambiental
Abate	Amostra 95 – ambiental
Abate	Amostra 96 – ambiental
Abate	Amostra 97 – ambiental
Abate	Amostra 98 – ambiental
Abate	Amostra 99 – ambiental
Abate	Amostra 100 – ambiental
Abate	Amostra 101 – ambiental
Abate	Amostra 102 – ambiental
Abate	Amostra 103 – ambiental
Abate	Amostra 104 – ambiental
Abate	Amostra 105 – ambiental
Abate	Amostra 106 – ambiental
Abate	Amostra 107 – ambiental
Abate	Amostra 108 – ambiental
Abate	Amostra 109 – ambiental
Abate	Amostra 110 – ambiental
Abate	Amostra 111 – ambiental
Abate	Amostra 112 – ambiental

Desossa	Amostra 113 – ambiental
Desossa	Amostra 114 – ambiental
Desossa	Amostra 115 – ambiental
Desossa	Amostra 116 – ambiental
Desossa	Amostra 117 – ambiental
Desossa	Amostra 118 – ambiental
Desossa	Amostra 119 – ambiental
Desossa	Amostra 120 – ambiental
Desossa	Amostra 121 – ambiental
Desossa	Amostra 122 – ambiental
Desossa	Amostra 123 – ambiental
Desossa	Amostra 124 – ambiental
Desossa	Amostra 125 – ambiental
Desossa	Amostra 126 – ambiental
Desossa	Amostra 127 – ambiental
Desossa	Amostra 128 – ambiental
Desossa	Amostra 129 – ambiental
Desossa	Amostra 130 – ambiental
Desossa	Amostra 131 – ambiental