

NATÁLIA PARMA AUGUSTO DE CASTILHO

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS ALTERNATIVOS PARA ENUMERAÇÃO
DE CULTURAS STARTER E BACTÉRIAS LÁTICAS UTILIZADAS NA
PRODUÇÃO DE SALAME**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C352a
2014
Castilho, Natália Parma Augusto de, 1987-
Avaliação de protocolos alternativos para enumeração
de culturas starter e bactérias lácticas utilizadas na produção
de salame / Natália Parma Augusto de Castilho. - Viçosa, MG,
2014.
xii, 66f. : il. ; 29 cm.

Orientador : Luis Augusto Nero.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Salame. 2. Bactéria láctica. 3. Placa Petrifilm.
4. Culturas *Starter* . I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação
em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 579.3

NATÁLIA PARMA AUGUSTO DE CASTILHO

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS ALTERNATIVOS PARA ENUMERAÇÃO
DE CULTURAS STARTER E BACTÉRIAS LÁTICAS UTILIZADAS NA
PRODUÇÃO DE SALAME**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA EM 21 DE JULHO DE 2014

Wladimir Padilha da Silva

Fábio Alessandro Pieri
co-orientador

Luís Augusto Nero
orientador

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por ter me guiado nesse caminho.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, dedicação, apoio, confiança e sabedoria.

A toda minha família pelo amor e carinho.

Ao meu orientador, professor Luís Augusto Nero, pela oportunidade de orientação durante o mestrado, pela confiança, apoio, dedicação e ensinamentos.

Ao meu co-orientador, professor Fábio Alessandro Pieri, por todo carinho, paciência e auxílio durante a realização do mestrado.

Ao professor Wladimir Padilha da Silva, pela disposição em participar da minha banca de mestrado.

Ao Rafael, por todo amor, carinho, companheirismo, apoio e por estar sempre comigo nas horas boas e ruins.

A todos os amigos do InsPOA, em especial aqueles que tiveram mais presentes: Vivian, Eduardo, Monique e Anderson. Obrigada por tudo.

A secretária Rosi, por todo carinho, apoio e ajuda sempre.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Veterinária, pela ajuda durante a realização do meu projeto.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq, pela bolsa de estudos concedida e financiamento do projeto.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização de mais um sonho.

Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Embutidos cárneos e salame	3
2. Bactérias lácticas e culturas starter	5
2.1. Culturas starter em produtos cárneos	7
3. Enumeração de BAL e culturas starters em alimentos	12
Referências	16
OBJETIVOS	23
Objetivo geral	23
Objetivos específicos	23
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	24
Resumo	25
Abstract	26
1. Introdução	27
2. Material e Métodos	29
2.1. Avaliação de protocolos de enumeração de culturas starter e culturas puras de BAL	29
2.1.1. Micro-organismos e culturas starter	29
2.1.2. Protocolos para enumeração de micro-organismos	30
2.2. Avaliação de protocolos de enumeração de culturas starter em salames comerciais	32
2.2.1. Amostras e análises microbiológicas	32
2.2.2. Especificidade dos protocolos de enumeração de culturas starter em salames	33
3. Resultados e Discussão	34
3.1. Avaliação de protocolos de enumeração de culturas starter e isolados bacterianos	34
3.2. Avaliação de protocolos de enumeração de culturas starter em salames comerciais	37

Referências	46
CONCLUSÕES	50
RESULTADOS DETALHADOS	51

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Figura 1. Parâmetros de correlação entre as contagens de culturas puras e culturas starter em Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol em diferentes condições de incubação (aerobiose e anaerobiose) e após os diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h). n = número; r = índice de correlação; r^2 = coeficiente de determinação; p = nível de significância..... 37
- Figura 2. Parâmetros de correlação entre as contagens de culturas starter adicionadas nos salames em Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol em diferentes condições de incubação (aerobiose e anaerobiose) e após os diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h). n = número de amostras; r = índice de correlação; r^2 = coeficiente de determinação; p = nível de significância. 39
- Figura 3: Parâmetros de correlação entre as contagens de culturas starter adicionadas nos salames em Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol em aerobiose e em dois protocolos convencionais após os diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h). n = número de amostras; r = índice de correlação; r^2 = coeficiente de determinação; p = nível de significância. 40
- Figura 4: Parâmetros de correlação entre as contagens de culturas starter adicionadas nos salames em Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol em anaerobiose e em dois protocolos convencionais após os diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h). n = número de amostras; r = índice de correlação; r^2 = coeficiente de determinação; p = nível de significância..... 41
- Figura 5: Taxas de similaridade, perfis genéticos obtidos por rep-PCR, isolados, origem e morfologia pela coloração de Gram de 73 isolados obtidos de amostras de salame, e identificação de 25 isolados selecionados (sequenciamento do gene 16s RNA). PAC: Petrifilm™ AC, CR: vermelho de clorofenol; MRS: de Mann, Rogosa & Sharpe.... 44

LISTA DE TABELAS

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Tabela 1. Culturas starter e micro-organismos utilizados no estudo.....	29
Tabela 2. Médias e desvios padrão das contagens das culturas starter e culturas puras enumeradas por seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL)	35
Tabela 3: Médias e desvios padrão das contagens de culturas starter presentes nas amostras de salame, considerando quatro protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/g)	38
Tabela 4: Características morfológicas de 850 colônias obtidas de amostras de salame semeadas em Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho clorofenol e incubado em aerobiose (Protocolo 1), Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho clorofenol e incubado em anaerobiose (Protocolo 2), ágar MRS adicionado de vermelho de clorofenol (Protocolo 3) e MRS com pH ajustado a 5,7 (Protocolo 5).....	43

RESULTADOS DETALHADOS

Tabela 1. Primeira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 24 horas de incubação (resultados em UFC/mL)....	52
Tabela 2. Segunda repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 24 horas de incubação (resultados em UFC/mL)....	53
Tabela 3. Terceira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 24 horas de incubação (resultados em UFC/mL)....	54
Tabela 4. Primeira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 48 horas de incubação (resultados em UFC/mL)....	55
Tabela 5. Segunda repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 48 horas de incubação (resultados em UFC/mL)....	56
Tabela 6. Terceira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 48 horas de incubação (resultados em UFC/mL)....	57
Tabela 7. Primeira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 72 horas de incubação (resultados em UFC/mL)....	58
Tabela 8. Segunda repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 72 horas de incubação (resultados em UFC/mL)....	59
Tabela 9. Terceira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 72 horas de incubação (resultados em UFC/mL).	60
Tabela 10: Enumeração de culturas starter isoladas de salames comerciais nos seis protocolos após 24 horas de incubação (resultados em UFC/g).	61
Tabela 11: Enumeração de culturas starter isoladas de salames comerciais nos seis protocolos após 48 horas de incubação (resultados em UFC/g).	62
Tabela 12. Enumeração de culturas starter isoladas de salames comerciais nos seis protocolos após 72 horas de incubação (resultados em UFC/g).	63
Tabela 13. Médias e desvios padrão das contagens do “mix” de culturas starter contendo <i>L. sakei</i> , <i>S. carnosus</i> e <i>S. xylosum</i> enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL)	64

Tabela 14. Médias e desvios padrão das contagens do “mix” de culturas starter contendo <i>L. sakei</i> , <i>S. xylosus</i> e <i>S. vitulinus</i> enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).	64
Tabela 15. Médias e desvios padrão das contagens de <i>L. casei</i> enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).	64
Tabela 16. Médias e desvios padrão das contagens de <i>L. paracasei</i> enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL)..	65
Tabela 17. Médias e desvios padrão das contagens de <i>L. plantarum</i> enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL)..	65
Tabela 18. Médias e desvios padrão das contagens de <i>L. lactis</i> e <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).	65
Tabela 19. Médias e desvios padrão das contagens de <i>Pediococcus pentosaceus</i> enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).	66
Tabela 20. Médias e desvios padrão das contagens de <i>S. xylosus</i> enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL)..	66
Tabela 21: Médias e desvios padrão das contagens de culturas starter presentes nas amostras de salame, considerando quatro protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).....	66

RESUMO

CASTILHO, Natália Parma Augusto de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Avaliação de protocolos alternativos para enumeração de culturas starter e bactérias lácticas utilizadas na produção de salame.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientador: Fábio Alessandro Pieri.

As principais culturas starter utilizadas para produção de derivados cárneos fermentados são micro-organismos do grupo das bactérias lácticas (BAL) e *Staphylococcus coagulase negativa*. Os gêneros *Pediococcus* e *Lactobacillus* possuem como principal característica a acidificação dos produtos e produção de compostos responsáveis pela determinação de aroma e sabor. *Staphylococcus coagulase negativa* contribuem para o desenvolvimento e a estabilidade da cor vermelha e para o desenvolvimento de outras propriedades sensoriais, como textura e aroma. O monitoramento adequado dessas populações é indispensável para manutenção da qualidade e inocuidade desses produtos. Porém, as metodologias convencionais de enumeração de culturas starter em alimentos possuem limitações quanto a praticidade e seletividade. Com isso, placas Petrifim™ AC tem sido empregadas para enumeração de culturas starter em produtos lácteos fermentados, desde que associadas a meios de cultura com agentes seletivos para grupos microbianos específicos. Considerando a escassez de dados científicos que demonstrem a pertinência de utilização de placas Petrifim™ AC associadas a meios de cultura seletivos para enumeração de BAL em produtos cárneos fermentados, o presente estudo tem como objetivo avaliar o uso de placas Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS e vermelho de clorofenol para enumeração de culturas starter adicionadas em salames. Quatorze culturas puras e dois mix de culturas starter foram enumerados em seis protocolos diferentes: 1) Petrifilm™ AC associados ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol incubado em aerobiose e 2) em anaerobiose, 3) ágar MRS associado a vermelho de clorofenol, 4)

MRS associado a púrpura de bromocresol, 5) MRS pH 5,7, e 6) ágar All Purpose Tween. Em seguida, amostras de salame foram obtidas e suas culturas starter enumeradas pelos protocolos 1, 2, 3 e 5. A análise de variância indicou ausência de diferenças significativas entre os protocolos de enumeração, independente dos tempos de incubação considerados (24, 48 e 72 horas). De maneira geral as contagens de culturas puras e culturas starter não apresentaram diferenças significativas considerando os diferentes tempos de incubação (exceto para AS 308 e *S. xylosus* em MRS com pH 5.7). Houve correlação significativa entre os protocolos, indicando a equivalência entre as contagens de culturas puras e culturas starter obtidas em aerobiose e em anaerobiose ($p < 0,05$). Os parâmetros de regressão linear também indicam correlações adequadas entre as contagens obtidas após 24, 48 e 72 h de incubação, indicando a confiabilidade dos resultados obtidos em um menor tempo de análise (24 h). Considerando os resultados obtidos na enumeração de culturas starter em salames, não foram observadas diferenças significativas entre os protocolos, independente dos tempos e condições de incubação e todas as correlações foram significativas ($p < 0,05$), indicando equivalências entre os protocolos independente das condições (aerobiose ou anaerobiose) e tempos (24, 48, 72h) de incubação. Após análise morfológica e identificação molecular de isolados obtidos das amostras de salame pelos protocolos avaliados, verificou-se uma seletividade adequada dos mesmos, que permitiram a formação de colônias apenas por micro-organismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, bem como *Staphylococcus* coagulase negativa, tipicamente utilizados como culturas starter para a produção de salame. Esses resultados confirmam a viabilidade da utilização de Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS e vermelho de clorofenol para enumeração de culturas starter isoladas e em amostras de salame, em diferentes condições de aerobiose e em um reduzido período de incubação,

representando vantagens a serem consideradas no monitoramento desses micro-organismos.

ABSTRACT

CASTILHO, Natália Parma Augusto de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Assessment of alternative protocols for enumeration of lactic acid bacteria and starter cultures used in salami production.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Fábio Alessandro Pieri.

The main starter cultures used for the production of fermented meat products are microorganisms from the group of lactic acid bacteria (LAB) and *Staphylococcus coagulase negative*. *Pediococcus* and *Lactobacillus* present as main technological characteristic the acidification of products and production of compounds responsible for determining aroma and flavor. *Staphylococcus coagulase negative* contributes to the development and stability of the red color and the development of others sensory properties such as flavor and texture. Monitoring the populations is essential for maintaining the quality and safety of these products. However, conventional methods for enumeration of starter cultures in foods have limitations, due to poor selectivity and handling. Thus, Petrifilm™ AC plates have been used for enumeration of starter cultures in fermented dairy products, since associated with culture media with selective agents for specific microbial groups. Considering the lack of scientific data demonstrating the relevance of using Petrifilm™ AC plates associated with selective culture media for LAB enumeration in fermented meat products, the present study aimed to assess alternative protocols for the enumeration of starter culture in salami. Fourteen reference strains and two mix of starter cultures were plated on six different protocols: 1) Petrifilm™ AC added to MRS broth and chlorophenol red incubated in aerobiosis and 2) in anaerobiosis 3) agar MRS added to chlorophenol red 4) MRS added to bromocresol purple 5) MRS pH 5.7 and 6) agar All Purpose Tween. Then, samples of salami were obtained and their starter cultures enumerated by plating using protocols 1, 2, 3 and 5. The analysis of variance showed no significant differences between the

enumeration protocols, independent of the incubation time: 24, 48 and 72 h. Generally, the counts of pure cultures of microorganisms and reference starter cultures showed no significant differences considering the different incubation times (except for AS 308 and *S. xylosus* in MRS at pH 5.7). The results indicated a significant correlation between the protocols, indicating equivalence between the counts of reference cultures and starter cultures in aerobiosis and anaerobiosis ($p < 0.5$). The linear regression parameters also indicate appropriate correlations between the counts obtained after 24, 48 and 72 h of incubation, indicating a reliability of the results obtained in a shorter analysis time (24 h). Considering the results obtained in the enumeration of starter cultures in salami, no significant differences were observed among the protocols considered, independent of time and incubation conditions, and all correlations were significant ($p < 0.05$), indicating equivalence between the protocols independent the conditions (aerobiosis and anaerobiosis) and time (24, 48 and 72 h) of incubation. After morphological and molecular identification of isolates obtained from samples of salami by the tested protocols, it was observed an adequate selectivity, which allowed the formation of colonies only by microorganisms of the genera *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Staphylococcus* coagulase negative, typically considered as starter cultures for the salami production. These results confirm the feasibility of using Petrifilm™ AC associated to MRS broth and chlorophenol red for enumeration of isolated starter cultures and starter cultures from salami samples, in different aerobic conditions and in a reduced incubation period, representing advantages to be considered during the monitoring of these microorganisms.

INTRODUÇÃO

Atualmente a indústria de alimentos vem demonstrando grande interesse por diversas substâncias produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL) por serem capazes de gerar modificações nos alimentos, e assim originar os alimentos fermentados. Essas culturas específicas de BAL são denominadas de culturas starter. As culturas starter são adicionadas nos alimentos com a finalidade de acidificar a matéria-prima aumentando a vida de prateleira do produto, eliminar micro-organismos patogênicos, alteram as características sensoriais e físicas, além de estarem usualmente associadas a efeitos benéficos aos consumidores.

Um dos principais embutidos cárneos fermentados que utilizam BAL como culturas starter é o salame. Os principais micro-organismos utilizados como culturas starter nestes produtos são da família Micrococcaeae, incluindo os gêneros *Micrococcus* e *Staphylococcus* e fungos (*Penicilium*) e leveduras (*Debaryomyces*), tendo como principal característica a contribuição na melhoria da coloração e do sabor e do aroma dos produtos cárneos. Além disso, também são utilizados micro-organismos do gênero *Pediococcus* e *Lactobacillus*, que tem como principal característica a produção de ácido láctico a partir dos carboidratos.

Métodos convencionais para a enumeração de BAL e culturas starter em alimentos são utilizados há vários anos e tem sua validade reconhecida nacional e internacionalmente. Porém, possuem a desvantagem de gastar muito tempo na preparação de materiais, possuir alto custo para a execução e a necessidade de muito espaço para a incubação. Com o intuito de diminuir esses problemas vários métodos alternativos já foram desenvolvidos, dentre eles o sistema Petrifilm™ (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), que pode ser descrito como uma metodologia

prática, simples e viável para o monitoramento de micro-organismos na indústria de alimentos.

Placas Petrifilm™ são rotineiramente utilizadas pela indústria de alimentos para monitoramento de diferentes grupos de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene na cadeia produtiva, como aeróbios mesófilos, coliformes, enterobactérias, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, fungos e leveduras. Além disso, existem apresentações das placas Petrifilm™ para monitoramento de patógenos, como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*. O monitoramento de BAL também pode ser realizado com placas Petrifilm™ para contagem de aeróbios mesófilos (Petrifilm™ Aerobic Count, AC), desde que associadas a diferentes meios de cultura, utilizados como diluentes das amostras, e incubação em condições específicas. Com esse objetivo, há a indicação de um protocolo utilizando o caldo de Mann Rogosa & Sharpe (MRS) adicionado de vermelho de clorofenol como diluente de amostras de alimentos, visando a enumeração de culturas starter em produtos cárneos fermentados. Entretanto, os diversos estudos que avaliam a adequação da utilização de placas Petrifilm™ para enumerar BAL são concentrados em derivados lácteos fermentados.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho das placas de Petrifilm™ AC na enumeração de BAL e culturas starter comerciais, associadas a diferentes meios de cultura e em comparação com quatro protocolos convencionais de enumeração.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Embutidos cárneos e salame

Produto embutido é definido como um alimento que se prepara com carne condimentada e picada, proporcionando forma simétrica. A elaboração de embutidos teve início com um simples processo de salga e secagem a fim de conservar a carne fresca que não iria ser consumida imediatamente (Price & Schweigert, 1994).

Os embutidos cárneos fermentados podem ser definidos como aqueles que sofrem uma rápida fermentação inicial com posterior desidratação parcial. Segundo Beraquet (2005), os embutidos fermentados são produtos resultantes da fermentação láctica da carne crua, salgada e triturada, misturada à gordura triturada ou em forma de cubos, adicionada de especiarias, embutida e processada em envoltórios artificiais ou naturais. Estes produtos não necessitam de refrigeração, possuindo grande estabilidade quando comparados com outros produtos cárneos.

Os embutidos fermentados são elaborados com carne bovina, suína ou ambas, que se caracterizam por sabor picante e forte, originado devido à produção de ácidos por fermentação microbiana (Price & Schweigert, 1994). Esses produtos são caracterizados por possuírem baixo teor de umidade e baixa atividade de água, além da presença de grande quantidade de ácido láctico que confere um sabor característico e agradável ao produto final. Durante a produção de embutidos cárneos fermentados é necessário que ocorra rápida diminuição do pH para evitar o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Essa diminuição de pH depende do rápido desenvolvimento das bactérias ácido lácticas (BAL) (Toldrá, 2010).

Um embutido cárneo fermentado que frequentemente utiliza BAL como cultura starter é o salame, que de acordo com a Instrução Normativa nº 22 é definido como

sendo o produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou mista de suína e bovina adicionado de toucinho, ingredientes, embutidos em envoltórios naturais e/ou artificiais, curtido, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado. A presença de “mofó” (fungos) é uma consequência natural do processo tecnológico de fabricação (Brasil, 2000). No Brasil, os salames são classificados em oito tipos: italiano, milano, hamburguês, napolitano, friolano, calabrês, alemão e salaminho; podem haver outras denominações, desde que sejam respeitadas especificações obrigatórias (Brasil, 2000).

A origem dos salames está relacionada aos países do sul da Europa e posteriormente foram levados aos demais países deste continente (Zeuthen, 1995). A produção de salame no Brasil originou-se a partir dos conhecimentos e processos de produção trazidos pelos imigrantes italianos, que ao se instalarem na região sul do país encontraram condições climáticas favoráveis e iniciaram a produção artesanal, dando origem às pequenas fábricas (Terra et al., 2004). No Brasil, o termo salame geralmente é aplicado aos embutidos fermentados que se diferenciam pela espécie animal da carne usada, quantidade de sal, tipos de condimentos utilizados, forma de preparação da gordura, dimensão e natureza do envoltório utilizado, presença ou não de “bolores” superficiais e pelas condições de temperatura e tempo aplicadas durante a fermentação (Beraquet, 2005).

Internacionalmente, os salames podem ser classificados em dois grupos de acordo com o pH final do produto e a tecnologia de fabricação utilizada. Os salames do sul da Europa são elaborados predominantemente com carne suína, possuem fermentação de longa duração e os valores de pH são sempre superiores a 5,0, os quais juntamente com a adição de especiarias conferem ao produto final aroma e sabor característicos. Já os salames produzidos no norte da Europa são elaborados com carne bovina ou suína, submetidos a uma fermentação de curta duração e rápida diminuição de pH. A principal característica é o sabor picante devido ao pH final ser inferior a 5,0.

No Brasil, o salame tipo italiano se enquadra no primeiro grupo, pois é fabricado com carne suína, maturado por aproximadamente 30 dias e apresenta sabor e aroma suave com pH em torno de 5,4 (Zanardi et al., 2004).

2. Bactérias lácticas e culturas starter

BAL são caracterizadas como micro-organismos Gram positivos, não formadores de esporos, anaeróbicos, aerotolerantes, ácido-tolerantes, além de não possuírem citocromos. Esses micro-organismos são estritamente fermentativos e seu principal produto final na fermentação de carboidratos é o ácido láctico (Holzapfel et al., 2001). Estes micro-organismos são encontrados principalmente em produtos fermentados, leite, carne e derivados, mas também podem ser isolados da cavidade oral, vagina, trato digestório, solo, esterco, silagem e água. As principais BAL encontradas são *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, e *Weissella* (Axelsson, 2004). O processo de fermentação das BAL pode ser via homo ou heterofermentativo. No processo homofermentativo o principal produto gerado é o ácido láctico, típico das espécies dos gêneros *Lactococcus* e *Streptococcus*. Já processo heterofermentativo é caracterizado pela produção adicional de etanol e dióxido de carbono, ocorrendo em espécies dos gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (Parada et al., 2007).

Estes micro-organismos podem causar deterioração precoce dos alimentos devido à produção de substâncias proteolíticas e de ácidos. Por outro lado, BAL probióticas estão associadas a efeitos benéficos aos consumidores, devido a sua capacidade de colonizar o trato gastrintestinal. Contudo, esses micro-organismos possuem grande potencial de utilização na conservação de vários alimentos (Gallia et

al., 2009; Holzapfel et al., 2001; Pfeiler & Klaenhammer, 2007). Muitas das substâncias produzidas por BAL são de particular interesse pela indústria de alimentos, por promoverem transformações específicas, originando os denominados produtos fermentados. Culturas específicas de BAL são isoladas e utilizadas para esses fins, sendo denominadas culturas starter.

Culturas starter são preparações que possuem vários micro-organismos viáveis que, quando adicionados à matéria-prima, são capazes de acelerar o processo de fermentação (Holzapfel et al., 2001). BAL são importantes culturas starter que garantem segurança na aplicação e no consumo de produtos fermentados. Esses micro-organismos são capazes de acidificar a matéria-prima através da produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático. Além disso, as culturas starter também podem produzir compostos aromáticos, etanol, ácido acético e bacteriocinas. Dessa forma, esses micro-organismos garantem que o produto final tenha maior segurança microbiológica, melhoram a textura, aumentam a sua vida útil e contribuem para a definição de um perfil sensorial agradável (Leroy & De Vuyst, 2004).

Em produtos cárneos, as culturas starter são adicionadas com a finalidade de aumentar a vida útil e eliminar micro-organismos patogênicos, ocorrendo alterações nas propriedades sensoriais e nas características físicas (Lucke, 2000). Além disso, o uso de culturas starter em produtos cárneos fornece quantidade suficiente de micro-organismos para garantir a dominância numérica sobre patógenos ou contaminantes da microbiota intestinal, determinando a inocuidade e qualidade do produto final. As culturas starter, sob condições controladas, podem produzir modificações específicas no substrato através da indução de atividades enzimáticas, podendo eliminar *Salmonella*, *Clostridium* e *Staphylococcus* (Bacus & Brown, 1981).

Os trabalhos sobre atividade antagonista de espécies de BAL contra micro-organismos indesejáveis demonstram uma importante perspectiva tecnológica de

utilização destes micro-organismos para a conservação de alimentos e controle de patógenos. Muitas BAL isoladas de leite e queijos apresentaram poder de inibição sobre patógenos e deteriorantes, como *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e bactérias do grupo coliformes (Alexandre et al., 2002; Brashears & Durre, 1999; Cunha et al., 2009).

Guedes Neto et al. (2005) demonstraram efeitos funcionais de BAL isoladas de queijo de coalho produzido em Pernambuco avaliando a atividade antagonista in vitro contra micro-organismos indesejáveis e a sensibilidade a antimicrobianos. Os autores observaram que todos os isolados identificados como *Lactobacillus* spp. foram capazes de inibir as cepas de *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*. Chioda et al. (2007) avaliaram a atividade inibitória in vitro de cinco cepas de *Lactobacillus acidophilus* sobre *E. coli* BIA 26 (STEC) e observaram que todas as cepas de *L. acidophilus* apresentaram atividade antagonista, confirmadas através da produção de zonas de inibição contra o micro-organismo indicador. Cunha et al. (2009) testaram a atividade inibitória in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de leites fermentados comerciais contra micro-organismos indicadores indesejáveis e desejáveis. Todos os *Lactobacillus* spp. demonstraram atividade inibitória contra aos micro-organismos indicadores testados (*L. casei*, duas cepas de *L. acidophilus*, *Salmonella Typhimurium*, *S. aureus* e *E. coli*), sendo mais intensa contra micro-organismos patogênicos.

2.1. Culturas starter em produtos cárneos

As culturas starter comerciais possuem mais de um micro-organismo em sua composição com o intuito aproveitar as diferentes ações de cada bactéria de forma aditiva ou sinérgica, para se obter determinado efeito no produto final. BAL são as culturas starter mais utilizadas comercialmente em produtos cárneos, com destaque para

a combinação de *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que usualmente são adicionadas com *Staphylococcus coagulase negativa*. BAL reduzem o pH devido ao processo de fermentação e *Staphylococcus coagulase negativa* são responsáveis pela produção de aroma e cor do produto final (Simonova et al., 2006). Os gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* são utilizados quando se deseja obter uma coloração mais intensa e quando não se desejar a acidificação do produto. Além disso, devido as suas enzimas lipolíticas e proteolíticas, são capazes de desenvolver sabor e aroma característicos (Bacus, 1984).

Os principais micro-organismos utilizados como culturas starter em produtos cárneos são classificados em dois grupos: flavorizantes e acidificantes. O grupo dos flavorizantes é formado pela família *Micrococcaeae*, incluindo os gêneros *Micrococcus* e *Staphylococcus* e por fungos (*Penicillium*) e leveduras (*Debaryomyces*), tendo como principal característica a contribuição na melhoria da coloração, do sabor e do aroma dos produtos cárneos. Já o grupo dos acidificantes é formado por BAL, incluindo o gênero *Pediococcus* e *Lactobacillus*, que tem como principal característica a produção de ácido lático a partir dos carboidratos (Bacus, 1984; Terra, 1998).

Durante a fermentação, o ácido lático gerado pelas culturas starter de BAL causa uma redução do pH externo alterando a estabilidade de multiplicação de diferentes patógenos, tais como *S. aureus*, *Clostridium spp.* e *Salmonella spp.*, além de deteriorantes como *Enterococcus* e *Pseudomonas*. A rápida diminuição de pH para valores inferiores a 5,3 é suficiente para inibir a multiplicação de *S. aureus* e *Salmonella*, caso os produtos sejam fermentados acima de 18°C (Jay, 2005). A fermentação causada pelas culturas starter gera diferentes compostos relacionados ao aroma e sabor. O ácido lático causa um sabor tipicamente ácido, característico dos produtos cárneos fermentados (Terra, 1998).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* e *Micrococcus* produzem as enzimas nitratedutases, que são capazes de reduzirem o nitrato a nitrito, contribuindo assim na

coloração dos produtos e impedindo a formação de compostos cancerígenos, como por exemplo, as nitrosaminas. Além disso, através de suas enzimas lipolíticas e proteolíticas, esses micro-organismos são capazes de desenvolver sabor e aroma característicos dos produtos cárneos fermentados (Terra, 1998; Vignolo et al., 1995). Para a produção de salames por fermentação espontânea, a massa cárnea utilizada deve conter quantidade suficiente de BAL e *Micrococcus*, para que ocorra o desenvolvimento adequado da fermentação, obtendo um produto com qualidade e inócuo (Comi et al., 2005).

A fabricação de um produto cárneo fermentado como o salame, consiste de duas fases: fermentação e a maturação. A primeira fase é caracterizada pela fermentação juntamente com a acidificação e formação de cor. Nesta fase, *Lactobacillus* homofermentadores produzem ácido láctico que vai proporcionar a inibição de bactérias Gram negativas e facilitar a perda de água, causando uma diminuição da atividade de água. A fase da maturação caracteriza-se pela maior parte da desidratação do produto, bem como pela hidrólise enzimática das proteínas e gorduras, gerando compostos que desempenham papel importante no sabor dos embutidos cárneos (Terra, 2006). Cocos Gram positivo e coagulase negativa também são uma ferramenta relevante na produção de embutidos cárneos fermentados, pois são responsáveis pela estabilidade da cor, evitam o desenvolvimento de rancidez, reduzem a deterioração, diminuem o tempo de processamento e contribuem para o desenvolvimento do aroma (Lucke, 2000).

Atualmente, a maioria das culturas starter comerciais disponíveis para produtos cárneos possui um mix de BAL (gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*) e cocos Gram positivos e coagulase negativa (gêneros *Staphylococcus* e *Kocuria*). Esses grupos são responsáveis pelas reações microbianas que ocorrem simultaneamente durante a fermentação (Toldrá, 2010).

O gênero *Lactobacillus* é de grande importância na fermentação de produtos cárneos e, por isso, espécies desse gênero são frequentemente usadas como culturas starter na produção de embutidos cárneos fermentados e carnes curadas. O gênero *Lactobacillus* inclui mais de 150 espécies com uma ampla variedade de características fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas (Axelsson, 2004). Porém, somente um limitado número de espécies de *Lactobacillus* é isolado de carnes fermentadas e utilizado como culturas starter, entre eles, *L. sakei*, *L. curvatus* e *L. plantarum*. {Leroy, 2006 #28} demonstrou que *L. sakei* é a espécie predominante na fermentação de produtos cárneos e utilizada como cultura starter. *Lactobacillus* são capazes de produzir peróxido de hidrogênio, porém em produtos cárneos essa substância causa a descoloração devido a ação sobre os hemipigmentos. Em salames que são produzidos através da fermentação espontânea tem sido verificada a predominância de *L. sakei* e *L. curvatus*. Portanto, culturas starter para elaboração de salames devem apresentar pouca ou nenhuma produção de peróxido de hidrogênio (Toldrá, 2010).

Embora *L. plantarum* tenha sido identificado como parte da microbiota de carnes e utilizada como cultura starter para que ocorra a fermentação da carne, esta espécie não tem adaptação específica à carne como encontrado em *L. sakei*. *L. plantarum* é uma bactéria altamente versátil, frequentemente encontrada em uma grande variedade de alimentos, tais como vegetais e produtos lácteos fermentados e no trato gastrointestinal inferior de animais homeotérmicos (Kleerebezem et al., 2003).

Pediococcus são mais comuns em produtos cárneos fermentados nos Estados Unidos, onde são intencionalmente adicionados como culturas starter com o intuito de acelerar a acidificação da massa cárnea (Axelsson, 2004). O gênero consiste de nove espécies, mas somente *P. pentosaceus* é geralmente utilizada como cultura starter em produtos cárneos fermentados. A espécie *P. cerevisiae*, frequentemente utilizada como cultura starter, tem sido reclassificada como *P. pentosaceus* (Toldrá, 2010).

Micrococcaceae são frequentemente mencionados como componentes de culturas starter em carnes, mas este termo geralmente se refere aos membros do gênero *Staphylococcus*. *Staphylococcus* são originalmente agrupados com outros cocos Gram positivo, tais como o gênero *Micrococcus*, pois estes dois gêneros muitas vezes habitam o mesmo local. Algumas espécies, principalmente *Staphylococcus* coagulase negativa, tais como *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus*, *S. equorum* e *S. saprophyticus* são frequentemente isolados de salames, mas também podem ocorrer outras espécies (Toldrá, 2010).

S. xylosum e *S. carnosus* são altamente competitivos na fermentação de carnes, possuem importantes propriedades tecnológicas e geralmente carecem de determinantes de virulência; por essas razões são as espécies mais comuns de *Staphylococcus* coagulase negativa utilizadas como culturas starter. Esses micro-organismos são capazes de sobreviver em ambientes de estresse, tais como altas concentrações de sal e baixas temperaturas, encontradas durante os processos de fermentação da carne. *Staphylococcus* coagulase negativa primeiramente contribuem para o desenvolvimento e a estabilidade da cor vermelha, desejada em embutidos fermentados, por meio de sua atividade de nitrato redutase (Miralles et al., 1996). Adicionalmente, esses micro-organismos contribuem para o desenvolvimento de outras propriedades sensoriais, como textura e aroma (Hammes & Hertel, 1998). Essas funções são realizadas através de enzimas específicas envolvidas no metabolismo de proteínas e lipídeos. Estudos anteriores tem demonstrado que o aroma de produtos cárneos fermentados pode ser modulado pela presença de diferentes *Staphylococcus* spp. (Berdague et al., 1993; Sondergaard & Stahnke, 2002).

Portanto, é evidente a importância de se monitorar as populações de culturas starter a fim de garantir suas concentrações adequadas durante o tempo de vida útil de

produtos cárneos embutidos, e para que tais micro-organismos sejam capazes de garantir seus efeitos benéficos aos consumidores.

3. Enumeração de BAL e culturas starters em alimentos

Os métodos de análise microbiológica de alimentos podem ser classificados em métodos convencionais e métodos rápidos. Ambos possuem várias diferenças, porém as finalidades dos métodos são as mesmas, ou seja, verificar a presença ou ausência de determinado micro-organismo, quantificar os micro-organismos e identificar as diferentes espécies presentes nos alimentos. Os métodos convencionais possuem a vantagem de serem utilizados há vários anos e sua validade é reconhecida nacional e internacionalmente. Porém, esses métodos requerem longo tempo para obtenção de resultados e possuem alto custo com materiais para sua execução (Franco, 2006). Com o intuito de minimizar estes problemas, métodos alternativos foram desenvolvidos para a obtenção de resultados mais rápidos, específicos e sensíveis quando comparados aos métodos convencionais. Estes métodos oferecem economia de tempo, espaço e materiais necessários (Sant'Ana et al., 2002).

Independente do procedimento, a pesquisa de BAL em alimentos demanda a utilização de meios de cultura ricos em derivados de ácidos nucleicos, sais, vitaminas, bases purínicas e pirimídicas, aminoácidos pré-formados e peptídeos (Caplice & Fitzgerald, 1999). Normalmente o meio de cultura usado para o isolamento de BAL é o caldo de Mann, Rogosa & Sharpe (MRS), pois possui uma complexa fonte de nitrogênio (levedura, extrato de carne e peptonas) (De Man et al., 1960). Além disso, amostras de alimentos semeadas em MRS normalmente são incubadas em condições de microaerofilia ou de anaerobiose (Wehr & Frank, 2004). Entretanto, apenas essas condições específicas não são suficientes para a enumeração de BAL, sendo necessária

a adição de agentes seletivos (cloreto de lítio, propionato de sódio, sais biliares, cisteína, gentamicina) e redução de pH. Essas substâncias são capazes de inibir a multiplicação de micro-organismos não pertencentes às BAL (Tabasco et al., 2007; Vinderola & Reinheimer, 1999).

Visando tornar mais eficiente a enumeração de micro-organismos em alimentos, vários sistemas foram desenvolvidos, entre eles destacam-se as placas Petrifilm™ (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA). Estas placas consistem em um sistema de duplo filme plástico, sendo formado por uma base e uma camada de polietileno recoberto com nutrientes desidratados e um gel hidrossolúvel a frio. Na parte superior deste cartão há um plástico transparente revestido internamente com o mesmo gel e um corante indicador 2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Após o período de incubação determinado pelo fabricante, as colônias serão expressas em Unidades Formadoras de Colônias por mL de produto (UFC/mL).

As placas de Petrifilm™ possuem diferentes apresentações, para enumeração e monitoramento de diferentes grupos de micro-organismos, como aeróbios mesófilos (Petrifilm™ Aerobic Count, AC), coliformes e *E. coli* (Petrifilm™ Coliforms, CC, e Petrifilm™ *Escherichia coli*, EC), enterobactérias (Petrifilm™ Enterobacteriaceae, EB), *Staphylococcus aureus* (Petrifilm™ Staph Express Count, STX) e fungos e leveduras (Petrifilm™ Yeast and Moulds, YM) (Franco, 2006; Viçosa et al., 2010), além de pesquisa de *Listeria monocytogenes* (Petrifilm™ *Listeria*) e *Salmonella* (Petrifilm™ *Salmonella*). Alternativamente, as placas Petrifilm™ AC também podem ser utilizadas para a enumeração de BAL; para esse fim, as amostras devem ser diluídas em meios de cultura específicos para esse grupo de micro-organismos, distribuídas nas placas e submetidas a condições específicas de incubação. Considerando o grupo de BAL específico que se pretende pesquisar, os meios de cultura devem conter diferentes agentes seletivos (Champagne et al., 1994; Gonçalves et al., 2009; McGregor et al.,

1995; Miranda et al., 2011; Nero et al., 2006; Nero et al., 2008; Ortolani et al., 2007; Pattison et al., 1998). Esses estudos, entretanto, consideram apenas a enumeração alternativa de BAL em derivados lácteos fermentados, demandando a avaliação da adequação desses protocolos alternativos para produtos cárneos fermentados.

Ao avaliar a enumeração de culturas starter durante a produção de iogurtes utilizando o Petrifilm™ AC associado com caldo MRS acidificado e caldo M17, Gonçalves et al. (2009) observaram que em situações específicas o desempenho não foi adequado: algumas espécies de BAL não apresentaram capacidade de redução do TTC, indicador de cor utilizado no sistema Petrifilm™. A baixa capacidade de algumas espécies de BAL em reduzirem o TTC foi descrita por Nero et al. (2006) e por Ortolani et al. (2007), e pode ser considerada como uma das limitações para utilização desse protocolo alternativo. Além disso, a acidificação de alguns alimentos pode ser indicada como uma das causas do mau desempenho do Petrifilm™ AC quando comparado ao método convencional de plaqueamento (Gonçalves et al., 2009). Nero et al. (2008) identificaram a baixa capacidade redutora de TTC por *L. fortis*, que dificultou a sua enumeração pelo sistema Petrifilm™ em amostras de leites fermentados.

Nero et al. (2006) compararam a enumeração de BAL em Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS com a enumeração obtida em ágar MRS, e observaram que não houve diferença significativa entre os dois métodos. Porém, as colônias de *Streptococcus thermophilus* e *Leuconostoc mesenteroides* foram de difícil enumeração devido à coloração levemente avermelhada apresentada nas placas de Petrifilm™ AC. Para a enumeração de *L. casei*, as colônias se apresentaram menores nas placas de Petrifilm™ AC quando comparadas com a metodologia convencional utilizando ágar MRS. Nero et al. (2008) avaliaram a performance de placas Petrifilm™ AC na enumeração de diferentes culturas de BAL em leites fermentados obtidos no comércio, comparando com a metodologia convencional utilizando o ágar MRS, verificaram a

equivalência entre os protocolos. A enumeração de BAL em leites fermentados pode ser realizada com sucesso apenas com o uso de MRS, desde que os produtos fermentados sob análise sejam produzidos exclusivamente com culturas lácticas. Entretanto, os autores identificaram que a acidificação natural dos leites fermentados é um fator preocupante no desempenho de Petrifilm™: o baixo pH pode resultar em estresse microbiano, e pode afetar a eficácia dessas placas na enumeração de micro-organismos indicadores de higiene. Entretanto, os resultados obtidos não foram afetados pelo baixo pH das amostras, uma vez que níveis elevados de BAL são esperados em leites fermentados e diluições seriadas foram conduzidas, eliminando possível interferência do pH. Adicionalmente, BAL são consideradas ácido tolerantes, indicando que mesmo em baixas diluições, nenhuma interferência possa ser observada.

Ortolani et al. (2007), em estudo realizado para comparar três diferentes meios de cultura na enumeração de BAL presentes em leite, confirmaram a eficiência de placas Petrifilm™ AC associados ao caldo MRS e suplementos com agentes seletivos. Miranda et al. (2011) avaliaram métodos alternativos para a enumeração de bifidobactérias em leites fermentados com cultura comercial de *Streptococcus thermophilus* em diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 horas), e observaram que em 24 horas de incubação não foi possível realizar a contagem de colônias na maioria das amostras nos dois métodos testados (sistema Petrifilm™ e contagem padrão), uma vez que as colônias se apresentaram pequenas e ligeiramente manchadas. Entretanto, independente dos meios de cultura e da metodologia utilizada, os resultados obtidos entre 48 e 72 horas não apresentaram diferenças significativas.

Apesar de serem observadas algumas limitações em culturas específicas de BAL, os estudos desenvolvidos demonstram de maneira geral que a eficiência de placas Petrifilm™ AC associadas a MRS com agentes seletivos pode ser considerada adequada, e representa uma alternativa a protocolos convencionais de enumeração

(Gonçalves et al., 2009; Miranda et al., 2011; Nero et al., 2006; Nero et al., 2008; Ortolani et al., 2007). Além do bom desempenho, as placas Petrifilm™ são conhecidas pela conveniência nos laboratórios, reduzindo tempo de trabalho, materiais e espaço necessário para incubação (Nero et al., 2008).

Fisher et al. (2011) realizaram uma avaliação comparativa do processo aeróbico de BAL utilizando o sistema Petrifilm™, comparando-o com dois métodos de referência para a enumeração de BAL em diferentes alimentos, incluindo produtos cárneos, e amostras de ambientes de processamento. Os autores observaram que as placas de Petrifilm™ representaram uma alternativa de fácil utilização para contagem e detecção de BAL. Ao enumerar as BAL em amostras com um elevado número de bactérias não-alvo, as placas de Petrifilm™ permitiram uma melhor visualização de colônias quanto comparada às metodologias convencionais, além de não apresentarem o crescimento de nenhuma colônia de bacilos ou de bactérias não-alvo.

Esse estudo propôs a utilização de um agente seletivo e indicador associado a caldo MRS para promoção de seleção e diferenciação de BAL e culturas starter, o vermelho de clorofenol. Com a utilização desse agente, BAL e micro-organismos produtores de ácidos formam colônias vermelhas típicas com halos ácidos na área de inoculação das placas Petrifilm™ AC, sendo um indicador precoce da presença desses micro-organismos.

Referências

Alexandre, D.P., Silva, M.R., Souza, M.R., & Santos, W.L.M., 2002. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from artisanal minas cheese against indicator microorganisms. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 54:424-428.

- Axelsson, L., 2004. *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Bacus, J., 1984. UPDATE - Meat Fermentation 1984. *Food Technology* 38:59-63.
- Bacus, J.N. & Brown, W.L., 1981. Use of microbial cultures - Meat products. *Food Technology* 35:74-&.
- Beraquet, N.J., 2005. Embutidos fermentados. Princípios do processamento de embutidos cárneos. Centro de Tecnologia de Carnes, Campinas.
- Berdague, J.L., Monteil, P., Montel, M.C., & Talon, R., 1993. Effects of Starter Cultures on the Formation of Flavor Compounds in Dry Sausage. *Meat Science* 35:275-287.
- Brashears, M.M. & Durre, W.A., 1999. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157 : H7 during growth and refrigerated storage. *Journal of Food Protection* 62:1336-1340.
- Brasil, 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabres, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburgues, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Linguiça Colonial e Pepperoni. In: MAPA (ed.), Instrução Normativa 22. MAPA, Brasília.
- Caplice, E. & Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50:131-149.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Piette, M., & St-Gelais, D., 1994. The Use of Petrifilm (R) for the Enumeration of Lactococci. *International Dairy Journal* 4:789-795.
- Chioda, T.P., Schocken-Iturrino, R.P., Garcia, G.R., Pigatto, C.P., Ribeiro, C.A.M., & Ragazzani, A.V.F., 2007. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de

- Queijo "Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus* Frescal' cheese by *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural* 37:583-585.
- Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C., & Cocolin, L., 2005. Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science* 69:381-392.
- Cunha, A.F., Costa, H.H.S., Assis, B.S., Nardi, R.M.D., Nicoli, J.R., & Souza, M.R., 2009. Atividade antagonista de bactérias lácticas isoladas de leites fermentados comerciais frente a microrganismos indicadores. *Higiene Alimentar* 23:80-81.
- De Man, J.C., Rogosa, M., & Sharpe, M.E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* 23:130-135.
- Fisher, K., Crowley, E., Bird, P., Boyle, M., Goetz, K., Benzinger Jr, M.J., Juenger, M., Huffman, T., Agin, J., & Goins, D., 2011. A comparative evaluation of the aerobic procedure for lactic acid bacteria with 3M Petrifilm Aerobic Count Plates with two reference methods for the enumeration of lactic acid bacteria in food and environmental surfaces, p. 19. Q Laboratories, Cincinnati, OH.
- Franco, B.D.G.M., 2006. Métodos rápidos e automação em microbiologia de alimentos. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Gallia, W., Perrin, C., Genay, M., & Dary, A., 2009. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying diferente proteolytic acidifying properties. *International Dairy Journal* 19:89-95.
- Gonçalves, M.M., Freitas, R., Nero, L.A., & Carvalho, A.F., 2009. Enumeration of starter cultures during yogurt production using Petrifilm™ AC plates associated with acidified MRS and M17 broths. *Journal of Dairy Research* 76:229-233.
- Guedes Neto, L., Souza, M., Nunes, A., Nicoli, J., & Santos, W., 2005. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e

- industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 57:245-250.
- Hammes, W.P. & Hertel, C., 1998. New developments in meat starter cultures. *Meat Science* 49:S125-S138.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73:365-373.
- Jay, J.M., 2005. *Microbiologia de Alimentos*. Artmed, Porto Alegre.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M., Stiekema, W., Lankhorst, R.M.K., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., & Siezen, R.J., 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:1990-1995.
- Leroy, F. & De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15:67-78.
- Leroy, F., Verluyten, J., & De Vuyst, L., 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106:270-285.
- Lucke, F.K., 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science* 56:105-115.
- McGregor, J.U., Traylor, S.M., Gough, R.H., Hazlett, S., & Bird, K., 1995. Recovery of lactic acid bacteria on Petrifilm SM under various incubation atmospheres. *Journal of Food Protection* 58:316-318.

- Miralles, M.C., Flores, J., & Martinez, G.P., 1996. Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiology* 13:227-236.
- Miranda, R.O., Neto, G.G., Freitas, R., Carvalho, A.F., & Nero, L.A., 2011. Enumeration of bifidobacteria using PetrifilmTM AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology* 28:1509-1513.
- Nero, L.A., Beloti, V., Barros, M.A.F., Ortolani, M.B.T., Tamanini, R., & Franco, B.D.G.M., 2006. Comparison of Petrifilm Aerobic Count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 14:249-257.
- Nero, L.A., Rodrigues, L.A., Viçosa, G.N., & Ortolani, M.B.T., 2008. Performance of Petrifilm Aerobic Count plates on enumeration of lactic acid bacteria in fermented milks. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 16:132-139.
- Ortolani, M.B.T., Viçosa, G.N., Beloti, V., & Nero, L.A., 2007. Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in PetrifilmTM Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology. *Journal of Dairy Research* 74:387-391.
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., & Soccol, C.R., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50:512-542.
- Pattison, T.L., Geornaras, I., & von Holy, A., 1998. Microbial populations associated with commercially produced South African sorghum beer as determined by conventional and PetrifilmTM plating. *International Journal of Food Microbiology* 43:115-122.

- Pfeiler, E.A. & Klaenhammer, T.R., 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology* 15:546-553.
- Price, J.F. & Schweigert, B.S., 1994. *Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos*. Acribia, Zaragoza.
- Sant'Ana, A.S., Conceição, C., & Azeredo, D.R.P., 2002. Comparação entre os métodos rápidos Simplate TPC-CI e Petrifilm AC e os métodos convencionais de contagem em placas, para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 16:82-87.
- Simonova, M., Strompfova, V., Marcinakova, M., Laukovda, A., Vesterlund, S., Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., & Vidal-Carou, C., 2006. Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Science* 73:559-564.
- Sondergaard, A.K. & Stahnke, L.H., 2002. Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum* - a comparative study in model systems. *International Journal of Food Microbiology* 75:99-109.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Pelaez, C., & Requena, T., 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal* 17:1107-1114.
- Terra, A.B.M., Fries, L.L.M., & Terra, N.N., 2004. *Particularidades na fabricação de salame*. Varela, São Paulo.
- Terra, N.N., 1998. *Apontamentos de tecnologia de carnes*. Unisinos, São Leopoldo.
- Terra, N.N., 2006. *Atualidades em Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. Varela, São Paulo.
- Toldrá, F., 2010. *Handbook of Meat Processing* Blackwell, Iowa.

- Viçosa, G.N., Moraes, P.M., Yamazi, A.K., & Nero, L.A., 2010. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the PetrifilmTM Staph Express count system. *Food Microbiology* 27:447-452.
- Vignolo, G.M., Ruiz, H.A.A.P., & Oliver, G., 1995. Cultivos starters en la industria cárnea. *La Industria Cárnica Latinoamericana* 98:27-34.
- Vinderola, C.G. & Reinheimer, J.A., 1999. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal* 9:497-505.
- Wehr, H.M. & Frank, J.F., 2004. Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association, Washington.
- Zanardi, E., Ghidini, S., Battaglia, A., & Chizzolini, R., 2004. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science* 66:415-423.
- Zeuthen, P., 1995. *Fermented Meats*. Chapman & Hall, Glasgow.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Considerando a escassez de dados científicos que demonstrem a pertinência de utilização de placas Petrifilm™ AC associadas a meios de cultura seletivos para enumeração de culturas starter em produtos cárneos fermentados, o presente estudo tem como objetivo avaliar protocolos alternativos para enumeração desses micro-organismos em salames.

Objetivos específicos

Considerando o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- ✓ Avaliar o desempenho das metodologias de enumeração de BAL isoladamente e culturas starter usualmente utilizadas em produtos cárneos fermentados;
- ✓ Avaliar o desempenho das metodologias de enumeração de BAL em culturas starter isoladas de salames disponíveis comercialmente;
- ✓ Avaliar a especificidade das metodologias empregadas na enumeração de culturas starter adicionadas em salames disponíveis comercialmente.

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Avaliação de protocolos alternativos para enumeração de bactérias lácticas adicionadas
como culturas starter na produção de salames

Artigo a ser formatado após a defesa e submetido ao periódico Food Microbiology,

Fator de Impacto: 3,407 (JCR 2012)

Resumo

O presente estudo tem como objetivo avaliar o desempenho de protocolos alternativos para enumeração de culturas starter em salames, considerando associações de placas Petrifilm™ AC associada ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol. Quatorze culturas puras e dois mix de culturas starter foram enumerados em seis protocolos diferentes: 1) Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol incubado em aerobiose e 2) em anaerobiose, 3) ágar MRS associado a vermelho de clorofenol, 4) MRS associado a púrpura de bromocresol, 5) MRS pH 5,7, e 6) ágar All Purpose Tween. Em seguida, amostras de salame foram obtidas e suas culturas starter enumeradas pelos protocolos 1, 2, 3 e 5. Todas as contagens foram realizadas após 24, 48 e 72 h de incubação. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias das contagens das culturas puras e mix de culturas starter obtidas pelos diferentes protocolos e tempos de incubação por ANOVA ($p > 0,05$), e a análise de regressão indicou correlação significativa entre os resultados obtidos nas diferentes condições avaliadas ($p < 0,05$). Resultados similares foram observados nas amostras de salame, com ausência de diferenças significativas entre as médias obtidas pelos diferentes protocolos ($p > 0,05$), e correlações significativas entre as contagens obtidas pelos diferentes protocolos e tempos de incubação ($p < 0,05$). Adicionalmente, colônias obtidas nos diferentes protocolos foram confirmadas como pertencentes a espécies de culturas starter usualmente utilizadas na produção de salames, indicando a seletividade adequada dos protocolos avaliados. Os resultados obtidos indicam a pertinência de utilização de placas Petrifilm™ AC associadas ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol para enumeração de culturas starter em salames após 24 horas de incubação.

Palavras chave: Petrifilm™ AC, culturas starter, salame, enumeração

Abstract

The present study aimed to assess alternative protocols performance for the enumeration of starter culture in salami considering associations with Petrifilm™ AC added to chlorophenol red. Fourteen pure cultures and two mix of starter cultures were plated on six different protocols: 1) Petrifilm™ AC added to chlorophenol red incubated in aerobiosis and 2) in anaerobiosis 3) MRS agar added to chlorophenol red 4) MRS added to bromocresol purple 5) MRS pH 5.7 and 6) All Purpose Tween agar. Then, samples of salami were obtained and their starter cultures were enumerated by plating according protocols 1, 2, 3 and 5. All counts were obtained after 24, 48 and 72 h of incubation. No significant differences were observed between means counts of starter cultures and mix obtained by the different protocols and incubations times by ANOVA ($p > 0.05$), and regression analysis showed significant correlation between the results obtained in the different conditions ($p < 0.05$). Similar results were observed for salami samples, with absence of significant differences between the means obtained by different protocols ($p > 0.05$), and significant correlations between data obtained by the different protocols and incubation time ($p < 0.05$). Additionally, colonies obtained in plates were confirmed as belonging to species of starter culture commonly used in the production of salami, indicating the selectivity of appropriated protocols evaluated. The results show the relevance of using Petrifilm™ AC added to chlorophenol red for enumeration of starter culture in salami.

Keywords: Petrifilm™ AC, starter cultures, salami, enumeration

1. Introdução

Produtos cárneos fermentados são amplamente consumidos pela população devido a seus aspectos sensoriais característicos. Originalmente, o processo de fermentação de produtos cárneos foi desenvolvido empiricamente para conservar esses alimentos por longos períodos de tempo, possibilitando sua estocagem e distribuição em diferentes condições e regiões. Em escala industrial, esse processo permite a preservação de produtos cárneos e retarda a deterioração devido a adição de sais, redução do pH (produção de ácidos) e da atividade de água (desidratação) (Toldrá, 2010). Ainda, culturas starter específicas são adicionadas com o objetivo de promover alterações sensoriais características (como coloração, sabor, textura) e eventualmente promover o controle de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, devido a produção de substâncias antimicrobianas (Hammes & Hertel, 1998).

As principais culturas starter utilizadas para produção de derivados cárneos fermentados são micro-organismos do grupo das bactérias lácticas (BAL) e *Staphylococcus coagulase negativa*. Micro-organismos dos gêneros *Pediococcus* e *Lactobacillus* são os usualmente empregados pela indústria de alimentos, e possuem como principal característica a produção de ácido lático a partir dos carboidratos, determinando acidificação dos produtos e produção de compostos responsáveis pelo aroma e sabor (Bacus, 1984; Terra, 1998). Adicionalmente, cepas específicas de BAL podem ser adicionadas como culturas protetoras, devido a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas que efetivamente podem controlar a multiplicação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos (Milani et al., 2003; Toldrá, 2010).

Staphylococcus coagulase negativa, tais como *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus*, *S. equorum* e *S. saprophyticus*, contribuem para o desenvolvimento e a estabilidade da cor vermelha desejada em embutidos fermentados por meio da atividade

da enzima nitratedutase (Miralles et al., 1996). Ainda, esses micro-organismos também contribuem para o desenvolvimento de outras propriedades sensoriais, como textura e aroma, devido a produção de enzimas específicas utilizadas no metabolismo de proteínas e lipídeos (Berdague et al., 1993; Hammes & Hertel, 1998; Sondergaard & Stahnke, 2002).

Considerando a complexa microbiota que derivados cárneos fermentados possuem, o monitoramento adequado dessas populações é indispensável para manutenção da qualidade e inocuidade desses produtos. Entretanto, as metodologias convencionais de enumeração de culturas starter em alimentos possuem limitações quanto a praticidade e seletividade, o que limita a quantificação precisa de alguns grupos de micro-organismos, especialmente BAL. Como alternativa, placas Petrifim™ Aerobic Count (Petrifim™ AC, 3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA) tem sido empregadas para enumeração de culturas starter em alimentos fermentados, desde que associadas a meios de cultura com agentes seletivos para grupos microbianos específicos. Entretanto, os estudos científicos desenvolvidos para avaliação desses protocolos alternativos são restritos a derivados lácteos (Champagne et al., 1994; McGregor et al., 1995; Miranda et al., 2011; Nero et al., 2006; Ortolani et al., 2007; Pattison et al., 1998). Em produtos cárneos, existe a recomendação de utilização de um protocolo alternativo que emprega a utilização do caldo de Mann, Rogosa & Sharpe (MRS) suplementado com vermelho de clorofenol em placas Petrifim™ AC, para permitir a diferenciação de colônias de culturas starter acidificantes (Fisher et al., 2011). Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar o desempenho desse protocolo alternativo para enumeração de culturas starter em salames, comparando com diferentes protocolos convencionais de enumeração.

2. Material e Métodos

2.1. Avaliação de protocolos de enumeração de culturas starter e culturas puras de BAL

2.1.1. Micro-organismos e culturas starter

Na Tabela 1 são apresentados os micro-organismos e as culturas starter que foram utilizados no estudo.

Tabela 1. Culturas starter e micro-organismos utilizados no estudo.

Starter/gênero	n	Especificação	Origem*
TEXEL AS 308	1	Lactobacillus sakei, Staphylococcus carnosus, S. xylosus	DuPont®
TEXEL Prism 1	1	L. sakei, S. vitulinus, S. xylosus	DuPont®
Lactobacillus	9	L. casei (4)	CNRZ 313, CNRZ 1244, CNRZ 1874, CNRZ 1393
		L. paracasei (3)	CCT 7501, ATCC 10746, ATCC 335
		L. plantarum (2)	ATCC 8014, ATCC10012
Lactococcus	3	L. lactis (1)	Cepa de campo
		L. lactis subs. lactis (2)	Cepas de campo
Pediococcus	1	P. pentosaceus	Cepa de campo
Staphylococcus	1	S. xylosus (1)	ATCC 29971

* DuPont®: Danisco®, Madison, VA, EUA; CNRZ: Centre National de Recherches Zootechniques, Jouy-en-Josas, France, CCT: Coleção de Culturas Tropical, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas, SP, Brasil; ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA.

As culturas starter foram preparadas conforme as instruções do fabricante, e submetidas à diluição em caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), até obtenção de uma turbidez semelhante a escala 1 de MacFarland, o que corresponde a aproximadamente 3×10^8 Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL).

As culturas isolados foram conservadas em caldo MRS (Oxoid) suplementado com glicerol a 20% (v/v) a -80 °C. Para utilização, alíquotas das culturas foram

estriadas em ágar MRS (Oxoid), incubadas a 35 °C por 24 h, e colônias isoladas transferidas para caldo MRS (Oxoid), com incubação a 35 °C por 24 h. Em seguida, as culturas obtidas foram diluídas em caldo MRS até obtenção de uma turbidez semelhante a escala 1 de MacFarland, conforme descrito anteriormente.

2.1.2. Protocolos para enumeração de micro-organismos

As culturas starter e as culturas puras foram submetidas a seis protocolos distintos para enumeração:

- ✓ Protocolo 1 (Petrifim™ AC adicionado de caldo MRS associado ao vermelho de clorofenol, aerobiose). As culturas obtidas foram diluídas em escala seriada decimal em caldo MRS (Oxoid) adicionado de uma solução de vermelho de clorofenol (Dinâmica Ltda, Diadema, SP, Brasil), a fim de se obter uma concentração final no caldo de 21 mg a cada 100 mL. Diluições foram selecionadas e semeadas em placas Petrifilm™ AC, com incubação em aerobiose a 35 °C (Fisher et al., 2011). As colônias formadas foram enumeradas após 24, 48 e 72 h de incubação;
- ✓ Protocolo 2 (Petrifim™ AC adicionado de caldo MRS associado ao vermelho de clorofenol, anaerobiose). Esse protocolo foi definido como uma modificação do proposto por Fisher et al. (2011), considerando protocolos prévios para enumeração de BAL definidos pelo fabricante (3M Microbiologia). As mesmas diluições utilizadas acima foram semeadas em Petrifilm™ AC e incubadas em anaerobiose (GasPak, BD - Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) a 30 °C. As colônias formadas foram enumeradas após 24, 48 e 72 h de incubação;
- ✓ Protocolo 3 (MRS adicionado de vermelho de clorofenol). Esse protocolo foi utilizado como uma modificação do proposto por Fisher et al. (2011),

considerando a sua adaptação para o procedimento convencional. As culturas obtidas foram diluídas em escala seriada decimal em caldo MRS (Oxoid), e as mesmas diluições utilizadas nos protocolos anteriores foram selecionadas e semeadas pour plate e em duplicata em ágar MRS (Oxoid) adicionado de uma solução de vermelho de clorofenol (Dinâmica), a fim de se obter uma concentração final de 21 mg a cada 100 mL. As placas foram incubadas em aerobiose a 35 °C, e as colônias formadas foram enumeradas após 24, 48 e 72 h de incubação;

- ✓ Protocolo 4 (MRS adicionado de púrpura de bromocresol). Esse protocolo foi definido considerando a metodologia padrão utilizada como referência de comparação por Fisher et al. (2011). As mesmas diluições utilizadas acima foram semeadas pour plate e em duplicata em ágar MRS (Oxoid) adicionado de uma solução de púrpura de bromocresol (BD), a fim de se obter uma concentração final de 1,6 g a cada 100 mL. As placas foram incubadas em anaerobiose (GasPak, BD) a 35 °C, e as colônias formadas foram enumeradas após 24, 48 e 72 h de incubação;
- ✓ Protocolo 5 (MRS pH 5.7). Esse protocolo foi definido considerando a metodologia ISO 15214/1998 (ISO, 1998). As mesmas diluições utilizadas acima foram semeadas pour plate e em duplicata em ágar MRS (Oxoid) com pH ajustado a 5.7. As placas foram incubadas em aerobiose a 30 °C, e as colônias formadas foram enumeradas após 24, 48 e 72 h de incubação;
- ✓ Protocolo 6 (agar All Purpose Tween, APT). Esse protocolo foi definido considerando a metodologia descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Hall et al., 2001). As mesmas diluições utilizadas acima foram semeadas pour plate e em duplicata em ágar APT (BD) suplementado com sacarose (2%, m/v) e com uma solução de púrpura de

bromocresol (BD), a fim de se obter uma concentração final de 1,6 g a cada 100 mL. As placas foram incubadas em aerobiose a 25 °C, e as colônias formadas foram enumeradas após 24, 48 e 72 h de incubação;

Todas as análises foram conduzidas em três repetições independentes. Os resultados obtidos foram convertidos em \log_{10} , e após verificação de normalidade, submetidos à Análise de Variância e teste de Tukey para verificação de diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as contagens obtidas por cada protocolo de enumeração e tempo de incubação. As contagens obtidas pelos Protocolos 1 e 2 também foram comparadas por regressão linear, para verificação dos níveis de equivalência entre os mesmos após diferentes tempos de incubação ($p < 0.05$).

2.2. Avaliação de protocolos de enumeração de culturas starter em salames comerciais

2.2.1. Amostras e análises microbiológicas

Trinta amostras de salames, provenientes de diferentes indústrias de beneficiamento de alimentos (todas fiscalizadas pelo Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil) e diferentes lotes de produção, foram obtidos em pontos comerciais.

Porções de 25 g das amostras foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada 0.1% (m/v) em Stomacher durante cinco minutos e submetidas à diluições seriadas decimais utilizando-se caldo MRS (Oxoid) ou caldo MRS (Oxoid) adicionado de vermelho de clorofenol, preparado conforme descrito no Protocolo 1 (item 1.1.2.). Diluições selecionadas foram então submetidas a quatro dos protocolos descritos para enumeração de culturas starter, conforme descrito no item 2.1.2.: protocolos 1, 2, 3 e 5.

Os resultados obtidos foram convertidos em \log_{10} , comparados por ANOVA e Tukey para verificação de diferenças significativas ($p < 0.05$), e por regressão linear, para verificação dos níveis de equivalência ($p < 0.05$). As análises foram realizadas considerando os protocolos adotados e os tempos de incubação definidos para enumeração das colônias.

2.2.2. Especificidade dos protocolos de enumeração de culturas starter em salames

Após os períodos de incubação, colônias de cada uma das amostras foram selecionadas de maneira representativa (10% da contagem observada em uma placa selecionada) para cada protocolo testado (típicas e atípicas, com ou sem formação de gás). Um total de 850 colônias foram obtidas, purificadas por passagens repetidas em ágar MRS (Oxoid) com incubação a 35 °C, e submetidas a testes adicionais para identificação de características típicas de culturas starter: coloração de Gram (morfologia) e produção de catalase.

Considerando os resultados obtidos, 73 isolados foram selecionados e submetidos a extração de DNA com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, WI, EUA), e submetidos a agrupamento genético por rep-PCR, utilizando o primer GTG₅ (Gevers et al., 2001; Versalovic et al., 1994). As reações de PCR continham 12,5 µL de Go Taq Green Master Mix 2x (Promega), 1 µL de cada primer 50 pMol, 2 µL de DNA e água livre de DNA (Promega) até completar o volume de 25 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador com as seguintes condições: ciclo inicial a 95 °C por 30 s, 30 ciclos com anelamento a 40 °C por 30 s, e 65 °C por 8 min, e uma extensão final a 65 °C por 16 min (Dal Bello et al., 2010). Os produtos obtidos foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose a 2% em tampão TBE 0.5x e corados utilizando GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). Os perfis genéticos obtidos foram registrados e analisados pelo software BioNumerics 6.6

(Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). A similaridade entre os perfis foi calculada usando a correlação de Dice (Otimização de 1% e 5% de tolerância) e um dendrograma foi obtido a partir dos perfis.

Considerando os perfis genéticos observados e uma taxa de similaridade de 80%, 25 isolados foram selecionados, submetidos a reação de PCR para amplificação de uma região do gene 16S rRNA, utilizando os primers P1V1 e P4V3 (Klijn et al., 1991). As reações de PCR continham 25 µL de Go Taq Green Master Mix 2x (Promega), 1 µL de cada um dos primers (10 pMol), 2 µL de DNA e água livre de DNA até completar o volume final de 50 µL. As condições do PCR foram descritas segundo Klijn et al. (1991). Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados (Macrogen Inc., Seul, Coréia do Sul), e as sequências obtidas foram comparadas utilizando o National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando o software Basic Alignment Search Tool (BLAST) para identificação dos isolados (Dal Bello et al., 2010).

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação de protocolos de enumeração de culturas starter e isolados bacterianos

As médias das contagens das culturas starter e culturas puras enumeradas pelos seis protocolos considerados nessa etapa do estudo são apresentadas na Tabela 2. A análise de variância indicou ausência de diferenças significativas entre os protocolos de enumeração, independente dos tempos de incubação considerados (24, 48 e 72 horas) ($p > 0,05$, Tabela 2).

Considerando os resultados obtidos nas placas de Petrifim™ AC, independente das condições atmosféricas avaliadas (protocolos 1 e 2), as culturas apresentaram colônias de coloração vermelha com halos amarelos, exceto AS 308, que apresentou colônias vermelhas, mas sem halos indicadores de acidificação, e as culturas de

Lactococcus, que apresentaram colônias levemente avermelhadas com halos amarelos. Fisher et al. (2011) avaliaram somente o desempenho das placas Petrifilm™ AC em condições de aerobiose, e observaram que a presença de zonas ácidas ao redor de colônias vermelhas é um indicador precoce da presença de micro-organismos acidificantes. Fisher et al. (2011) também relataram a presença de gás associado às colônias formadas nas placas de Petrifilm™ AC, que foi considerada um indicativo adicional para detecção de BAL e uma vantagem sobre os protocolos convencionais utilizados como referência para comparação.

Tabela 2. Médias e desvios padrão das contagens das culturas starter e culturas puras enumeradas por seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL)

Protocolo	Tempo de incubação		
	24h	48h	72h
1	7.83 ± 0.83	7.64 ± 0.75	7.84 ± 0.73
2	7.67 ± 1.07	7.80 ± 0.81	7.80 ± 0.79
3	7.55 ± 0.97	7.69 ± 0.70	7.70 ± 0.71
4	7.70 ± 0.71	7.77 ± 0.66	7.80 ± 0.68
5	7.42 ± 0.90	7.57 ± 0.91	7.59 ± 0.75
6	7.43 ± 1.04	7.65 ± 0.96	7.64 ± 0.94

ANOVA: $F_{(17,664)} = 0.73$, $p = 0.771$

Nero et al. (2006) identificaram que algumas espécies de BAL são inibidas ou não reduzem o TTC presente nas placas de Petrifilm™ AC, o que pode comprometer a confiabilidade das contagens obtidas. Entretanto, os micro-organismos utilizados neste estudo não apresentaram essa limitação. Champagne et al. (1994) também não encontraram limitações para a enumeração de culturas puras de *L. lactis* em Petrifilm™ AC associado a MRS.

Após 24 h de incubação, *AS 308* e *S. xylosum* não apresentaram formação de colônias em placas contendo ágar MRS com pH ajustado para 5.7 (protocolo 5, ISO 15214/1998) (dados não apresentados). Por esse protocolo, as colônias formadas apresentaram difícil visualização, comprometendo a enumeração precisa das culturas.

Considerando o protocolo 3, que utilizou o ágar MRS adicionado de vermelho de clorofenol, as colônias apresentaram coloração branca-amarelada com halo amarelo, indicando a produção de ácidos, permitindo a identificação precisa dos microorganismos acidificantes.

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas contagens das culturas referência e culturas starter obtidas pelos protocolos 4 (MRS adicionado de púrpura de bromocresol) e 6 (APT) quando comparadas com os demais protocolos, dificuldades técnicas foram observadas durante as análises. Pelo protocolo 4, as colônias formadas apresentaram tamanho reduzido e com difícil visualização, e pelo protocolo 6 as colônias formadas apresentaram pouca consistência e tenderam a confluir, formando aglomerados. A adição de Tween 80 na formulação do APT, utilizado no protocolo 6, pode ser o responsável por essa característica.

Embora tenham sido identificadas dificuldades técnicas, de maneira geral as contagens de culturas puras e culturas starter não apresentaram diferenças significativas considerando os diferentes tempos de incubação (exceto para AS 308 e *S. xylosus* em MRS com pH 5.7, dados não apresentados) (Tabela 2). Esses resultados indicam que a enumeração desses grupos pode ocorrer após 24 h de incubação nas condições avaliadas, permitindo a obtenção de resultados em um curto período.

As dispersões das contagens de culturas pura e culturas starter obtidas pelos protocolos 1 e 2 em diferentes tempos de incubação são apresentados na Figura 1. Os resultados indicaram uma correlação significativa entre os protocolos, indicando a equivalência entre as contagens de culturas puras e culturas starter obtidas em aerobiose e em anaerobiose ($p < 0,05$). Os parâmetros de regressão linear também indicam correlações adequadas entre as contagens obtidas após 24 h de incubação, o que indica a viabilidade de utilização desses protocolos para a rápida enumeração desses microorganismos (Figura 1). A conveniência da utilização de placas Petrifilm™ AC para

enumeração de culturas puras, devido a possibilidade de redução do tempo de incubação, já foi descrita em estudos similares desenvolvidos com culturas lácticas e bifidobactérias (Fisher et al., 2011; Miranda et al., 2011).

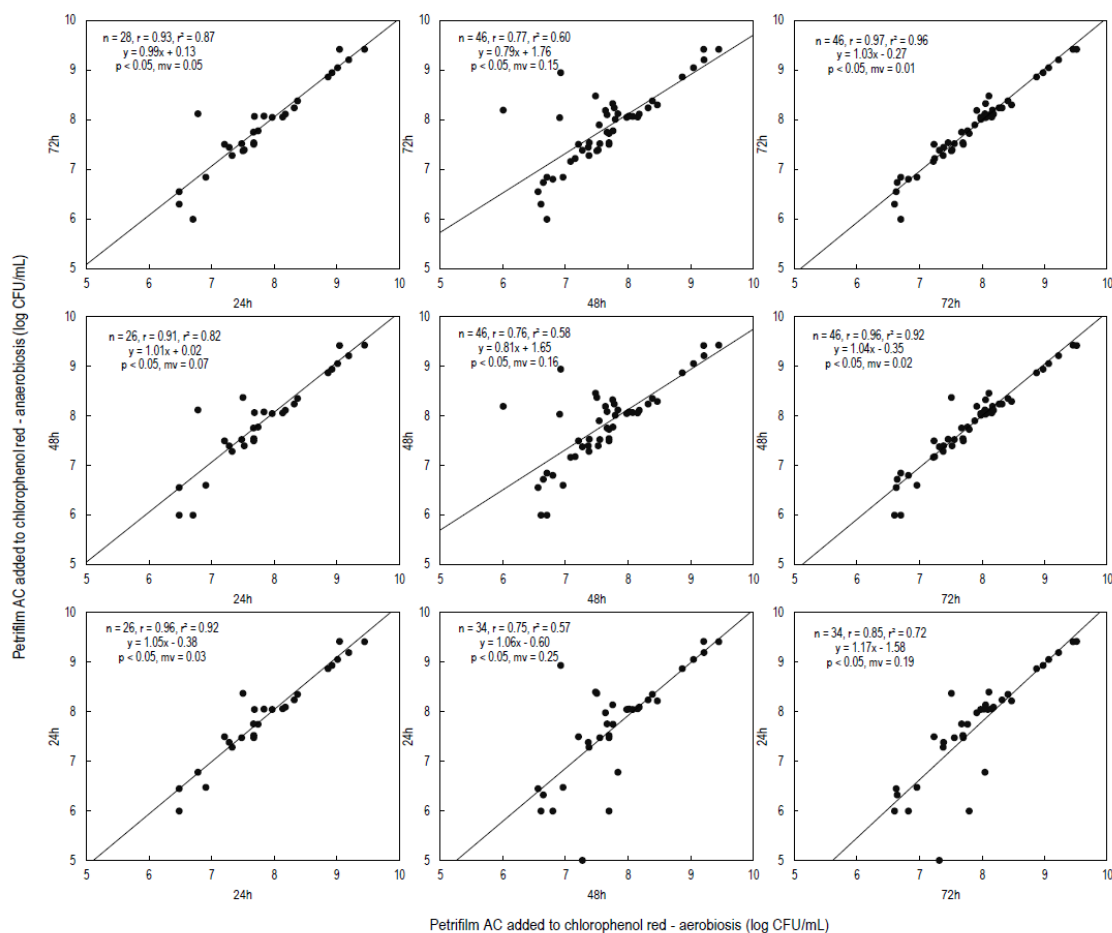


Figura 1. Parâmetros de correlação entre as contagens de culturas puras e culturas starter em Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol em diferentes condições de incubação (aerobiose e anaerobiose) e após os diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h). n = número; r = índice de correlação; r² = coeficiente de determinação; p = nível de significância.

3.2. Avaliação de protocolos de enumeração de culturas starter em salames comerciais

Considerando as limitações observadas na etapa anterior do estudo, os protocolos 4 e 6 não foram incluídos para enumeração de culturas starter em amostras de salame. As médias das contagens de culturas starter presentes nas amostras de salame são apresentadas na Tabela 3. De acordo com os resultados obtidos, não foram

observadas diferenças significativas entre os protocolos avaliados, independente dos tempos e condições de incubação. Esses resultados confirmam o desempenho observado pelos protocolos alternativos para enumeração de BAL e culturas starter considerando diferentes tempos de incubação (Tabela 2), destacando a possibilidade de redução nesses períodos visando a rapidez na obtenção de resultados finais. Resultados semelhantes foram observados por Fisher et al. (2011) em amostras de alimentos, incluindo amostras de carne, e por Miranda et al. (2011) em leites fermentados adicionados de bifidobactérias.

Tabela 3: Médias e desvios padrão das contagens de culturas starter presentes nas amostras de salame, considerando quatro protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/g)

Protocolo	Tempo de incubação		
	24h	48h	72h
1	6.44 ± 1.30	6.68 ± 1.21	6.73 ± 1.20
2	6.38 ± 1.49	6.67 ± 1.30	6.81 ± 1.14
3	6.94 ± 1.24	6.63 ± 1.37	6.77 ± 1.28
5	6.67 ± 1.05	6.63 ± 1.50	6.88 ± 1.29

ANOVA: $F_{(11,307)} = 0.38, p = 0.963$

A Figura 2 apresenta as dispersões das contagens de culturas starter das amostras de salame, obtidas pelos protocolos 1 e 2. Assim como para as culturas puras e culturas starter (Figura 1), pode ser observado que todas as correlações foram significativas ($p < 0,05$), indicando equivalências entre os protocolos independente das condições (aerobiose ou anaerobiose) e tempos (24, 48, 72h) de incubação. Esses resultados confirmam a viabilidade de utilização de condições de aerobiose e um reduzido período de incubação para enumeração de culturas starter em amostras de salame, representando vantagens a serem consideradas no monitoramento desses micro-organismos.

As dispersões entre as contagens obtidas pelas metodologias convencionais (protocolos 3 e 5, considerando apenas as contagens obtidas após 72 h de incubação) e as contagens obtidas com Petrifilm™ AC (protocolos 1 e 2, considerando 24, 48 e 72 h) são apresentadas nas Figuras 3 e 4. Todas as correlações observadas foram significativas ($p < 0,05$), indicando equivalência entre os protocolos alternativos e tradicionais.

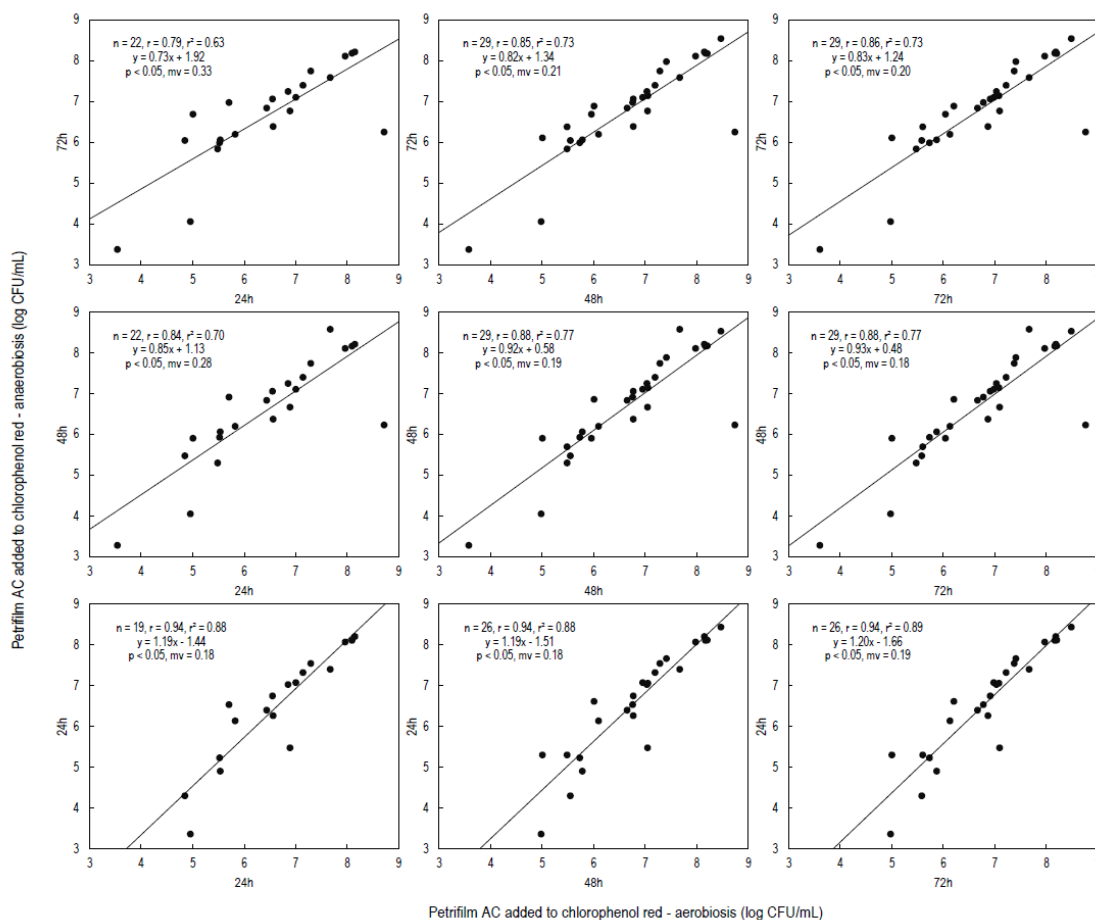


Figura 2. Parâmetros de correlação entre as contagens de culturas starter adicionadas nos salames em Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol em diferentes condições de incubação (aerobiose e anaerobiose) e após os diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h). n = número de amostras; r = índice de correlação; r² = coeficiente de determinação; p = nível de significância.

Nas comparações dos protocolos considerando as contagens obtidas em Petrifilm™ AC em aerobiose, os parâmetros de correlação foram melhores com o

protocolo 5 (MRS pH 5.7) (Figura 3). Em relação as contagens obtidas com Petrifilm™ AC em anaerobiose, os parâmetros de correlação não apresentaram variação relevante nas diferentes comparações realizadas (Figura 4). Esses resultados confirmam a equivalência entre as contagens de culturas starter em salame obtidas pelos diferentes protocolos, e destaca o desempenho adequado das placas Petrifilm™ AC para enumeração após 24 h de incubação.

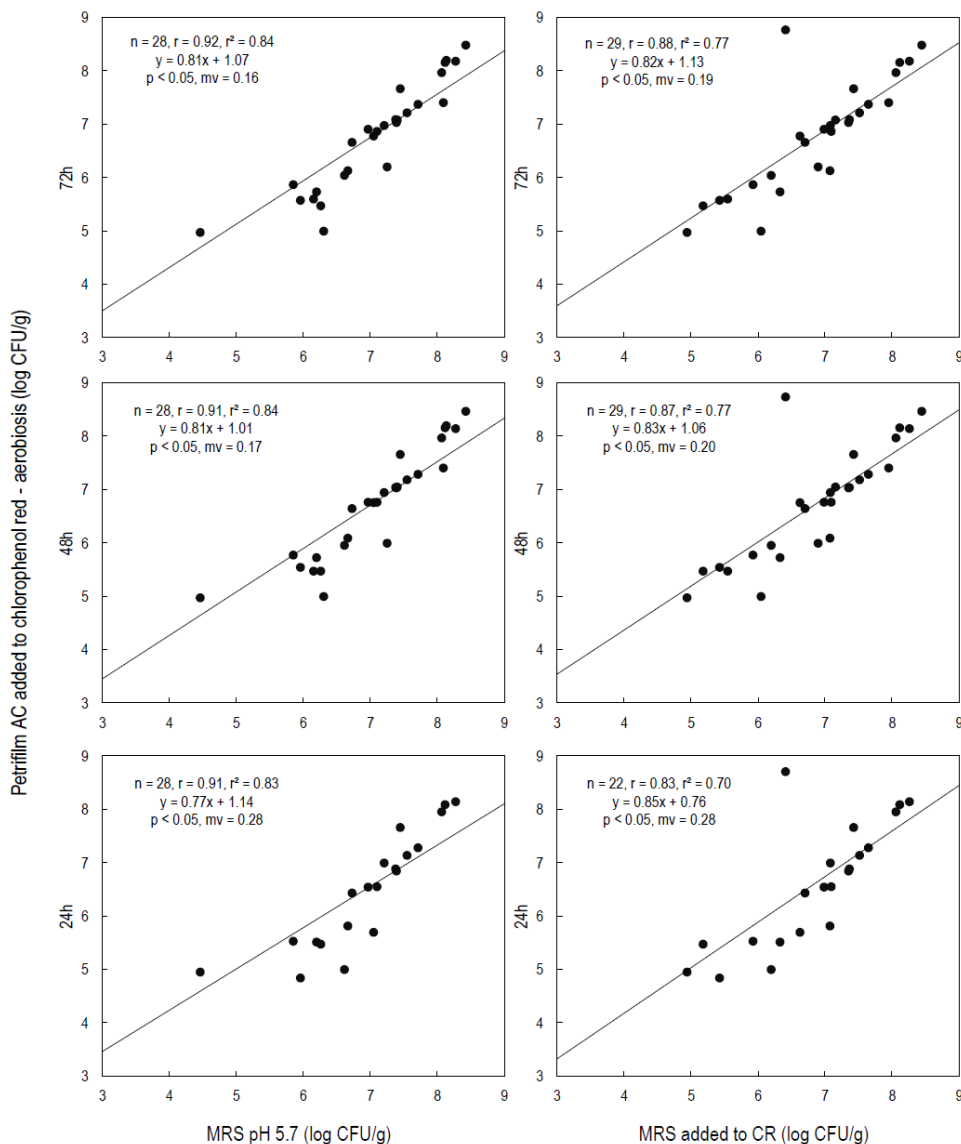


Figura 3: Parâmetros de correlação entre as contagens de culturas starter adicionadas nos salames em Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol em aerobiose e em dois protocolos convencionais após os diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h). n = número de amostras; r = índice de correlação; r^2 = coeficiente de determinação; p = nível de significância.

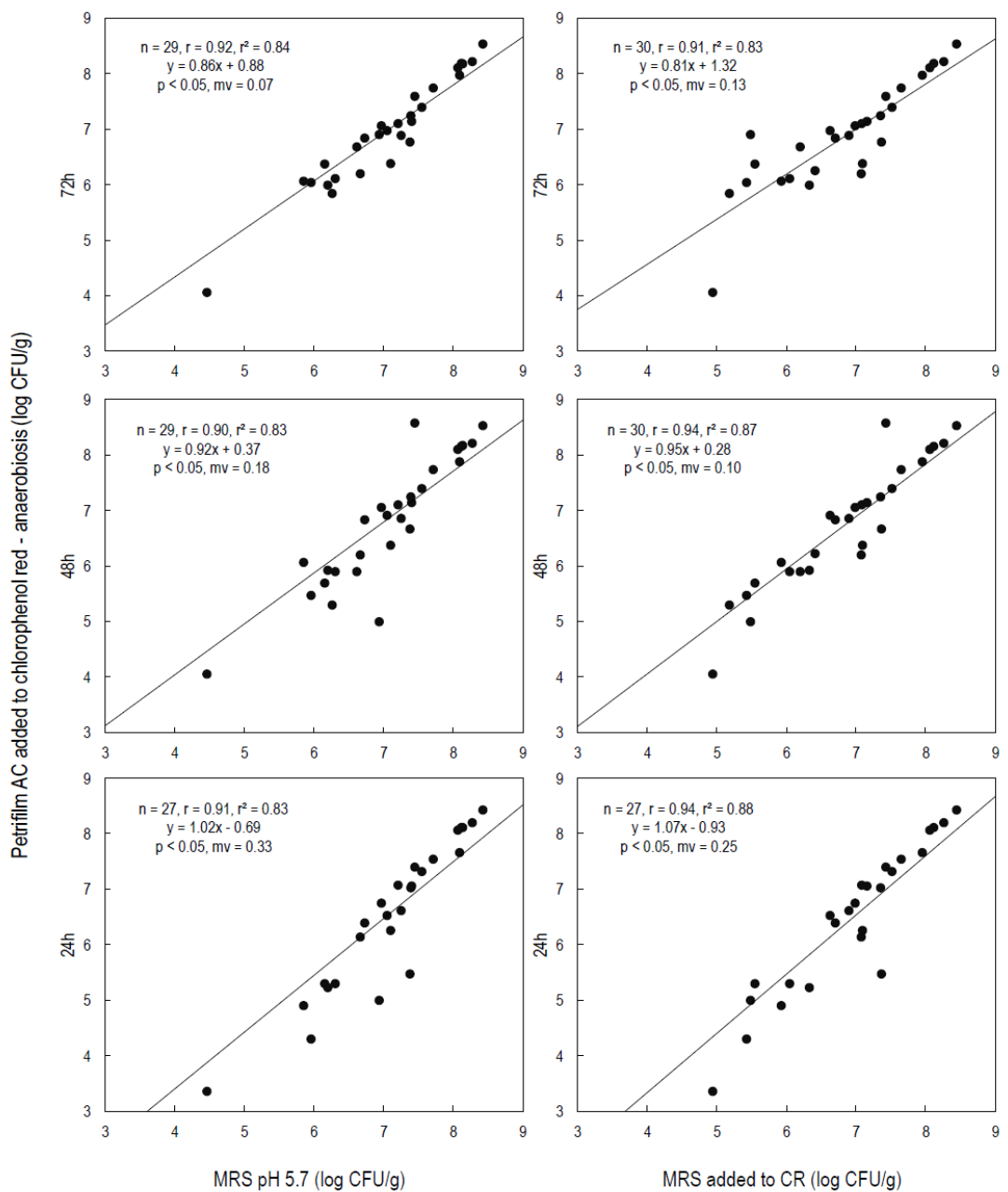


Figura 4: Parâmetros de correlação entre as contagens de culturas starter adicionadas nos salames em Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol em anaerobiose e em dois protocolos convencionais após os diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h). n = número de amostras; r = índice de correlação; r^2 = coeficiente de determinação; p = nível de significância.

Embora não sejam observados estudos similares em produtos cárneos, o desempenho adequado do Petrifilm™ AC associado a meios de cultura seletivos para enumeração de culturas starter, especialmente BAL, já foi demonstrado em diferentes

derivados lácteos fermentados (Champagne et al., 1994; Gonçalves et al., 2009; Nero et al., 2008; Ortolani et al., 2007). Assim como observado no presente estudo, as pesquisas que demonstram a equivalência entre métodos alternativos e os procedimentos convencionais de enumeração fornecem dados científicos que permitem a sua utilização durante o controle de qualidade desses produtos, representando alternativas viáveis e confiáveis para a indústria de alimentos.

Além disso, os protocolos propostos com Petrifilm™ AC apresentaram desempenho adequado para a enumeração das culturas starter de salames após 24 h de incubação, representando uma vantagem adicional aos protocolos convencionais por reduzir o tempo necessário para obtenção dos resultados finais. Essa vantagem em relação ao menor tempo de incubação requerido pelas placas Petrifilm™ AC para enumeração de culturas lácticas, incluindo culturas starter e culturas probióticas, já foi observada em estudos anteriores, e pode ser considerada um importante diferencial para a sua utilização pela indústria de alimentos para monitoramento da qualidade de produtos fermentados (Fisher et al., 2011; Miranda et al., 2011).

Embora as contagens apresentem equivalência, é importante ressaltar que uma avaliação da especificidade desses protocolos deva ser desenvolvida, o que permite demonstrar que os micro-organismos enumerados sejam efetivamente os alvos da pesquisa. Assim, ao final dos períodos de incubação dos quatro protocolos considerados nessa etapa do estudo, 850 colônias foram purificadas e caracterizadas quanto à morfologia pela coloração de Gram e produção de catalase. Os resultados dessa caracterização são apresentados na Tabela 4.

Considerando os resultados apresentados na Tabela 4, pode ser verificado que todos os micro-organismos que conseguiram formar colônias nos meios de cultura dos protocolos avaliados apresentaram morfologia e resultado de catalase compatíveis com culturas starter usualmente encontradas em embutidos cárneos, indicando que os

protocolos apresentaram a seletividade desejada para o monitoramento dessas populações bacterianas. Estudos de avaliação da microbiota autóctone de salames e embutidos artesanais demonstram uma participação efetiva de micro-organismos do gênero *Lactobacillus* e outras BAL (Carpiné et al., 2010; Sawitzki, 2007); os resultados obtidos com amostras comerciais de salame também evidenciam a participação desses micro-organismos como componentes das culturas starter adicionadas, além de cocos Gram positivos e catalase positiva (Tabela 4).

Tabela 4: Características morfológicas de 850 colônias obtidas de amostras de salame semeadas em Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho clorofenol e incubado em aerobiose (Protocolo 1), Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS adicionado de vermelho clorofenol e incubado em anaerobiose (Protocolo 2), ágar MRS adicionado de vermelho de clorofenol (Protocolo 3) e MRS com pH ajustado a 5,7 (Protocolo 5).

Morfologia	Catalase	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 5
cocos Gram +	positiva	16	0	11	5
	negativa	146	104	154	189
bacilos Gram +	negativa	40	46	58	81
TOTAL		202	150	223	275

A composição da microbiota dos salames avaliados caracterizada na Tabela 4 foi confirmada pela identificação molecular de 25 isolados selecionados, definidos considerando um nível de similaridade de 80% dos perfis genéticos obtidos pelo rep-PCR (Dal Bello et al., 2010) (Figura 5). Esses resultados são compatíveis com a composição esperada da microbiota de culturas starter adicionadas em produtos cárneos embutidos, especialmente salames, que deve ser compostas por BAL (*Lactobacillus* e *Pediococcus*) e cocos Gram positivo e catalase positiva (*Staphylococcus* e *Kocuria*). Esses grupos são responsáveis pelas reações microbianas que ocorrem simultaneamente durante a fermentação (Toldrá, 2010). Esses resultados confirmam a seletividade dos protocolos empregados para enumeração de culturas starter nas amostras avaliadas.

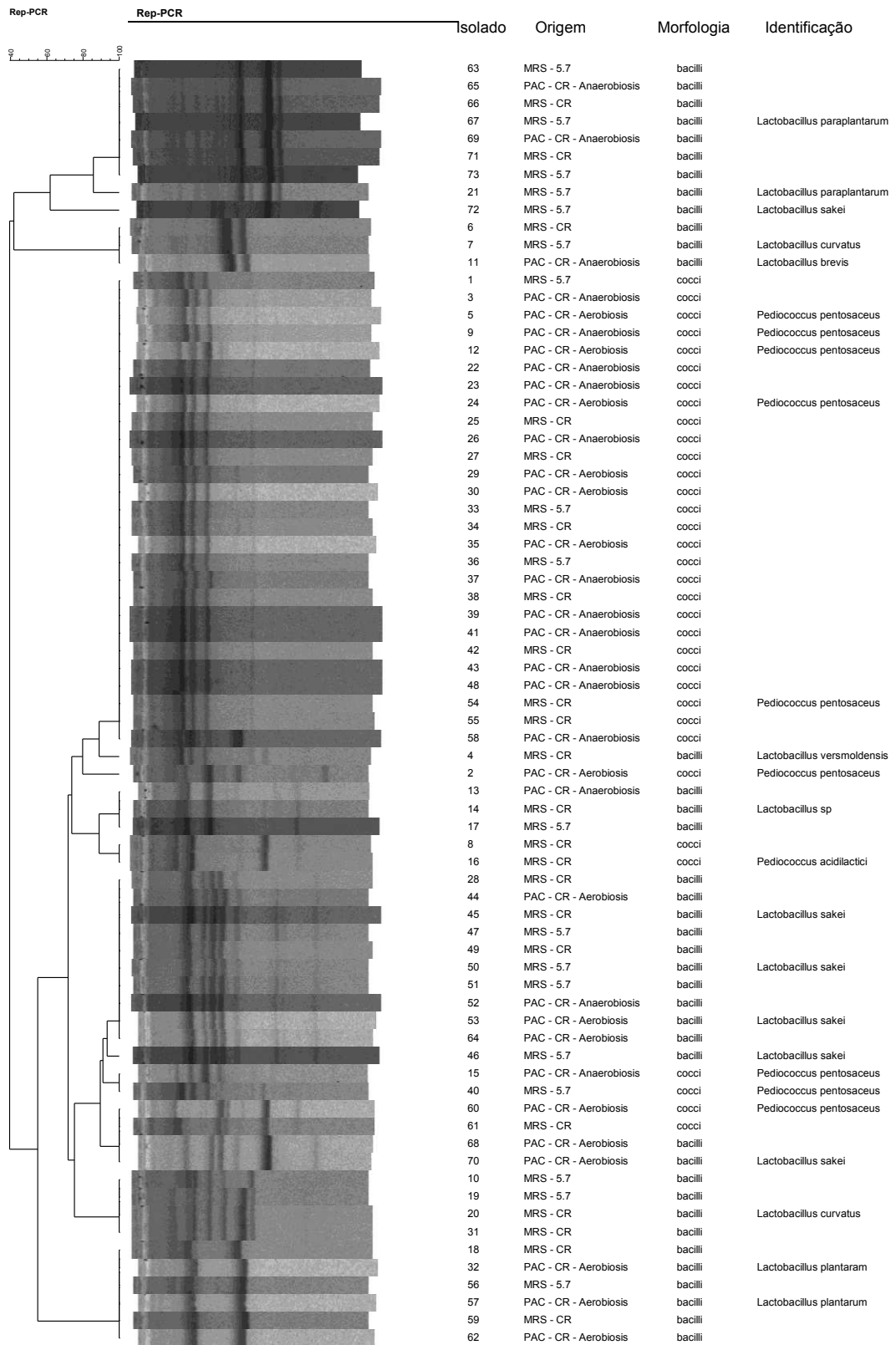


Figura 5: Taxas de similaridade, perfis genéticos obtidos por rep-PCR, isolados, origem e morfologia pela coloração de Gram de 73 isolados obtidos de amostras de salame, e identificação de 25 isolados selecionados (sequenciamento do gene 16s RNA). PAC: Petrifilm™ AC, CR: vermelho de clorofenol; MRS: de Mann, Rogosa & Sharpe.

Placas Petrifilm™ possuem a vantagem de ser uma metodologia de fácil utilização para contagem e detecção de BAL em uma variedade de alimentos. Esse sistema é simples, elimina o demorado procedimento para confirmação da produção de gás pelas BAL, utilizado nos protocolos convencionais, reduz custos com preparação de material, elimina a necessidade de produzir e esterilizar os meios de cultura, necessita de menor espaço para a incubação, além de eliminar custos com material para manter o ambiente anaeróbico (Fisher et al., 2011; Franco, 2006; Nero et al., 2006). Essas vantagens são importantes para um controle de qualidade eficiente nas indústrias de alimentos, permitindo a otimização do monitoramento dessas populações bacterianas durante os processos de produção e maturação de embutidos cárneos.

Os resultados obtidos demonstram a viabilidade de utilização das placas Petrifilm™ AC associadas ao caldo MRS adicionado com vermelho de clorofenol para enumeração seletiva de culturas starter em amostras de salame, com incubação em aerobiose ou em anaerobiose e após 24 horas de incubação. Essa aplicabilidade foi confirmada pela equivalência das contagens obtidas por esses protocolos com procedimentos convencionais e padronizados de enumeração, e também pela seletividade das culturas enumeradas, representando uma alternativa viável e confiável para a indústria de alimentos realizar o monitoramento dessas populações bacterianas.

Agradecimentos

CAPES, CNPq, FAPEMIG.

Referências

- Bacus, J., 1984. UPDATE - Meat Fermentation 1984. *Food Technology* 38:59-63.
- Berdague, J.L., Monteil, P., Montel, M.C., & Talon, R., 1993. Effects of Starter Cultures on the Formation of Flavor Compounds in Dry Sausage. *Meat Science* 35:275-287.
- Carpiné, D., Dagostin, J.L.A., Dalla Santa, H.S., Alvarez, D.C., Terra, N.N., & Dalla Santa, O.R., 2010. Proteolytic and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal sausages. *Ambiência Guarapuava* 6:125-132.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Piette, M., & St-Gelais, D., 1994. The Use of Petrifilm (R) for the Enumeration of Lactococci. *International Dairy Journal* 4:789-795.
- Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., & Cocolin, L., 2010. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT - Food Science and Technology* 43:1151-1159.
- Fisher, K., Crowley, E., Bird, P., Boyle, M., Goetz, K., Benzinger Jr, M.J., Juenger, M., Huffman, T., Agin, J., & Goins, D., 2011. A comparative evaluation of the aerobic procedure for lactic acid bacteria with 3M Petrifilm Aerobic Count Plates with two reference methods for the enumeration of lactic acid bacteria in food and environmental surfaces, p. 19. Q Laboratories, Cincinnati, OH.
- Franco, B.D.G.M., 2006. Métodos rápidos e automação em microbiologia de alimentos. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Gevers, D., Huys, G., & Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205:31-36.

- Gonçalves, M.M., Freitas, R., Nero, L.A., & Carvalho, A.F., 2009. Enumeration of starter cultures during yogurt production using Petrifilm™ AC plates associated with acidified MRS and M17 broths. *Journal of Dairy Research* 76:229-233.
- Hall, P.A., Ledenbach, L., & Flowers, R.S., 2001. Acid-producing microorganisms, p. 201-208. In: Downes, F.P. and Ito, K. (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. APHA, Washington, DC.
- Hammes, W.P. & Hertel, C., 1998. New developments in meat starter cultures. *Meat Science* 49:S125-S138.
- ISO, 1998. ISO 15214/1998 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria -- Colony-count technique at 30 degrees C. ISO, Geneva, Switzerland.
- Klijn, N., Weerkamp, A.H., & Devos, W.M., 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction amplified variable regions of 16S ribosomal-RNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* 57:3390-3393.
- McGregor, J.U., Traylor, S.M., Gough, R.H., Hazlett, S., & Bird, K., 1995. Recovery of lactic acid bacteria on Petrifilm SM under various incubation atmospheres. *Journal of Food Protection* 58:316-318.
- Milani, L.I.G., Fries, L.L.M., Paz, P.B., Bellé, M., & Terra, N.N., 2003. Bioproteção de linguiça de frango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 23:161-166.
- Miralles, M.C., Flores, J., & Martinez, G.P., 1996. Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiology* 13:227-236.
- Miranda, R.O., Neto, G.G., Freitas, R., Carvalho, A.F., & Nero, L.A., 2011. Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm™ AC in pure cultures and in a

- fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology* 28:1509-1513.
- Nero, L.A., Beloti, V., Barros, M.A.F., Ortolani, M.B.T., Tamanini, R., & Franco, B.D.G.M., 2006. Comparison of Petrifilm Aerobic Count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 14:249-257.
- Nero, L.A., Rodrigues, L.A., Viçosa, G.N., & Ortolani, M.B.T., 2008. Performance of Petrifilm Aerobic Count plates on enumeration of lactic acid bacteria in fermented milks. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 16:132-139.
- Ortolani, M.B.T., Viçosa, G.N., Beloti, V., & Nero, L.A., 2007. Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in Petrifilm™ Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology. *Journal of Dairy Research* 74:387-391.
- Pattison, T.L., Geornaras, I., & von Holy, A., 1998. Microbial populations associated with commercially produced South African sorghum beer as determined by conventional and Petrifilm™ plating. *International Journal of Food Microbiology* 43:115-122.
- Sawitzki, M.C., 2007. Propriedades tecnológicas de *Lactobacillus plantarum* isolados de salames artesanais e aplicado como cultivo iniciador em salame tipo milano. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:547-552.
- Sondergaard, A.K. & Stahnke, L.H., 2002. Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus* and *S. equorum* - a comparative study in model systems. *International Journal of Food Microbiology* 75:99-109.
- Terra, N.N., 1998. Apontamentos de tecnologia de carnes. Unisinos, São Leopoldo.
- Toldrá, F., 2010. Handbook of Meat Processing Blackwell, Iowa.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., & Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5:25-40.

CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados obtidos demonstraram a pertinência de utilização das placas Petrifilm™ AC, associadas ao caldo MRS adicionado de vermelho de clorofenol, para enumeração de culturas starter utilizadas para a produção de embutidos cárneos;
- ✓ O protocolo proposto com Petrifilm™ AC apresentou resultados equivalentes quando as placas foram incubadas em aerobiose ou em anaerobiose, e considerando as contagens obtidas em 24, 48 e 72 h de incubação;
- ✓ As contagens das culturas starter obtidas ainda foram equivalentes às contagens obtidas pelos protocolos convencionais de enumeração de culturas starter e BAL;
- ✓ O desempenho dos protocolos com placas Petrifilm™ AC observado em culturas starter e láticas foi similar no monitoramento das culturas starter adicionadas em amostras de salames, indicando a pertinência de sua utilização nas mesmas condições para o seu controle de qualidade;
- ✓ Os protocolos avaliados apresentaram seletividade adequada, permitindo o crescimento de colônias de culturas starter usualmente adicionadas em salames.

RESULTADOS DETALHADOS

Tabela 1. Primeira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 24 horas de incubação (resultados em UFC/mL).

Cultura	Repetição	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
<i>Lactobacillus casei</i>	1	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	1000000
<i>Lactobacillus casei</i>	1	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>Lactobacillus casei</i>	1	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	1000000
<i>Lactobacillus casei</i>	1	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	48000000	111000000	131500000	137500000	93500000	< 1000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	< 1000	250000000	< 1000	510000000	< 1000	< 1000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	< 1000	1000000	2000000	5750000	< 1000	< 1000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	720000000	730000000	263000000	173500000	206000000	< 1000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	1020000000	1120000000	405000000	420000000	485000000	770000000
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	21000000	19300000	10900000	10850000	10050000	11500000
<i>Lactococcus lactis</i>	1	1100000000	2590000000	89000000	92500000	< 1000	220000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1	46000000	57000000	83000000	110000000	< 1000	259500000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1	233000000	224000000	102500000	105500000	< 1000	229000000
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	830000000	860000000	375000000	525000000	< 1000	680000000
<i>L. sakei</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	1	33000000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	18000000
<i>L. sakei</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. vitulinus</i>	1	16000000	31000000	7000000	11500000	6000000	15000000

Tabela 2. Segunda repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 24 horas de incubação (resultados em UFC/mL).

Cultura	Repetição	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
<i>Lactobacillus casei</i>	2	< 1000	< 1000	< 1000	22750000	< 1000	3100000
<i>Lactobacillus casei</i>	2	< 1000	< 1000	< 1000	9200000	< 1000	1500000
<i>Lactobacillus casei</i>	2	< 1000	100000	100000	13800000	< 1000	3350000
<i>Lactobacillus casei</i>	2	< 1000	< 1000	< 1000	10650000	< 1000	1800000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	135000000	114000000	133500000	124000000	< 1000	< 1000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	< 1000	138000000	17500000	177000000	< 1000	< 1000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	< 1000	2100000	2950000	3450000	350000	2500000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	206000000	172000000	181000000	123000000	101000000	< 1000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	1550000000	1550000000	1890000000	1075000000	965000000	< 1000
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2	47000000	33000000	31000000	31000000	30000000	35300000
<i>Lactococcus lactis</i>	2	149000000	124000000	123500000	102000000	< 1000	98000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2	2760000000	2560000000	2995000000	2220000000	< 1000	1240000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2	< 1000	164000000	246000000	165000000	< 1000	131500000
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	< 1000	3000000	< 1000	8400000	< 1000	1000000
<i>L. sakei</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	2	3000000	2800000	3000000	3600000	< 1000	< 1000
<i>L. sakei</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. vitulinus</i>	2	31500000	233000000	14800000	11050000	8950000	19150000

Tabela 3. Terceira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 24 horas de incubação (resultados em UFC/mL).

Cultura	Repetição	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
<i>Lactobacillus casei</i>	3	6000000	6000000	< 1000	< 1000	1000000	> 300000000
<i>Lactobacillus casei</i>	3	< 1000	< 1000	1000000	< 1000	< 1000	> 300000000
<i>Lactobacillus casei</i>	3	< 1000	1000000	< 1000	< 1000	< 1000	> 300000000
<i>Lactobacillus casei</i>	3	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	> 300000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	92000000	111000000	72000000	83000000	78000000	> 300000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	< 1000	95000000	< 1000	55000000	< 1000	> 300000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	> 300000000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	55000000	56000000	60000000	47000000	58000000	266000000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	30000000	30000000	20000000	37000000	16000000	<1000
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	3	8000000	3000000	4000000	5000000	5000000	> 300000000
<i>Lactococcus lactis</i>	3	47000000	30000000	24000000	28000000	15000000	154000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3	< 1000	< 1000	83000000	< 1000	< 1000	> 300000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3	68000000	112000000	50000000	46000000	< 1000	> 300000000
<i>Staphylococcus xylosus</i>	3	5000000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	> 300000000
<i>L. sakei</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	3	3000000	1000000	2000000	< 1000	< 1000	> 300000000
<i>L. sakei</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. vitulinus</i>	3	19000000	24000000	37000000	25000000	52000000	> 300000000

Tabela 4. Primeira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 48 horas de incubação (resultados em UFC/mL).

Cultura	Repetição	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
<i>Lactobacillus casei</i>	1	60000000	172000000	132000000	192000000	< 1000	2000000
<i>Lactobacillus casei</i>	1	1000000	156000000	99000000	182500000	500000	5000000
<i>Lactobacillus casei</i>	1	46000000	122000000	91500000	121500000	< 1000	1000000
<i>Lactobacillus casei</i>	1	8000000	108000000	79500000	143000000	< 1000	5000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	118000000	116000000	159000000	147500000	145500000	187000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	30000000	285000000	420000000	675000000	401500000	605000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	6200000	6300000	3600000	7600000	3750000	< 1000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	730000000	730000000	273000000	247500000	240000000	560000000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	1100000000	1120000000	420000000	595000000	515000000	1050000000
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	23500000	19300000	11600000	12300000	10250000	13650000
<i>Lactococcus lactis</i>	1	1600000000	2590000000	93500000	108500000	119500000	228500000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1	46000000	57000000	87500000	110000000	82000000	266500000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1	242000000	224000000	105000000	109000000	143500000	235000000
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	8300000	870000000	415000000	825000000	455000000	680000000
<i>L. sakei</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	1	33000000	25000000	13500000	35000000	500000	20500000
<i>L. sakei</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. vitulinus</i>	1	16000000	31000000	7000000	116500000	8500000	16000000

Tabela 5. Segunda repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 48 horas de incubação (resultados em UFC/mL).

Cultura	Repetição	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
<i>Lactobacillus casei</i>	2	23800000	33600000	20050000	28700000	18650000	4700000
<i>Lactobacillus casei</i>	2	14100000	15100000	10750000	10600000	5350000	2450000
<i>Lactobacillus casei</i>	2	18400000	23900000	20250000	18900000	< 1000	4050000
<i>Lactobacillus casei</i>	2	11900000	14600000	12550000	11600000	< 1000	3200000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	141000000	115000000	149500000	128500000	109000000	113000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	56000000	211000000	200500000	183500000	150000000	92000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	4400000	5200000	4650000	4200000	4100000	3700000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	207000000	172000000	181000000	129000000	111500000	136000000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	1620000000	1620000000	1930000000	1115000000	1005000000	830000000
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2	49000000	35000000	32000000	31000000	30000000	> 300000000
<i>Lactococcus lactis</i>	2	149000000	129000000	129000000	102500000	86000000	104500000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2	2800000000	2640000000	3070000000	2255000000	1965000000	1515000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2	2900000000	1960000000	2525000000	1720000000	1480000000	1355000000
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	< 1000	3000000	< 1000	9700000	< 1000	4400000
<i>L. sakei</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	2	3600000	3600000	3200000	3900000	< 1000	< 1000
<i>L. sakei</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. vitulinus</i>	2	31500000	233000000	15300000	11050000	9150000	19750000

Tabela 6. Terceira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 48 horas de incubação (resultados em UFC/mL).

Cultura	Repetição	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
<i>Lactobacillus casei</i>	3	23800000	33600000	20050000	28700000	18650000	4700000
<i>Lactobacillus casei</i>	3	14100000	15100000	10750000	10600000	5350000	2450000
<i>Lactobacillus casei</i>	3	18400000	23900000	20250000	18900000	< 1000	4050000
<i>Lactobacillus casei</i>	3	11900000	14600000	12550000	11600000	< 1000	3200000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	141000000	115000000	149500000	128500000	109000000	113000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	56000000	211000000	200500000	183500000	150000000	92000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	4400000	5200000	4650000	4200000	4100000	3700000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	207000000	172000000	181000000	129000000	111500000	136000000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	1620000000	1620000000	1930000000	1115000000	1005000000	830000000
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	3	49000000	35000000	32000000	31000000	30000000	> 300000000
<i>Lactococcus lactis</i>	3	149000000	129000000	129000000	102500000	86000000	104500000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3	2800000000	2640000000	3070000000	2255000000	1965000000	1515000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3	2900000000	1960000000	2525000000	1720000000	1480000000	1355000000
<i>Staphylococcus xylosus</i>	3	< 1000	3000000	< 1000	9700000	< 1000	4400000
<i>L. sakei</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	3	3600000	3600000	3200000	3900000	< 1000	< 1000
<i>L. sakei</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. vitulinus</i>	3	31500000	233000000	15300000	11050000	9150000	19750000

Tabela 7. Primeira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 72 horas de incubação (resultados em UFC/mL).

Cultura	Repetição	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
<i>Lactobacillus casei</i>	1	186000000	176000000	144000000	201000000	73500000	2000000
<i>Lactobacillus casei</i>	1	146000000	157000000	109500000	186000000	41500000	< 1000
<i>Lactobacillus casei</i>	1	133000000	128000000	104500000	121500000	67500000	1000000
<i>Lactobacillus casei</i>	1	114000000	110000000	111000000	143000000	39500000	500000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	124000000	117000000	164000000	147500000	156000000	200000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	128000000	305000000	425000000	675000000	422500000	830000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	6600000	6400000	100000	7850000	3950000	2700000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	740000000	740000000	284000000	250500000	250000000	570000000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	1150000000	1130000000	435000000	595000000	545000000	1110000000
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	23900000	19300000	11900000	7850000	10400000	13650000
<i>Lactococcus lactis</i>	1	3240000000	2630000000	96500000	110500000	122500000	233500000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1	47000000	57000000	87500000	147000000	82000000	268000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1	257000000	243000000	105000000	118500000	157500000	236000000
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	830000000	890000000	420000000	960000000	530000000	705000000
<i>L. sakei</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	1	33000000	25000000	17500000	610000000	1000000	21500000
<i>L. sakei</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. vitulinus</i>	1	17000000	32000000	13500000	174500000	8500000	16500000

Tabela 8. Segunda repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 72 horas de incubação (resultados em UFC/mL).

Cultura	Repetição	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
<i>Lactobacillus casei</i>	2	28400000	34500000	20600000	29250000	23300000	4950000
<i>Lactobacillus casei</i>	2	17400000	16800000	11800000	10650000	8000000	3050000
<i>Lactobacillus casei</i>	2	20500000	24500000	20650000	19200000	18400000	4300000
<i>Lactobacillus casei</i>	2	16600000	14600000	13050000	11850000	8100000	3400000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	143000000	115000000	152500000	131000000	112000000	115500000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	113000000	213000000	208000000	186500000	153500000	116000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	4400000	5500000	4700000	4200000	4300000	6900000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	207000000	176000000	183000000	131000000	111500000	136000000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	1670000000	1620000000	1980000000	1140000000	1020000000	845000000
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2	49000000	35000000	32000000	31000000	30000000	> 300000000
<i>Lactococcus lactis</i>	2	151000000	132000000	129000000	104000000	88000000	107000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2	2830000000	2640000000	3070000000	2255000000	2015000000	1595000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2	294000000	201000000	255500000	176000000	154000000	135500000
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	< 1000	3000000	< 1000	22000000	< 1000	4400000
<i>L. sakei</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	2	7000000	13000000	65000000	< 1000	1500000	19000000
<i>L. sakei</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. vitulinus</i>	2	32300000	23800000	15650000	11050000	9150000	19750000

Tabela 9. Terceira repetição da enumeração de culturas puras e “mix” de culturas starter nos seis protocolos após 72 horas de incubação (resultados em UFC/mL).

Cultura	Repetição	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
<i>Lactobacillus casei</i>	3	111000000	134000000	51000000	54000000	30000000	> 300000000
<i>Lactobacillus casei</i>	3	96000000	103000000	39000000	56000000	22000000	> 300000000
<i>Lactobacillus casei</i>	3	62000000	53000000	19000000	22000000	23000000	> 300000000
<i>Lactobacillus casei</i>	3	76000000	79000000	34000000	32000000	32000000	> 300000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	94000000	112000000	75000000	90000000	86000000	> 300000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	82000000	156000000	69000000	58000000	52000000	> 300000000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	5000000	7000000	4000000	4000000	1000000	> 300000000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	58000000	60000000	67000000	60000000	66000000	322000000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	36000000	33000000	22000000	43000000	21000000	18000000
<i>Pediococcus</i>	3	9000000	7000000	6000000	9000000	6000000	> 300000000
<i>Lactococcus lactis</i>	3	50000000	32000000	29000000	31000000	30000000	> 300000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3	< 1000	< 1000	85000000	< 1000	< 1000	> 300000000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3	107000000	119000000	59000000	50000000	58000000	> 300000000
<i>Staphylococcus xylosus</i>	3	5000000	1000000	4000000	< 1000	3000000	> 300000000
<i>L. sakei</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	3	4000000	2000000	3000000	< 1000	< 1000	> 300000000
<i>L. sakei</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. vitulinus</i>	3	24000000	28000000	38000000	25000000	55000000	> 300000000

Tabela 10: Enumeração de culturas starter isoladas de salames comerciais nos seis protocolos após 24 horas de incubação (resultados em UFC/g).

Amostras de salame	Indústria	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 5
Sal 1	A	3500000	5600000	7600000	< 10
Sal 2	B	< 10	200000	< 10	< 10
Sal 3	B	< 10	200000	50000	< 10
Sal 4	C	< 10	130000000	1305000000	115500000
Sal 5	C	13700000	21100000	< 10	10200000
Sal 6	C	91000000	117000000	101500000	97000000
Sal 7	C	123000000	129000000	119500000	109000000
Sal 8	C	46100000	25300000	< 10	15300000
Sal 9	C	< 10	270000000	266500000	238000000
Sal 10	B	< 10	100000	< 10	< 10
Sal 11	C	< 10	46000000	54000000	8500000
Sal 12	D	100000	< 10	< 10	200000
Sal 13	D	< 1000	4100000	< 10	2600000
Sal 14	E	2700000	2500000	3700000	650000
Sal 15	E	500000	3400000	350000	1550000
Sal 16	A	3400	600	< 10	< 10
Sal 17	D	300000	< 10	< 10	< 10
Sal 18	D	513000000	< 10	< 10	< 10
Sal 19	C	7000000	10600000	16750000	5600000
Sal 20	C	7700000	300000	11700000	3800000
Sal 21	B	330000	170000	940000	205000
Sal 22	F	3600000	1820000	8600000	200000
Sal 23	B	< 10	11400000	< 10	8300000
Sal 24	A	140000000	160000000	178000000	< 10
Sal 25	A	19300000	35000000	39500000	< 10
Sal 26	A	340000	80000	415000	< 10
Sal 27	B	10000000	11900000	6800000	< 10
Sal 28	B	89000	2300	43500	< 10
Sal 29	D	660000	1380000	4000000	200000
Sal 30	B	70000	20000	< 10	< 10

Tabela 11: Enumeração de culturas starter isoladas de salames comerciais nos seis protocolos após 48 horas de incubação (resultados em UFC/g).

Amostras de salame	Indústria	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 5
Sal 1	A	5800000	11400000	9000000	8700000
Sal 2	B	300000	500000	150000	500000
Sal 3	B	100000	800000	1050000	1550000
Sal 4	C	159000000	149000000	1330000000	1300000000
Sal 5	C	154000000	251000000	< 10	336000000
Sal 6	C	940000000	1280000000	1130000000	1125000000
Sal 7	C	1460000000	1460000000	1275000000	1260000000
Sal 8	C	462000000	3810000000	< 10	245500000
Sal 9	C	2950000000	3400000000	2730000000	2575000000
Sal 10	B	< 10	100000	200000	400000
Sal 11	C	258000000	770000000	840000000	1155000000
Sal 12	D	900000	800000	800000	950000
Sal 13	D	1000000	7300000	7300000	15550000
Sal 14	E	4400000	6900000	4900000	4800000
Sal 15	E	5700000	8200000	3500000	10150000
Sal 16	A	3700	1900	400	50
Sal 17	D	300000	200000	150000	150000
Sal 18	D	550000000	1700000	450000	< 10
Sal 19	C	108000000	178000000	22050000	22750000
Sal 20	C	111000000	4700000	20700000	18900000
Sal 21	B	530000	850000	2060000	1530000
Sal 22	F	5800000	2390000	12000000	10950000
Sal 23	B	112000000	140000000	139000000	24250000
Sal 24	A	1400000000	1640000000	1790000000	1820000000
Sal 25	A	193000000	550000000	440000000	430000000
Sal 26	A	600000	1170000	810000	70000
Sal 27	B	8900000	12700000	11700000	15000000
Sal 28	B	95000	11400	62000	23050
Sal 29	D	1240000	1600000	11200000	5700000
Sal 30	B	350000	300000	190000	20000

Tabela 12. Enumeração de culturas starter isoladas de salames comerciais nos seis protocolos após 72 horas de incubação (resultados em UFC/g).

Amostras de salame	Indústria	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 5
Sal 1	A	8100000	11700000	9550000	13700000
Sal 2	B	400000	2400000	350000	1400000
Sal 3	B	100000	1300000	550000	2000000
Sal 4	C	159000000	152000000	1435000000	136000000
Sal 5	C	166000000	251000000	322000000	349000000
Sal 6	C	94000000	130000000	113000000	115500000
Sal 7	C	146000000	155000000	128500000	129000000
Sal 8	C	46400000	39400000	26500000	27700000
Sal 9	C	305000000	350000000	275000000	264000000
Sal 10	B	< 10	8100000	300000	8550000
Sal 11	C	258000000	96000000	88500000	121500000
Sal 12	D	1100000	4900000	1550000	6100000
Sal 13	D	1600000	7800000	7850000	17650000
Sal 14	E	4600000	7000000	4950000	5300000
Sal 15	E	6000000	9600000	4200000	11150000
Sal 16	A	4000	2400	500	200
Sal 17	D	300000	700000	150000	1800000
Sal 18	D	585000000	1800000	2550000	< 10
Sal 19	C	108000000	17800000	22150000	24450000
Sal 20	C	12400000	5900000	22900000	23650000
Sal 21	B	540000	990000	2100000	1565000
Sal 22	F	7400000	9600000	11800000	12450000
Sal 23	B	12100000	14000000	14150000	25000000
Sal 24	A	154000000	167000000	180000000	185000000
Sal 25	A	63000000	56000000	44000000	25500000
Sal 26	A	740000	1170000	835000	320000
Sal 27	B	9600000	12700000	11900000	16050000
Sal 28	B	95000	11500	8650	28850
Sal 29	D	1350000	1600000	11900000	9200000
Sal 30	B	380000	1110000	2500	150

Tabela 13. Médias e desvios padrão das contagens do “mix” de culturas starter contendo *L. sakei*, *S. carnosus* e *S. xylosus* enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL)

Protocolo	Meio de cultura	Incubação	Tempo de incubação		
			24h	48h	72h
1	Petrifilm AC added to CR	Aerobiose, 35 °C	6.82 ± 0.60	6.89 ± 0.54	6.91 ± 0.52
2	Petrifilm AC added to CR	Anaerobiose, 30 °C	6.22 ± 0.32	6.65 ± 0.70	6.75 ± 0.57
3	MRS added to CR	Aerobiose, 35 °C	6.39 ± 0.12	6.70 ± 0.37	6.74 ± 0.43
4	MRS added to PB	Anaerobiose, 35 °C	6.56 ± 0.00	7.07 ± 0.67	7.45 ± 1.19
5	MRS pH 5.7	Aerobiose, 30 °C		5.70 ± 0.00	6.15 ± 0.21
6	APT	Aerobiose, 25 °C	7.26 ± 0.00	7.31 ± 0.00	7.33 ± 0.00

ANOVA: $F_{(17,664)} = 0.73$, $p = 0.771$

Tabela 14. Médias e desvios padrão das contagens do “mix” de culturas starter contendo *L. sakei*, *S. xylosus* e *S. vitulinus* enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).

Protocolo	Meio de cultura	Incubação	Tempo de incubação		
			24h	48h	72h
1	Petrifilm AC added to CR	Aerobiose, 35 °C	7.33 ± 0.15	7.35 ± 0.15	7.37 ± 0.14
2	Petrifilm AC added to CR	Anaerobiose, 30 °C	7.75 ± 0.54	7.75 ± 0.53	7.44 ± 0.06
3	MRS added to CR	Aerobiose, 35 °C	7.19 ± 0.36	7.20 ± 0.37	7.30 ± 0.24
4	MRS added to PB	Anaerobiose, 35 °C	7.17 ± 0.20	7.50 ± 0.52	7.56 ± 0.62
5	MRS pH 5.7	Aerobiose, 30 °C	7.15 ± 0.50	7.20 ± 0.45	7.21 ± 0.46
6	APT	Aerobiose, 25 °C	7.23 ± 0.08	7.25 ± 0.06	7.26 ± 0.06

ANOVA: $F_{(17,33)} = 0.73$, $p = 0.753$

Tabela 15. Médias e desvios padrão das contagens de *L. casei* enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).

Protocolo	Meio de cultura	Incubação	Tempo de incubação		
			24h	48h	72h
1	Petrifilm AC added to CR	Aerobiose, 35 °C	6.78 ± 0.00 abc	7.34 ± 0.52 a	7.80 ± 0.39 a
2	Petrifilm AC added to CR	Anaerobiose, 30°C	5.93 ± 0.89 c	7.80 ± 0.39 a	7.81 ± 0.39 a
3	MRS added to CR	Aerobiose, 35 °C	5.50 ± 0.71 c	7.53 ± 0.38 a	7.60 ± 0.39 a
4	MRS added to PB	Anaerobiose, 35°C	7.12 ± 0.17 ab	7.66 ± 0.45 a	7.67 ± 0.45 a
5	MRS pH 5.7	Aerobiose, 30 °C	6.00 ± 0.00 bc	6.42 ± 0.71 bc	7.42 ± 0.30 a
6	APT	Aerobiose, 25 °C	6.24 ± 0.23 bc	6.48 ± 0.25 bc	6.56 ± 0.34 bc

ANOVA: $F_{(17,127)} = 16.23$, $p < 0.005$

Tabela 16. Médias e desvios padrão das contagens de *L. paracasei* enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).

Protocolo	Meio de cultura	Incubação	Tempo de incubação		
			24h	48h	72h
1	Petrifilm AC added to CR	Aerobiose, 35 °C	7.93 ± 0.23	7.47 ± 0.60	7.61 ± 0.67
2	Petrifilm AC added to CR	Anaerobiose, 30 °C	7.62 ± 0.92	7.72 ± 0.72	7.73 ± 0.71
3	MRS added to CR	Aerobiose, 35 °C	7.35 ± 0.82	7.65 ± 0.81	7.65 ± 0.82
4	MRS added to PB	Anaerobiose, 35 °C	7.77 ± 0.75	7.68 ± 0.80	7.66 ± 0.85
5	MRS pH 5.7	Aerobiose, 30 °C	7.14 ± 1.38	7.53 ± 0.90	7.55 ± 0.90
6	APT	Aerobiose, 25 °C	6.40 ± 0.00	7.93 ± 0.82	7.72 ± 0.87

ANOVA: $F_{(17,112)} = 0.38$, $p = 0.987$

Tabela 17. Médias e desvios padrão das contagens de *L. plantarum* enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).

Protocolo	Meio de cultura	Incubação	Tempo de incubação		
			24h	48h	72h
1	Petrifilm AC added to CR	Aerobiose, 35 °C	8.43 ± 0.71	8.46 ± 0.70	8.46 ± 0.70
2	Petrifilm AC added to CR	Anaerobiose, 30 °C	8.43 ± 0.72	8.44 ± 0.70	8.45 ± 0.70
3	MRS added to CR	Aerobiose, 35 °C	8.27 ± 0.68	8.30 ± 0.67	8.30 ± 0.67
4	MRS added to PB	Anaerobiose, 35 °C	8.20 ± 0.56	8.29 ± 0.56	8.29 ± 0.56
5	MRS pH 5.7	Aerobiose, 30 °C	8.16 ± 0.64	8.21 ± 0.61	8.22 ± 0.62
6	APT	Aerobiose, 25 °C	8.66 ± 0.33	8.43 ± 0.66	8.44 ± 0.66

ANOVA: $F_{(17,86)} = 0.17$, $p = 0.999$

Tabela 18. Médias e desvios padrão das contagens de *L. lactis* e *L. lactis* subsp. *lactis* enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).

Protocolo	Meio de cultura	Incubação	Tempo de incubação		
			24h	48h	72h
1	Petrifilm AC added to CR	Aerobiose, 35 °C	8.31 ± 0.69	8.38 ± 0.65	8.43 ± 0.71
2	Petrifilm AC added to CR	Anaerobiose, 30 °C	8.35 ± 0.71	8.36 ± 0.71	8.37 ± 0.71
3	MRS added to CR	Aerobiose, 35 °C	8.09 ± 0.59	8.11 ± 0.58	8.12 ± 0.57
4	MRS added to PB	Anaerobiose, 35 °C	8.09 ± 0.56	8.11 ± 0.55	8.14 ± 0.55
5	MRS pH 5.7	Aerobiose, 30 °C	7.18 ± 0.00	8.10 ± 0.54	8.11 ± 0.54
6	APT	Aerobiose, 25 °C	8.36 ± 0.36	8.41 ± 0.41	8.42 ± 0.41

ANOVA: $F_{(17,116)} = 0.60$, $p = 0.887$

Tabela 19. Médias e desvios padrão das contagens de *Pediococcus pentosaceus* enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).

Protocolo	Meio de cultura	Incubação	Tempo de incubação		
			24h	48h	72h
1	Petrifilm AC added to CR	Aerobiose, 35 °C	7.30 ± 0.39	7.34 ± 0.37	7.34 ± 0.37
2	Petrifilm AC added to CR	Anaerobiose, 30 °C	7.09 ± 0.55	7.14 ± 0.49	7.22 ± 0.35
3	MRS added to CR	Aerobiose, 35 °C	8.57 ± 0.00	8.62 ± 0.00	7.61 ± 1.43
4	MRS added to PB	Anaerobiose, 35 °C	7.82 ± 1.30	7.95 ± 1.36	7.98 ± 1.41
5	MRS pH 5.7	Aerobiose, 30 °C		8.66 ± 0.00	7.60 ± 1.59
6	APT	Aerobiose, 25 °C	7.42 ± 2.00	7.74 ± 1.55	7.75 ± 1.56

ANOVA: $F_{(17,31)} = 0.18$, $p = 0.999$

Tabela 20. Médias e desvios padrão das contagens de *S. xylosus* enumeradas considerando seis protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).

Protocolo	Meio de cultura	Incubação	Tempo de incubação		
			24h	48h	72h
1	Petrifilm AC added to CR	Aerobiose, 35 °C	7.81 ± 1.57	6.81 ± 0.16	7.84 ± 1.61
2	Petrifilm AC added to CR	Anaerobiose, 30 °C	7.71 ± 1.74	7.14 ± 1.58	7.14 ± 1.58
3	MRS added to CR	Aerobiose, 35 °C	8.57 ± 0.00	8.62 ± 0.00	7.61 ± 1.43
4	MRS added to PB	Anaerobiose, 35 °C	7.82 ± 1.30	7.95 ± 1.36	7.98 ± 1.41
5	MRS pH 5.7	Aerobiose, 30 °C		8.66 ± 0.00	7.60 ± 1.59
6	APT	Aerobiose, 25 °C	7.42 ± 2.00	7.74 ± 1.55	7.75 ± 1.56

ANOVA: $F_{(16,16)} = 0.18$, $p = 0.999$

Tabela 21: Médias e desvios padrão das contagens de culturas starter presentes nas amostras de salame, considerando quatro protocolos após 24, 48 e 72 horas (resultados em log UFC/mL).

Protocolo	Meio de cultura	Incubação	Tempo de incubação		
			24h	48h	72h
1	Petrifilm AC added to CR	Aerobiose, 35 °C	6.44 ± 1.30	6.68 ± 1.21	6.73 ± 1.20
2	Petrifilm AC added to CR	Anaerobiose, 30 °C	6.38 ± 1.49	6.67 ± 1.30	6.81 ± 1.14
3	MRS added to CR	Aerobiose, 35 °C	6.94 ± 1.24	6.63 ± 1.37	6.77 ± 1.28
5	MRS pH 5.7	Aerobiose, 30 °C	6.67 ± 1.05	6.63 ± 1.50	6.88 ± 1.29

ANOVA: $F_{(11,307)} = 0.38$, $p = 0.9$