

OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS RESPONSÁVEIS PELA DETERIORAÇÃO DE UM PRODUTO CARNEO DE BAIXA ACIDEZ

José Cezar PANETTA *
Omar Jaques Marzagão BARBUTO **
Raphael Valentino RICCETTI *
Arlindo GARCIA MORENO *

RFMV-A/16

PANETTA, J. C. ; BARBUTO, O. J. M. ; RICCETTI, R. V. ; GARCIA MORENO, A.
*Ocorrência de microrganismos responsáveis pela deterioração de um
produto cárneo de baixa acidez. Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S.
Paulo, 13(1):241-47, 1976.*

RESUMO: Procurou-se identificar a causa mais comum da deterioração da presuntada enlatada, isto é, um sub-processamento ou um vazamento pós-processamento. Para tanto, foram escolhidos quatro grupos de germes: dois tipicamente esporulados (*Bacillus* e *Clostridium*), que refletem muito bem a deterioração por sub-processamento, e dois não esporulados (*coliformes* e *enterococos*), habitantes normais do intestino do homem e dos animais e, conseqüentemente, valiosos índices de contaminação por vazamentos da lata sanitária.

Analisados 210 continentes, as porcentagens de ocorrência de positivos foram as seguintes: *Bacillus* — 6,66% à *Clostridium* — 3,80%; *coliformes* — 9,52%; *enterococos* — 15,71%.

Os resultados obtidos permitem responsabilizar os vazamentos eventualmente existentes nas latas sanitárias, como principais responsáveis pelas alterações putrefativas de natureza microbiana sofridas pelo alimento analisado.

UNITERMOS: Alimentos enlatados*; Enlatados cárneos*; Enlatados, deterioração*; Deterioração.

INTRODUÇÃO, LITERATURA E PROPOSIÇÃO

Há décadas, tem sido o calor o agente mais largamente utilizado na preservação dos alimentos. Os enlatados tornaram-se tão comuns na dieta humana, que a saúde da população mundial depende agora, em larga escala, da qualidade desses alimentos, já que segundo HERSOM & HUL-

LAND⁹, englobando a opinião de numerosos autores, a deterioração microbiana dos alimentos enlatados processados pelo calor é causada por microrganismos que sobrevivem aos processos térmicos, ou que penetram através de vazamentos do recipiente, após o processamento pelo calor.

* Professor Assistente Doutor.

** Professor Livre Docente.

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

É praticamente impossível prever quais os tipos de microrganismos que poderão penetrar nas latas, através de um vazamento, devendo a indústria tomar medidas adequadas para evitar este tipo de deterioração microbiana e a resistência dos microrganismos ao calor estão intimamente relacionados com a acidez dos alimentos enlatados. CAMERON & ESTY⁵ sugerem a seguinte classificação:

1. alimentos de acidez baixa
— pH 5 ou mais;
2. alimentos de acidez média
— pH 5.0 a 4.5;
3. alimentos ácidos
— pH 4.5 a 3.7;
4. alimentos de acidez alta
— pH 3.7 ou menos.

A linha divisória entre os alimentos de acidez baixa e os alimentos ácidos é admitida por ALLEN¹ como sendo o valor de pH igual a 4,5, porque algumas linhagens de *Clostridium botulinum* podem crescer e produzir toxina em pH com valores tão baixos como 4,6. Alguns anaeróbios sacarolíticos altamente resistentes ao calor — por exemplo o *Clostridium thermosaccharolyticum* — crescem e causam deterioração neste intervalo semi-ácido.

Para os alimentos ácidos e de baixa acidez, as bactérias que esporulam são de maior importância do ponto de vista da esterilização. FRAZIER⁷ classifica essas bactérias, segundo a demanda de oxigênio, em:

- a) aeróbios estritos (*Bacillus* sp.);
- b) anaeróbios facultativos (*Bacillus* sp.);
- c) anaeróbios estritos (*Clostridium* sp.).

Dos três grupos, segundo esse mesmo autor, o primeiro é o menos importante, já que engloba as espécies que requerem oxigênio molecular para o seu desenvolvimento. Com as atuais condições de enlatamento, a maioria dos alimentos contém níveis muito baixos de oxigênio molecular,

insuficientes para garantir um crescimento considerável. Além disso, os esporos da maioria dos aeróbios estritos tem baixa resistência ao calor, quando comparada com os esporos de numerosos microrganismos pertencentes aos outros dois grupos.

VAUGHN e col.¹⁷, ao considerarem o grupo dos anaeróbios facultativos, citam como importantes, para os alimentos ácidos e de baixa acidez, os bacilos termófilos formadores de esporos, alguns dos quais produzem esporos mais resistentes ao calor do que os esporos formados pela maioria dos anaeróbios estritos. Para os alimentos enlatados de baixa acidez, na opinião dos autores citados, o *Bacillus steurothermophilus* e espécies correlatas merecem atenção especial: são microrganismos responsáveis pela alteração dos enlatados conhecida por "flat-sour" e muitas vezes não são identificados quanto à espécie pelo bacteriologista alimentar, mas tão somente enquadrados como pertencentes ao grupo *B. steurothermophilus*.

Os trabalhos de AMAHA²², relativos aos fatores que interferem sobre a resistência térmica dos esporos bacterianos, endossam plenamente a idéia de que alguns anaeróbios estritos são capazes de produzir esporos altamente resistentes ao calor. Relativamente à deterioração dos alimentos enlatados, REED e col.¹² classificam os microrganismos responsáveis em dois grupos bem definidos: mesofílico e termofílico.

Dos termófilos, os mais importantes são os microrganismos sacarolíticos não produtores de gás sulfídrico; o *Clostridium thermosaccharolyticum* é geralmente considerado como a espécie tipo deste grupo, no qual estão incluídos os germes capazes de fermentar grande variedade de hidratos de carbono, com grande quantidade de gás, sobretudo o dióxido de carbono e o hidrogênio. Esta condição leva as latas sanitárias que contém produtos deteriorados por essa via a apresentarem-se "inchadas" (ou "estufadas") e com odor butírico ("a queijo").

Os anaeróbios termofílicos produtores de esporos e de gás sulfídrico são os respon-

sáveis pela "deterioração sulfurosa" dos alimentos cárneos enlatados. TOWNSEND e col.¹⁶, ao considerarem o *Clostridium nigrificans* como a espécie-tipo do grupo, incluem nele os germes proteolíticos, produtores de H₂S em grandes quantidades. Como o gás sulfídrico é solúvel nos produtos cárneos enlatados, as latas com alimentos deteriorados geralmente apresentam-se chatas (não estufadas"), enquanto o produto mostra-se enegrecido, devido à reação do gás com o ferro. Na opinião de STUMBO¹⁵, a deterioração dos enlatados por intermédio destas bactérias é relativamente rara, por dois motivos: primeiro, a incidência de seus esporos na maioria das linhagens são pouco resistentes ao calor, quando comparados com os esporos dos anaeróbios termofílicos sacaro-líticos e com os anaeróbios termofílicos produtores de "flat-sour".

Deve-se considerar, a seguir, os microrganismos anaeróbios mesofílicos formadores de esporos. Pelo que significa para a saúde pública, o *Clostridium botulinum* deve ser considerado o prototipo do grupo, sendo numerosíssimos os trabalhos com este microrganismo^{6, 11, 18}. Os subtipos A, B e E do *Clostridium botulinum* são tidos como os mais importantes, sendo que os esporos dos tipos A e B são considerados como mais termo-resistentes do que os esporos do tipo E, porisso, objetos de maior preocupação na esterilização dos alimentos enlatados. Outros microrganismos proteolíticos ou putrefativos frequentes como causadores de deterioração dos alimentos semi-ácidos^{8, 13} são o *Cl. putrificum*, o *Cl. histolyticum*, o *Cl. bifementans*, o *Cl. sporogenes* e espécies correlacionadas. Entretanto, os processos destinados a assegurar um alto índice de segurança com relação ao *Cl. botulinum*, são plenamente eficientes para prevenir a deterioração por esses microrganismos.

Paralelamente às informações relativas às características térmicas dos diferentes grupos e estirpes de microrganismos incriminados como agentes de deterioração dos alimentos cárneos enlatados, deve-se atentar também para outros fatores que modi-

ficam a resistência das bactérias as altas temperaturas, desde os fatores intrínsecos aos microrganismos, como a hereditariedade, quanto aos extrínsecos, como a concentração salina e a presença de substâncias protetoras. YOKOYA¹⁹ reviu detalhadamente esses fatores, concluindo que sua influência sobre os esporos e as células vegetativas das bactérias são tanto ou até mais importantes do que as características térmicas inerentes aos próprios microrganismos. Em outro trabalho, esse mesmo autor²⁰ discute as fórmulas básicas empregadas no cálculo da esterilização dos alimentos enlatados, pelo processo matemático, as quais são usadas para organizar gráficos, tabelas e equações de uso prático no cálculo de processamento, mormente no que se refere às temperaturas letais, ou seja, as temperaturas que provocam a morte das bactérias.

O objetivo do presente estudo foi o de determinar os microrganismos responsáveis pela deterioração de um produto cárneo enlatado de baixa acidez, ou seja, a presuntada. Procurou-se identificar a carga mais comum de deterioração, isto é, um su-processamento ou um vazamento pós-processamento. Para tanto, foram escolhidos quatro grupos de germes: dois tipicamente esporulados (*Bacillus* e *Clostridium*), que refletem muito bem a deterioração por sub-processamento, e dois não esporulados (coliformes e enterococos), habitantes normais do intestino do homem e dos animais e, conseqüentemente, valiosos índices de contaminação por vazamentos da lata sanitária.

M E T O D O L O G I A

O material utilizado no presente trabalho foi representado por 210 latas de presuntada, colhidas em três frigoríficos localizados no Município de São Paulo, e que haviam sido condenadas pelo serviço de fiscalização sanitária. Pelo período de cento e oitenta dias, procedeu-se à colheita das amostras, analisando-se cerca de dez amostras por semana. Essa amostragem correspondeu a 7,57% do total de

2771 latas condenadas por "bombeamento" ("estufadas" ou "inchadas"), nesse mesmo período.

Chegadas ao laboratório, as latas sanitárias foram analisadas bacteriologicamente seguindo-se as técnicas contidas nos "Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods"⁴, obedecendo-se rigorosamente os cuidados preconizados para a identificação, análise das condições e abertura do recipiente. A escolha dos meios de cultura recaiu, para os germes do grupo coliforme e enterococo, no "Brilliant Green Bile 2% Broth" (Difco B-7), confirmado pelo "Levine E. M. B. Agar" (Difco B-5) e no meio de LITSKY e col.¹⁰, modificado por RAJ e col.¹¹, em suas fases presuntiva e confirmativa, respectivamente.

Para a pesquisa dos microrganismos pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* utilizaram-se dois meios de cultura: o caldo tripton-glicose e o caldo de figado, segundo a técnica preconizada por STUMBO¹⁵, que permitiram distinguir os germes do grupo *Bacillus* (mesófilos e termófilos aeróbios estritos e anaeróbios facultativos), dos germes do grupo *Clostridium* (mesófilos e termófilos anaeróbios estritos). A prova da catalase foi utilizada, ainda, para referendar a distinção entre os dois grupos.

A interpretação numérica dos resultados foi conseguida, para os quatro grupos de microrganismos, pelo método estatístico do número mais provável³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro n.º 1 mostra a quantidade de resultados positivos para os microrganismos dos grupos coliforme, enterococo, *Bacillus* sp. e *Clostridium* sp. Desse quadro foram dispensadas as amostras que acusaram negatividade para os quatro grupos.

Os percentuais de ocorrência de positivos, tomando-se por base as duzentas e dez amostras analisadas, encontram-se detalhadas no Quadro n.º 2.

QUADRO 1

Ocorrência de germes dos grupos Coliforme, Enterococo, *Bacillus* e *Clostridium* em 210 amostras de presuntada enlatada, rejeitadas pelo Serviço de Fiscalização Sanitária.

N.º da amostra	Pos.tividade para germes do grupo			
	Coliforme	Enterococo	Bacillus	Clostridium
003			+	
008		+		
009	+	+		
013		+		
016				+
018	+	+	+	
021		+		
024		+	+	
030	+	+		
033	+			+
036		+		
038	+	+		
039		+		
044			+	
047	+	+		
050		+	+	
051	+	+		
063		+		
065		+		
068	+	+		
072		+		
076			+	+
077		+	+	
082	+	+		
084	+			
087	+			
091		+	+	+
093	+	+	+	+
102	+			
110	+	+		
117	+	+		
133		+		
139			+	+
143		+		
148			+	
160	+	+		
166		+		
172	+	+		
178			+	
185	+	+		
189	+	+		
193		+		
194		+		
202	+	+		
207			+	+

QUADRO 2

Percentuais de ocorrência de germes dos grupos coliforme, enterococo, *Bacillus* e *Clostridium*, em 210 amostras de presuntada enlatada, rejeitadas pelo Serviço de Fiscalização Sanitária.

Positividade Microorganismo Pesquisado	Frequência	Percentual
Coliformes	20	9,52
Enterococos	33	15,71
<i>Bacillus</i> sp.	14	6,66
<i>Clostridium</i> sp.	8	3,80

A observação minuciosa do Quadro n.º 1 permite depreender algumas informações importantes acerca do tipo da contaminação envolvida com a deterioração do produto. Assim, nem sempre foi possível caracterizar decisivamente a presença somente dos grupos coliforme-enterococo ou *Bacillus-Clostridium*. Algumas vezes ocorreram contaminações mistas: coliforme-enterococo-*Bacillus*, enterococo-*Bacillus*, coliforme-*Clostridium*, enterococo-*Bacillus-Clostridium* e, mesmo, coliforme-enterococo-*Bacillus-Clostridium*. Estes achados referendam as opiniões de HERSOM & HULLAND⁹, REED e col.¹² e STUMBO¹⁰, unânimes ao considerarem bastante diversificadas as estirpes microbianas responsáveis pela deterioração dos alimentos cárneos enlatados e processados pelo calor. Ora, se um recipiente "respirar", ainda que seja apenas por momentos, bactérias podem ser introduzidas com a água ou o ar contaminados. É muito mais provável a sua penetração com água contaminada do que com o ar, pois na maioria dos casos, as aberturas que determinam o vazamento são suficientemente pequenas para fil-

trar poeiras com bactérias provenientes do ar. Isto, porém, não ocorre com as bactérias em suspensão na água. Porisso e ainda em consequência das pressões nas costuras das latas e nas tampas dos frascos durante a operação de resfriamento, é muito mais plausível que as bactérias tenham acesso durante o resfriamento ou logo depois, enquanto os recipiente ainda estejam úmidos. Esta hipótese parece demonstrada pelos resultados do presente trabalho, onde foi detectada, na maioria das amostras, uma contaminação mista, representada por germes dos grupos coliforme e enterococo e dos grupos *Bacillus* e *Clostridium*. Ainda nesse sentido, são significativas as observações de CAMERON & ESTY⁵, ao afirmar que "quantidades diminutas de água contaminada podem determinar a deterioração; por exemplo, se a água estiver contaminada com 1 milhão de bactérias por mililitro, um milionésimo de mililitro penetrando no recipiente será suficiente para determinar a deterioração".

A análise do Quadro n.º 2 também apresenta algumas evidências interessantes: primeiro, a supremacia dos grupos coliforme-enterococo sobre os grupos *Bacillus-Clostridium*, o que faz crer numa maior incidência de deterioração por vazamento do que por sub-processamento, em concordância com REYNOLDS & LICHTENSTEIN¹³; segundo, a supremacia do grupo *Bacillus* sobre o grupo *Clostridium*, referendando a maior resistência térmica dos bacilos termófilos formadores de esporos e anaeróbios facultativos, endossando as conclusões de YOKOYA¹⁹; terceiro, a supremacia do grupo enterococo sobre o grupo coliforme, tornando taxativa, como também considera RAJ¹¹, a maior resistência ao calor dos estreptococos pertencentes ao grupo D de Lancefield, quando comparados com os microrganismos pertencentes ao grupo coliforme.

PANETTA, J. C. ; BARBUTO, O. J. M. ; RICCETTI, R. V. ; GARCIA MORENO, A.
*Occurrence of microorganisms responsible for deterioration of a meat
 subproduct of low acidity. Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo,*
13(1):241-47, 1976.

SUMMARY: *In the present paper it was studied the cause of contamination of corned beef a meat subproduct of low acidity, were analysed 210 samples. The following agents were searched: Clostridium — 3,8%; Bacillus — 6,66%; Coliforms — 9,52%; Enterococos — 15,71%.*

Knowing that the present agents of the group Bacillus and Clostridium is a marker of deterioration by subprocessing and the detection of Coliforms and Enterococci is an index of leakage from sanitary cans the results obtained allowed to conclude that leakage of sanitary cans is the most frequent cause for the putrefactive alterations found in these products.

UNITERM: *Canned food spoilage*; Canned meat*.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ALLEN, M.B. The thermophilic aerobic sporeforming bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **17**:125, 1953.
- 2 — AMAHA, M. Factors affecting heat-destruction of bacterial spores. INTERNATIONAL CONGRESS OF CANNED FOODS, 4., Berlin, 1961. *Proceedings*.
- 3 — AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION Standard methods for the examination of water, sewage and industrial wastes. 10th ed. New York, 1955. p. 375-87.
- 4 — AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION *Recommended methods for the microbiological examination of foods*. New York, 1958. 207 p.
- 5 — CAMERON, E.J. & ESTY, J.R. Comments on the microbiology of spoilage in canned foods. *Food Res.*, **5**: 549, 1940.
- 6 — ELLER, C.; ROGERS, L. & WYNNE, E.S. Agar concentration in Counting *Clostridium* colonies. *Appl. Microbiol.*, **15(1)**:55-57, 1967.
- 7 — FRAZIER, W.C. *Food microbiology*. New York, Mc Graw-Hill, 1958. 472 p.
- 8 — HERSCHDOERFER, S.M. *Quality control in the food industry* London, Academic Press, 1967. 2 v., p. 385, 440.
- 9 — HERSOM, A.C. & HULLAND, E.D. *Canned foods. An Introduction to their Microbiology*. 5th ed. New York, Chem. Publ., 1964. 291 p.
- 10 — LITSKY, W. et al. A new medium for the detection of enterococci in water. *Amer. J. publ. Hlth*, **43(7)**: 873-9, 1953.
- 11 — RAJ, H. Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. II. Enterococci. *Appl. Microbiol.*, **9(4)**:295-303, 1961.
- 12 — REED, J.M.; BOHRER, C.W.; CAMERON, J.E. Spore destruction rate studies on organism of significance in the processing of canned foods. *Food Res.*, **16**:383, 1951.
- 13 — REYNOLDS, H. & LICHTENSTEIN, H. Evaluation of heat resistance data for bacterial spores. *Bacteriol. Revs.*, **16**:126-35, 1952.
- 14 — SNUDDEN, B.H. & LECHOWICH, R.V. Growth and sporulation of *Cl. botulinum* type E in chemically defined media. Michigan, 1968. (Michigan, Agricultural Experiment Station, Journal Article n.º 3848).
- 15 — STUMBO, C.R. *Thermobacteriology in food processing*. London, Academic Press, 1965. 236 p.
- 16 — TOWNSEND, C.T.; SOMERS, I.I.; LAMB, F.C.; OLSON, N.A. A laboratory

-
- manual for the canning industry. 2nd ed. Washington, D.C., National Canners Association Research Laboratories, 1956.
- 17 — VAUGHN, R.H.; KREULEVITCH, I.H.; MERCER, W.A. Spoilage of canned foods caused by the *Bacillus macerans* — polymyxa group of bacteria. *Food Res.*, **17**:560, 1952.
- 18 — WYNNE, E.S.; SCHMIEDING, W.R.; DAYE, G.T. A simplified medium for counting *Clostridium* spores. *Food Res.*, **20**:9-12, 1955.
- 19 — YOKOYA, F. Fatores que influem na "morte" das bactérias a altas temperaturas. *Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos*, (11):2-26, 1967.
- 20 — VOKOYA, F. Fundamentos da esterilização dos alimentos enlatados. *Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos*, (16):1-32, 1968.
- Recebido para publicação em 15-3-76
Aprovado para publicação em 25-3-76