

LISTERIA MONOCYTOGENES IN TURKEY MEAT UNDER MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGING WITH GAS MIXTURES OF ARGON OR CARBON MONOXIDE

M.J. FRAQUEZA, M.C. FERREIRA e A.S. BARRETO

Faculdade de Medicina Veterinária, CIISA, Universidade Técnica de Lisboa, TU Lisbon,
Av. da Universidade Técnica, Polo Universitário, Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal;
e-mail: mjoaofraqueza@fmv.utl.pt

(Recepção: 13 de Setembro de 2005; Aprovado: 15 de Outubro de 2005)

ABSTRACT

Considering the risk represented by the presence of *Listeria monocytogenes* in turkey meat under modified atmosphere packaging (MAP) conditions with a gas mixture which allows an extended shelf life of almost three weeks and a possible rough handling by consumers, our objective was to evaluate the behaviour of this pathogen in turkey meat under MAP, with argon or carbon monoxide, refrigerated (at 0 and 7 °C) and submitted to a high abuse temperature. Turkey meat samples of approximately 25 g were inoculated with 1 ml of a dilution containing 10^4 *Listeria monocytogenes* 4a CECT 934 bacteria. Inoculated samples were packaged under aerobiosis and MAP (50%N₂/50%CO₂, 50%Ar/50%CO₂, 0.5%CO/49.5%N₂/50%CO₂) and subdivided for storage at three different temperatures 20 °C, 7 °C and 0 °C. *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* spp. plate counts were performed on samples after different storage periods (1, 2, 5, 12, 19 and 25 days). The increase in *Pseudomonas* spp. counts in turkey meat under aerobiosis or MAP seems not to have interfered with *Listeria monocytogenes* growth. The inhibition of *Listeria monocytogenes* under MAP conditions with 50% CO₂ was assured only when meat samples were stored at 7 and 0 °C. *Listeria monocytogenes* did not grow at 0 °C under any package conditions, including aerobiosis. The dissolution of CO₂ in cell cytoplasm was lower at 20 °C, with the inhibition of *Listeria monocytogenes* at this temperature being less than that observed in the other storage conditions. It was, however, higher than that observed in meat under aerobiosis. Thus, close temperature control is mandatory with MAP to minimize the growth of *Listeria monocytogenes* in turkey meat.

Key words: argon, carbon monoxide, *Listeria monocytogenes*, MAP, safety, turkey meat

COMPORTAMENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* NA CARNE DE PERU EMBALADA EM ATMOSFERA MODIFICADA COM MISTURAS DE GASES CONTENDO ARGON OU MONÓXIDO DE CARBONO

RESUMO

Atendendo ao risco que pode representar a presença de *Listeria monocytogenes* na carne de aves embalada em atmosfera modificada (MAP), com misturas de gases que podem prolongar o período de validade até às três semanas e a má manipulação que o consumidor pode fazer destas embalagens, foi nosso objectivo estudar o comportamento deste patógeno na carne de peru embalada com misturas de gases contendo Ar (50% Ar e 50% CO₂) ou CO (0,5% CO, 49,5% N₂ e 50% CO₂), em refrigeração (0 e 7 °C) e sob efeito de uma temperatura abusivamente elevada. Assim, inoculou-se 1 ml duma diluição veiculando cerca de 10⁴ bactérias de *Listeria monocytogenes* 4a CECT 934, na superfície de amostras de carne de peru (escalopes), com aproximadamente 25 g. As amostras inoculadas foram embaladas em aerobiose e em MAP (50%N₂/50%CO₂, 50%Ar/50%CO₂, 0,5%CO /49,5%N₂/50%CO₂) sendo, posteriormente, subdivididas para armazenamento sob três regimes de temperatura diferentes 20, 7 e 0 °C. Foram efectuadas contagens de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. às amostras em diferentes dias de armazenamento (1º, 2º, 5º, 12º, 19º e 25º dias). O crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em aerobiose ou em MAP não parece ter interferido com o crescimento de *L. monocytogenes*. A inibição do crescimento de *L. monocytogenes* quando sujeita às diferentes atmosferas modificadas em estudo contendo concentrações de 50% de CO₂, é garantida apenas quando a carne é armazenada a temperaturas de 7 e 0 °C. A 0 °C *L. monocytogenes* não cresceu em qualquer uma das condições de embalagem inclusive em aerobiose. A 20 °C a dissolução do CO₂ no citoplasma é menor, pelo que a inibição de *L. monocytogenes* foi menor do que a observada nas outras temperaturas. Não obstante, foi superior à observada na carne embalada em aerobiose. Confirma-se assim a importância do controlo da temperatura, em conjunto com a embalagem MAP para limitar o crescimento de *L. monocytogenes* na carne de peru.

Palavras-chave: argon, carne de peru, embalagem em atmosfera modificada, *Listeria monocytogenes*, monóxido de carbono, segurança

INTRODUÇÃO

Na carne de aves fresca é comum o aparecimento de *Listeria monocytogenes* (Jay, 1996; Ojeniyi *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 2000; Miettinen *et al.*, 2001; Gudbjörnsdóttir *et al.*, 2004), um dos principais patógenos emergentes para o

Homem (McLauchlin, 1996; Lessing et al., 1994), uma vez que se trata de uma bactéria ubiqüitária, psicrotrófica, habitualmente presente no ambiente fabril (Chasseignaux et al., 2002).

Em Portugal, os estudos de frequência do género *Listeria* spp. em carne de aves apresentam resultados que variaram entre 30 a 100%, com valores de prevalência de *L. monocytogenes* entre 12 a 60% (Antunes et al., 2000; Fraqueza et al., 2002; Guerra e Bernardo, 2002; Guerra, 2002; Mena et al., 2004). A presença deste patogénico na carne é menos preocupante do que nos alimentos prontos a consumir devido ao facto de ser sujeita a preparação culinária com aquecimento letal antes de ser consumida. Todavia, não deve ser desprezada a sua importância como recontaminante, devido ao facto de crescer a temperaturas de refrigeração, podendo aumentar de menos de 100 células/g (em muitos países considerado o valor máximo aceitável para pessoas saudáveis), para mais de 100 000 células/g durante um período de 3-4 semanas, o período de validade de muitos alimentos mantido em refrigeração (Miettinen et al., 1999).

Assim, o risco ligado ao consumo de carne de peru contaminada por *L. monocytogenes* depende da presença e do número de bactérias, aliado à possibilidade do seu crescimento em função das características físico-químicas do alimento, da temperatura e da duração do período de conservação/armazenamento que poderá ser alargado com a embalagem MAP. Neste contexto, têm sido efectuados estudos de comportamento de *L. monocytogenes* sujeita a vários factores como pH, aw, NaCl, nitritos, temperatura, atmosferas modificadas com concentrações crescentes de CO₂, com o objectivo de prever a evolução da população. Outros factores podem influenciar o crescimento, nomeadamente o número inicial, o estado fisiológico da estirpe, interacções com flora competitiva (Farber et al., 1996; Begot et al., 1997; Harrison, 2000; Robison et al., 2001; Pin et al., 2001; François et al., 2004). Cada alimento tem características intrínsecas próprias que, associadas aos factores extrínsecos conferidos pelo processo tecnológico, influenciam o crescimento. Por isso, surgem recomendações da Comunidade Europeia na realização de testes de crescimento de *L. monocytogenes* nos alimentos para avaliação do risco que representa, impondo para objectivo que a concentração de *L. monocytogenes* nos alimentos produza contagens inferiores a 100 ufc.g⁻¹ (Regulamento CE, N° 2073/2005). Os testes de crescimento permitem estudar a evolução duma população de microrganismos patogénicos introduzida num alimento, sendo um dos utensílios disponíveis para a avaliação do risco de doença causada pela ingestão dum alimento contaminado (Uyttendaele et al., 2004).

Atendendo ao risco que pode representar a presença deste patógeno na carne de aves embalada em MAP, com misturas de gases que podem prolongar o período de validade até às três semanas e a má manipulação que o consumidor pode fazer destas embalagens foi nosso objectivo estudar o comportamento de *L. monocytogenes* na carne de peru embalada com misturas de gases contendo Ar (50% Ar e 50% CO₂) ou CO (0,5% CO, 49,5% N₂ e 50% CO₂) armazenada em refrigeração a 0 e a 7 °C ou sob efeito de uma temperatura elevada.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras foram retiradas de carcaças de peru abatidos de acordo com as condições comerciais de abate num matadouro industrial. A carne fatiada foi colocada em saco de polietileno e transportada em caixa isotérmica em menos de uma hora para o laboratório.

Estirpe utilizada

Utilizou-se uma estirpe pura de *L. monocytogenes* 4a CECT 934 conservada a 4 °C no meio de TSA (Tryptona Soja Agar, Oxoid, Inglaterra). Esta cultura foi renovada mensalmente. Antes de ser utilizada para os ensaios de inoculação procedeu-se à repicagem da estirpe em tubos de BHI (Brain Heart Infusion; Sharlau, Espanha) com um período de incubação de 24 h a 37 °C, duas vezes consecutivas. Efectuou-se de seguida a sementeira por estria em placas de TSA durante 24 h a 37 °C.

Preparação da suspensão de *Listeria monocytogenes* e inoculação da carne

Utilizou-se uma cultura de 24 h de *L. monocytogenes* em TSA na preparação de suspensões bacterianas em água tamponada fosfatada¹ de forma a obter uma absorvância de aproximadamente 0,340 A, medida num espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Inglaterra) a 625 nm. A estes valores de absorvância da suspensão (suspensão-inicial) corresponderam contagens médias de aproximadamente 10⁷ ufc.ml⁻¹, conferidas utilizando a técnica de sementeira das suas diluições decimais em meio TSA, seguida de incubação de

¹ Solução tampão de fosfato de potássio dihidrogenado, pH 7,2 a 0,3mM, contendo 1mM de sulfato de magnésio (Jensen *et al.*, 1978).

24-48 h a 37 °C. A suspensão inicial foi diluída a 10^{-3} e inoculou-se 1ml desta diluição veiculando cerca de 10^4 bactérias, na superfície de amostras de carne de peru com aproximadamente 25 g, isentas deste patógeno (mediante pesquisa). Foram efectuadas contagens de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. às amostras de carne logo após inoculação.

Condições de embalagem e armazenamento

As amostras inoculadas foram embaladas em aerobiose, utilizando barquetes de polipropileno rígido (Technopack plastics, S/L, Barcelona) envolvidas por filme de polivinilo permeável ao oxigénio e em MAP. Constituíram-se quatro grupos diferentes: aerobiose, 50%N₂/50%CO₂ (MAP-N₂/CO₂), 50%Ar/50%CO₂ (MAP-Ar/CO₂), 0,5%CO /49,5%N₂/50%CO₂ (MAP-CO/N₂/CO₂) sendo, posteriormente, subdivididas para armazenamento sob três regimes de temperatura diferentes 20, 7 e 0 °C (Fig. 1).

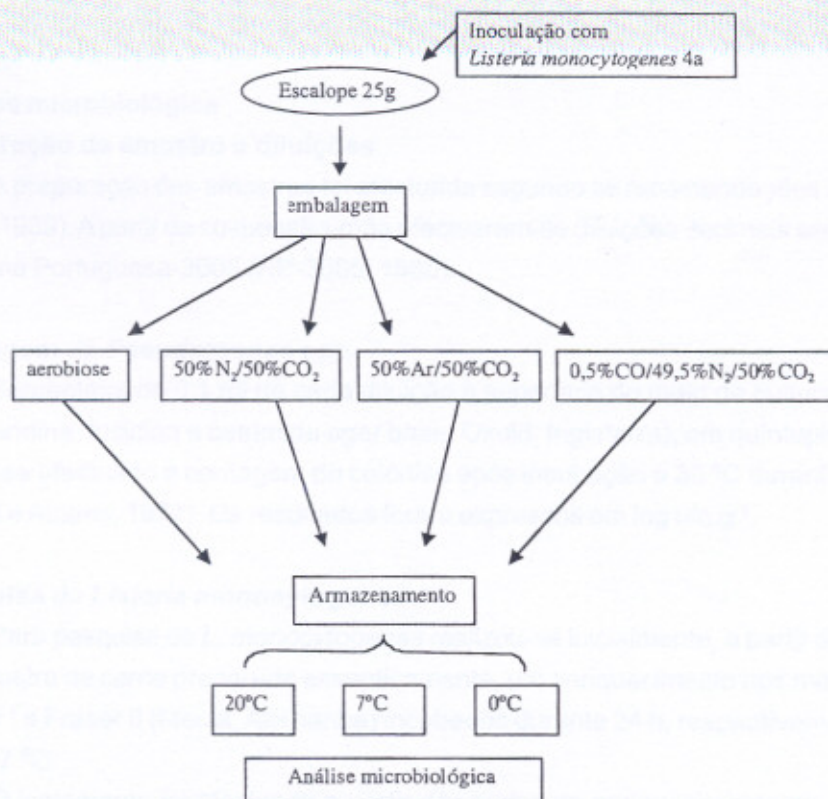


Figura 1. Protocolo do estudo de desafio efectuado na carne de peru fatiada e embalada em aerobiose e MAP.

Nas embalagens da carne em atmosfera modificada utilizaram-se barquetes de polipropileno rígido e sacos polilaminados "HBX-070" (R.Bayer, Alemanha) de alta impermeabilidade ao O_2 e CO_2 (permeabilidade: $O_2=8,3\text{ cm}^3$, $CO_2=23\text{ cm}^3$, $N_2=3\text{ cm}^3$ e ao vapor de água= $1,3\text{ cm}^3$). Os sacos foram termosoldados numa máquina EVT-7-CD Tecnotrip (Barcelona) após obter um vazio de 97%, seguido de uma entrada de gás de 60%.

As amostras embaladas que permaneceram a 20 °C foram analisadas após 24 e 48 h de armazenamento. Nas amostras embaladas em aerobiose e armazenadas a 7 °C, o período de armazenamento foi de cinco dias, enquanto nas armazenadas a 0 °C o período de armazenamento estendeu-se até aos 12 dias, efectuando-se análises ao 5º e 12º dia.

As amostras embaladas em MAP e armazenadas a 20 °C foram analisadas após 24 e 48 h, enquanto nas outras temperaturas de armazenamento realizaram-se análises aos 5º, 12º, 19º e 25º dias de armazenamento. Efectuaram-se no mínimo duas repetições do protocolo descrito para cada período de armazenamento.

Análise microbiológica

Preparação da amostra e diluições

A preparação das amostras foi efectuada segundo as recomendações da NP 2079 (1989). A partir da suspensão-mãe efectuaram-se diluições decimais segundo a Norma Portuguesa-3005 (NP-3005, 1985).

Contagem de *Pseudomonas* spp.

Sementeira de 0,1 ml de cada diluição à superfície do meio de cultura CFC (cefaloridina, fucidina e cetrimida agar base; Oxoid, Inglaterra), em quintuplicado, tendo-se efectuado a contagem de colónias após incubação a 30 °C durante 48 h (Mead e Adams, 1977). Os resultados foram expressos em log ufc.g⁻¹.

Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Para pesquisa de *L. monocytogenes* realizou-se inicialmente, a partir de 25 g de amostra de carne preparada assepticamente, um enriquecimento nos meios de Fraser I e Fraser II (Merck, Alemanha) incubados durante 24 h, respectivamente a 30 e 37 °C.

O isolamento foi efectuado a partir dos meios de enriquecimento mediante sementeira por estria à superfície do Modified Oxford Medium (Difco), seguido de incubação a 37 °C durante 24 a 48 h (ISO/DIS 11290-1, 1995).

Para confirmação das colónias suspeitas de *L. monocytogenes* foi efectuada repicagem para meio TSA seguida de incubação de 24 h a 37 °C. Efectuou-se o estudo por transiluminação de Henry das colónias que cresceram em TSA; nas que apresentaram uma luminescência azul efectuaram-se testes da catalase e oxidase. Para identificação e confirmação utilizaram-se os testes bioquímicos miniaturizados APIListeria (Biomerieux, França) a partir de colónias catalase positivas e oxidase negativas.

Contagem de *Listeria monocytogenes*

Sementeira em duplicado de 0,1 ml da suspensão-mãe por espalhamento à superfície do meio de cultura Modified Oxford Medium (Difco), seguida de contagem de colónias suspeitas após incubação a 37 °C, durante 24 a 48 h. Confirmação de *L. monocytogenes* de acordo com o procedimento descrito na pesquisa deste microrganismo. Os resultados foram expressos em log ufc.g⁻¹.

Análise estatística

A comparação do crescimento de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. ao longo do tempo sob diferentes condições de embalagem e de temperatura de armazenamento foi efectuada pelo ajuste das respectivas rectas de regressão linear simples ($y=a+bx$) quando significativas e estabeleceu-se uma estratégia de análise de covariância. Previamente tentou-se estabelecer modelos de regressão quadrática, não linear, com a função $y=a+bx+cx^2$ mas não foram significativos. A estratégia de análise de covariância dos modelos de regressão linear foi efectuada de acordo com as etapas referidas em Littell *et al.* (1996) utilizando-se o programa SAS System. Efectuou-se o cálculo da taxa de crescimento entre dois tempos de armazenamento (diferença entre os valores obtidos na contagem de microrganismos em log ufc.g⁻¹ (Δy) em dois pontos de análise nos tempos a e b) através da equação $\Delta y_{a-b}/\Delta t_{a-b}$, em que Δt_{a-b} é a diferença de tempo em dias entre tempos a e b, e apresentação das respectivas médias e desvios padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises das amostras de carne de peru utilizadas neste estudo provaram a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g. No Quadro I estão representados os teores médios de *L. monocytogenes* nos escalopes de peru

inoculados e embalados em aerobiose e MAP com as misturas 0,5%CO/49,5%N₂/50%CO₂, 50%N₂/50%CO₂ e 50%Ar/50%CO₂ armazenados a 20, 7 e 0°C.

O crescimento de *L. monocytogenes* apresentou uma relação linear com o tempo significativa, quando a carne de peru embalada nas diferentes condições de estudo esteve exposta a uma temperatura abusiva de 20 °C (Fig. 2A). As regressões lineares entre os teores de *Pseudomonas* spp. e o tempo de armazenamento na carne embalada em aerobiose e MAP a 20 °C estão representadas na Fig. 2B.

No Quadro II apresentam-se as rectas de regressão linear estabelecidas para *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em aerobiose e MAP mantida a 20 °C.

Quadro I - TEORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO DE *Listeria monocytogenes* NA CARNE EMBALADA EM AEROBIOSE E MAP AO LONGO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO A 0, 7 E 20 °C.

Embalagem	Temp. (°C)	<i>Listeria monocytogenes</i> (log ufc.g ⁻¹)						
		dias						
		0	1	2	5	12	19	25
Aerobiose	20	4,06±1,08	8,27±0,30	8,32±0,07				
	7	4,06±1,08			6,58±1,22			
	0	4,06±1,08			3,99±1,59	5,52±0,44		
MAP-CO/N ₂ /CO ₂	20	4,06±1,08	5,97±0,98	6,79±1,68				
	7	4,06±1,08			4,75±0,94	4,39±1,12	4,95	4,95±0,91
	0	4,06±1,08			4,05±1,32	3,56±1,64	5,06	4,01±1,18
MAP-N ₂ /CO ₂	20	4,06±1,08	6,65±0,89	7,67±0,06				
	7	4,06±1,08			4,85±1,00	5,11±1,32	6,66±1,83	5,62±1,74
	0	4,06±1,08			3,87±1,26	3,94±1,34	4,89±0,13	3,85±1,35
MAP-Ar/CO ₂	20	4,15±1,31	6,43±1,14	7,17±1,03				
	7	4,15±1,31			5,60±0,57	6,01±1,34	5,71±1,35	5,88±1,39
	0	4,15±1,31			5,10±0,01	5,04±0,06	5,25±0,10	5,07±0,09

* temperatura

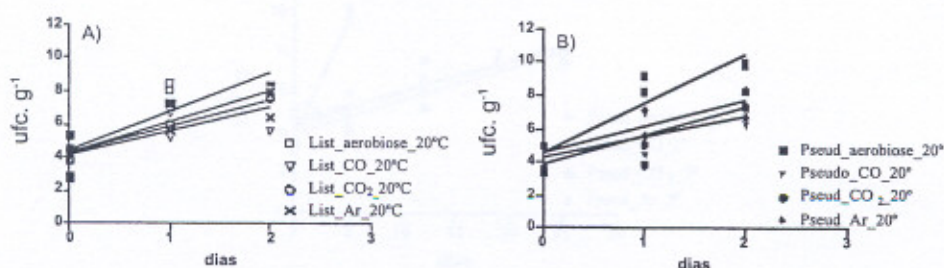


Figura 2. Rectas de regressão linear representando o crescimento de *Listeria monocytogenes* (A) e *Pseudomonas* spp. (B) na carne de peru embalada em aerobiose e MAP durante 2 dias a 20 °C.

Quadro II - RECTAS DE REGRESSÃO LINEAR MODELOS DE CRESCIMENTO DE *Listeria monocytogenes* E DE *Pseudomonas* spp. NA CARNE DE PERU EMBALADA EM MAP E EM AEROBIOSE DURANTE 2 DIAS A 20 °C.

Tipo de embalagem	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Pseudomonas</i> spp.	
	Rectas de regressão	R ²	Rectas de regressão	R ²
aerobiose	$y=2,32x+4,44$	0,7488	$y=3,01x+4,52$	0,8804
0,5%CO/49,5%N ₂ /50%CO ₂	$y=1,41x+4,16$	0,5868	$y=1,23x+4,27$	0,5844
50%N ₂ /50%CO ₂	$y=1,87x+4,21$	0,7873	$y=1,67x+3,93$	0,6787
50%Ar/50%CO ₂	$y=1,56x+4,33$	0,6395	$y=1,58x+4,53$	0,7284

Quando se utilizou a metodologia de covariância para comparar a evolução de *L. monocytogenes* em diferentes condições de embalagem, verificou-se que não existem diferenças significativas ($p=0,575$) entre os declives das diferentes rectas de regressão ajustadas aos valores de crescimento de *L. monocytogenes* na carne embalada em aerobiose e MAP, quando armazenada a 20 °C, pelo que foi possível calcular um declive único para todos os resultados igual a 1,796.

A 0 e 7 °C, independentemente da condição de embalagem MAP utilizada, a população de *L. monocytogenes* na carne não aumentou ao longo dum período de armazenamento de 25 dias, não se estabelecendo qualquer relação linear significativa entre o crescimento microbiano e o tempo de armazenamento das amostras. Contudo, esta relação linear foi encontrada para *Pseudomonas* spp. na carne embalada e armazenada a 7 °C (Fig. 3), resumindo-se no Quadro III as rectas de regressão estabelecidas para as diferentes condições de embalagem da carne. A influência do efeito da embalagem com as atmosferas 0,5%CO/49,5%N₂/

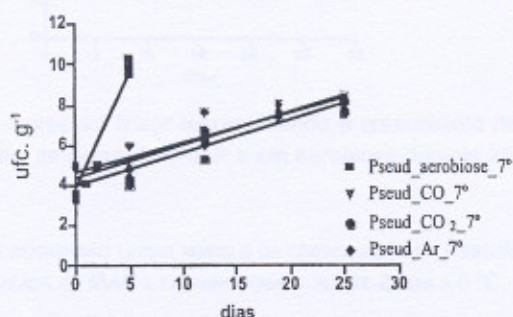


Figura 3. Rectas de regressão linear representando o crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em MAP e em aerobiose durante 25 dias a 7 °C.

Quadro III - RECTAS DE REGRESSÃO LINEAR MODELOS DE CRESCIMENTO DA *Pseudomonas* spp. NA CARNE DE PERU EMBALADA EM MAP E EM AEROBIOSE DURANTE 2 DIAS A 7°C.

<i>Pseudomonas</i> spp. 7 °C	Rectas de regressão	R ²
aerobiose	$y=1,15x+3,87$	0,9135
0,5%CO ₂ /49,5%N ₂ /50%CO ₂	$y=0,17x+4,37$	0,8560
50%N ₂ /50%CO ₂	$y=0,17x+3,96$	0,8638
50%Ar/50%CO ₂	$y=0,15x+4,64$	0,8134

50%CO₂, 50%N₂/50%CO₂ e 50%Ar/50%CO₂ sobre o crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru ao longo do tempo de armazenamento é significativamente diferente ($p<0,0001$) do observado na carne embalada em aerobiose, tal como se observou pelas diferenças encontradas nos declives das rectas de regressão ajustadas em cada condição de embalagem.

Quando a carne de peru foi armazenada a 0 °C, a relação linear entre o teor de *Pseudomonas* spp. e o tempo de armazenamento das amostras embalada em aerobiose foi significativa, ajustando-se a recta de regressão que está representada na Fig. 4 e Quadro IV. As atmosferas 0,5%CO₂/49,5%N₂/50%CO₂, 50%N₂/50%CO₂ e 50%Ar/50%CO₂ inibiram o crescimento de *L. monocytogenes* e da flora de deterioração representada pelas *Pseudomonas* spp. quando a carne foi

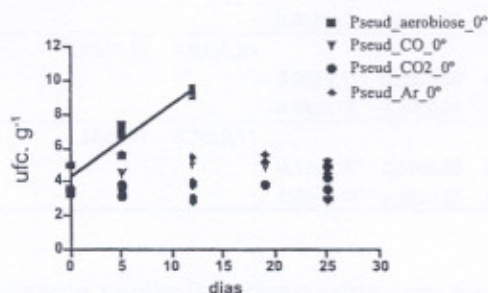


Figura 4. Rectas de regressão linear representando o crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em MAP e em aerobiose durante 25 dias a 0 °C.

Quadro IV - RECTA DE REGRESSÃO LINEAR MODELO DE CRESCIMENTO DA *Pseudomonas* spp. NA CARNE DE PERU EMBALADA EM MAP E EM AEROBIOSE DURANTE 2 DIAS A 0 °C.

<i>Pseudomonas</i> spp. 0 °C	Rectas de regressão	R ²
aerobiose	$y=0,43x+4,37$	0,8733

armazenada a 0 °C, não se observando um aumento do teor destes microrganismos ao longo do tempo de armazenamento.

O crescimento da população de *L. monocytogenes* na carne foi acentuado nas diferentes condições de embalagem a 20 °C (Fig. 2). Apesar da análise de covariância não registrar diferenças significativas no comportamento de *L. monocytogenes* quanto ao efeito inibitório das misturas gasosas contendo CO₂ comparativamente com a embalagem em aerobiose, pode-se verificar que a taxa de crescimento médio de *L. monocytogenes* a 20 °C foi mais elevada na carne embalada em aerobiose (3,41 log ufc.dia⁻¹) nas primeiras 24 h, do que nas condições de embalagem MAP que apresentaram valores entre 1,12 e 1,79 log ufc.dia⁻¹ (Quadro V).

Quadro V. TAXAS DE CRESCIMENTO MÉDIO DE *Listeria monocytogenes* NA CARNE EMBALADA EM AEROBIOSE E MAP AO LONGO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO A 0, 7 E 20 °C.

Embalagem	Temp.* (°C)	<i>Listeria monocytogenes</i> log ufc.dia ⁻¹						
		$\Delta y_{0-1}/\Delta t_{0-1}$	$\Delta y_{1-2}/\Delta t_{1-2}$	$\Delta y_{2-3}/\Delta t_{2-3}$	$\Delta y_{3-12}/\Delta t_{3-12}$	$\Delta y_{12-18}/\Delta t_{12-18}$	$\Delta y_{18-25}/\Delta t_{18-25}$	$\Delta y_{25-28}/\Delta t_{25-28}$
Aerobiose	20	3,41±0,37	0,05±0,23					
	7			0,42±0,14				
	0			-0,02±0,14	0,06±0,02			
MAP- CO ₂ /N ₂ /CO ₂	20	1,12±0,31	0,82±0,70					
	7			0,05±0,16	-0,02±0,00	-0,02	-0,00±0,01	-0,01±0,03
	0			-0,00±0,12	-0,03±0,03	-0,01	-0,00±0,01	-0,00±0,02
MAP- N ₂ /CO ₂	20	1,79±0,22	1,02±0,96					
	7			0,07±0,11	0,05±0,05	-0,00±0,18	0,05±0,04	0,04±0,05
	0			-0,04±0,12	-0,01±0,04	-0,09±0,10	-0,01±0,02	-0,00±0,01
MAP- Ar/CO ₂	20	1,58±0,47	0,74±0,11					
	7			0,15±0,02	0,10±0,06	0,05±0,04	0,04±0,03	0,01±0,04
	0			0,05±0,14	0,02±0,06	0,02±0,03	0,01±0,03	-0,00±0,00

* temperatura

Simultaneamente, verificou-se que a carne armazenada em aerobiose poderá apresentar sinais de deterioração no termo das 24 h devido ao rápido crescimento da população de *Pseudomonas* spp. que apresentou uma taxa de crescimento específica significativamente mais elevada (3,01 log ufc.d⁻¹), que a observada nas restantes condições de embalagem (Quadro II). Por outro lado, nas condições de embalagem MAP os sinais de deterioração da carne poderão não ser tão evidentes, enquanto o crescimento de *L. monocytogenes* pode chegar perto dos 100 ufc.g⁻¹.

A 20 °C não se observaram diferenças significativas do efeito dos gases Ar e CO comparativamente à mistura gasosa contendo apenas 50% de CO₂ quer

em relação ao crescimento de *L. monocytogenes*, quer em relação ao crescimento de *Pseudomonas* spp.. Nas amostras armazenadas a 20 °C observou-se um efeito inibitório do CO₂, presente na mistura de gases com uma concentração de 50%, sobre a *Pseudomonas* spp., uma vez que o efeito repressivo de qualquer das misturas com esta concentração de CO₂ é significativamente superior ($p=0,04516$) ao observado na carne embalada em aerobiose (Fig. 2B). O efeito inibitório do CO₂ aumentou significativamente com a diminuição da temperatura a 7 °C em qualquer das misturas utilizadas ($p<0,00041$).

A 7 °C não ocorreu crescimento de *L. monocytogenes* na carne de peru em qualquer das embalagens MAP. Este patogénico apresentou uma taxa de crescimento média inferior a 0,05 log ufc.dia⁻¹, entre os 0 e 25 dias de armazenamento (Quadro V). Apenas as amostras embaladas em aerobiose, registaram uma taxa média de crescimento de *L. monocytogenes* de 0,42 log ufc.dia⁻¹ ao fim de cinco dias de armazenamento a 7 °C, observando-se no mesmo período um aumento de *Pseudomonas* spp. com uma taxa de crescimento específico de 1,15 log ufc.dia⁻¹. Assim, quando ocorre um aumento de *Listeria monocytogenes* para 100 ufc.g⁻¹ a carne pode apresentar teores em *Pseudomonas* spp. superiores a 8 log ufc.g⁻¹, acompanhada de sinais de deterioração evidenciados por mau cheiro e viscosidade, que levará à sua rejeição pelos consumidores. Salienta-se que esta análise é efectuada partindo do pressuposto de que as taxas de crescimento calculadas são constantes durante os cinco dias de armazenamento e que a densidade populacional máxima de *L. monocytogenes* na matriz sólida foi de aproximadamente 10⁸ ufc.g⁻¹, tal como se observou nas amostras embaladas em aerobiose a 20 °C.

A inibição do crescimento de *L. monocytogenes* quando sujeita às diferentes atmosferas modificadas em estudo contendo concentrações de 50% de CO₂, é garantida apenas quando a carne é armazenada a temperaturas de 7 e 0 °C. A 0 °C *L. monocytogenes* não cresceu em qualquer uma das condições de embalagem, inclusive em aerobiose.

A 20 °C a dissolução do CO₂ no citoplasma é menor, pelo que a inibição de *L. monocytogenes* foi menor do que a observada nas outras temperaturas. Não obstante, foi superior à observada na carne embalada em aerobiose. Confirma-se, assim, a importância do controlo da temperatura em conjunto com a embalagem MAP para limitar o crescimento de *L. monocytogenes*. De acordo com Farber *et al.* (1996), os resultados do estudo que efectuaram sobre modelização do

crescimento de *L. monocytogenes* demonstraram a importância do controlo de temperatura para garantir e manter as vantagens da extensão do período de vida dos alimentos embalados com atmosferas enriquecidas de CO₂. As fases lag e tempo de geração de *L. monocytogenes* aumentam quando a concentração de CO₂ aumenta e o pH e a temperatura diminuem. Durante um período de 30 dias a pH 5,5 o microrganismo foi incapaz de crescer a 4 °C na presença de concentrações de CO₂ ≥ 50% aumentando a sua taxa de crescimento quando a temperatura aumentou para 7 °C.

Bennik et al. (1995) registaram uma inibição da população de *L. monocytogenes* quando submetida a uma concentração de CO₂ de 50%, como resultado do efeito de uma acidificação do meio pelo CO₂, mas também dum efeito inibitório directo. A difusão de H₂CO₃ através da membrana bacteriana causa alterações do pH intracelular, com efeito nas enzimas envolvidas nas vias metabólicas. Elevadas concentrações de CO₂ podem inibir as reacções de descarboxilação nas quais o CO₂ é libertado por mecanismos de *feedback*.

São vários os factores intrínsecos que influenciam o crescimento de *L. monocytogenes* nos alimentos, tais como pH e aw, independentemente do efeito de misturas de gases contendo CO₂ e da temperatura de armazenamento. Assim, o estudo do crescimento do microrganismo patogénico no próprio alimento é de grande importância para avaliação do risco, tanto mais que este pode ser influenciado pela competição existente com a própria flora de deterioração. O crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em aerobiose ou em MAP não parece ter interferido com o crescimento de *L. monocytogenes*. Buchanan et al. (1999) concluíram que microrganismos de deterioração como *Pseudomonas fluorescens* quando partilham um ambiente com um patogénico como *L. monocytogenes*, tanto pode não ter qualquer influência, como estimular ou inibir a velocidade ou a extensão do crescimento da espécie patogénica, dependendo das condições ambientais.

Quando analisado o crescimento de *L. monocytogenes* em "nuggets" de frango embalado em atmosferas de 100% de CO₂ verificou-se que a 4 e 12 °C houve apenas um atraso, mas não uma inibição do crescimento deste microrganismo (Lyver et al., 1998).

Hart et al. (1991) estudaram o crescimento de *L. monocytogenes* em peitos de frango armazenados a 1, 6 e 15 °C sob diferentes condições de embalagem em atmosfera modificada: a 1 °C este patogénico não cresceu em qualquer das misturas de gases assim como em aerobiose; a 6 °C cresceu lentamente na atmosfera de

30% de CO₂ preenchida com N₂ enquanto não cresceu nas atmosferas de 30% de CO₂ e preenchida com ar ou de 100% de CO₂ durante os 15 dias de armazenamento.

Wimpfheimer *et al.* (1990) concluíram que numa atmosfera de 75% de CO₂ e 25% N₂ *L. monocytogenes*, tal como outras bactérias aeróbias, não cresceu em carne de frango armazenada a 4, 10 ou 27 °C. Contudo, numa atmosfera contendo 5% de O₂, 72,5% de CO₂ e 22,5% N₂, a 4°C, o número de *L. monocytogenes* aumentou aproximadamente 6 log durante um período de armazenamento de 21 dias.

Farber e Daley (1994) observaram que *L. monocytogenes* foi capaz de crescer em rolos de carne de peru embalados com misturas contendo 50% de CO₂. A estirpe *L. monocytogenes* Scott A não cresceu nos rolos de carne de peru embalados em atmosferas de 70% CO₂ e 30% N₂ armazenados a 4 ou a 10 °C.

O efeito do 0,5% de CO na mistura 50% CO₂ e 49,5% N₂ não induziu um efeito inibitório no crescimento de *L. monocytogenes*, para além do observado com a concentração de 50% de CO₂ na mistura com 50% de N₂. A baixas temperaturas (7 e 0°C) não se registou crescimento de *L. monocytogenes*, enquanto a 20 °C o crescimento do patogénico deu origem a um aumento de 1,12 log ufc em 24 h. Nos estudos efectuados por Nissen *et al.* (2000) em carne de vaca embalada com misturas contendo elevadas concentrações de CO₂ (60%) e 0,4% de CO, o crescimento de *L. monocytogenes* a 4 °C foi inibido, enquanto a 10 °C ocorreu um aumento ligeiro de 5x10³ ufc.g⁻¹ para 10⁴ ufc.g⁻¹ após 5 dias de armazenamento tal como foi avaliado pela subcultura. Os autores atribuíram o efeito inibitório registado às elevadas concentrações de CO₂.

As misturas de gases nas embalagens MAP constituem mais uma barreira no crescimento de alguns microrganismos patogénicos como *L. monocytogenes* na carne de peru, sendo fundamental a existência dum sistema de controlo proactivo (HACCP), de modo a garantir a aplicação de boas práticas de higiene e processamento, assim como o controlo adequado da temperatura durante o processo de abate, desmancha, embalamento, armazenamento, distribuição e venda, que se afirme um ponto crítico de controlo.

CONCLUSÕES

O crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em aerobiose ou em MAP não parece ter interferido com o crescimento de

L. monocytogenes. A inibição do crescimento de *L. monocytogenes* quando sujeita às diferentes atmosferas modificadas em estudo contendo concentrações de 50% de CO₂, é garantida apenas quando a carne é armazenada a temperaturas de 7 e 0 °C. A 0 °C *L. monocytogenes* não cresceu em qualquer uma das condições de embalagem inclusive em aerobiose. A 20 °C a dissolução do CO₂ no citoplasma celular é menor pelo que a inibição de *L. monocytogenes* é menor do que a observada em outras temperaturas sendo não obstante superior à observada na carne embalada em aerobiose. Confirma-se assim, a importância do controlo da temperatura em conjunto com a embalagem MAP para limitar o crescimento de *L. monocytogenes*.

AGRADECIMENTOS

Expressamos o nosso agradecimento às técnicas Maria Helena Fernandes e Paula Carapinha dos Santos pelo apoio laboratorial prestado.

BIBLIOGRAFIA

- Antunes, P., Réu, C., Sousa, J.C., Peixe, L. e Pestana, N., 2000. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. isolated from poultry products. Congresso Food Safety. Fundação Engº António de Almeida, Porto, pp. 95.
- Begot, C., Lebert, I. e Lebert, A., 1997. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. Food Microbiology, 14: 403-412.
- Bennik, M.H.J., Smid, E.J., Rombouts, F.M. e Gorris, L.G.M., 1995. Growth of psychrotrophic foodborne pathogens in a solid surface model system under the influence of carbon dioxide and oxygen. Food Microbiology, 12: 509-519.
- Buchanan, R.L. e Bagi, L.K., 1999. Microbial competition: effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology, 16: 523-529.
- Chasseignaux, E., Gérault, P., Toquin, M.-T., Salvat, G., Colin, P. e Ermel, G., 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. FEMS Microbiology Letters, 210: 271-275.
- Farber, J.M., Cai, Y. e Ross, W.H., 1996. Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. Int. J. Food Microbiology, 32: 133-144.
- Farber, J.M. e Daley, E., 1994. Fate of *Listeria monocytogenes* on modified atmosphere packaged turkey roll slices. J. Food Protection, 57: 12, 1098-1100.
- François, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. e Debevere, J., 2005. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. International J. Food Microbiology, 100: 41-53.

- Fraqueza, M.J., Ferreira, M.F. e Barreto, A.S., 2002. Packaged sliced turkey meat on commercial conditions: incidence of *Listeria* spp. and total aerobic flora evaluation. Congresso Food Safety, Fundação Engº António de Almeida, Porto, pp. 102.
- Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M.-L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg Niclasen, O. e Bredholt, S., 2004. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the nordic countries. Food Microbiology, 21: 217-225.
- Guerra, M.M., 2002. Heterogeneidade feno e genotípica de *Listeria monocytogenes*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina Veterinária, UTL, Lisboa, 279 p.
- Guerra, M.M. e Bernardo, F.M.A., 2002. Detection and characterization of *Listeria monocytogenes* isolates in poultry and meat products. Congresso Food Safety. Fundação Engº António de Almeida, Porto, pp.63.
- Harrison, W.A., Peters, A.C. e Fielding, L.M., 2000. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* colonies under modified atmospheres at 4° and 8 °C using a model food system. J. Applied Microbiology, 88: 38-43.
- Hart, C.D., Mead, G.C. e Norris, A.P., 1991. Effects of gaseous environment and temperature on the storage behavior of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. J. Appl. Bacteriology, 70: 40-46.
- Inoue, S., Nakama, A., Arai, Y., Kokubo, Y., Marayama, T., Saito, A., Yoshida, T., Terao, M., Yamamoto, S. e Kumagai, S., 2000. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. Int. J. Food Microbiol., 59: 73-77.
- International Standard ISO/DIS 11290-1 (1995). Microbiologie des Aliments- Methode horizontale pour la recherche et le denombrement de *Listeria monocytogenes*. International Organization for Standardization, Switzerland.
- Jay, J., 1996. Prevalence of *Listeria* spp. In: Meat and poultry products. Food Control, 7: 209-214.
- Jensen, J.P., Huhtanen, C.N. e Bell, R.H., 1978. Culture media and preparation. In: Standard Methods for Examination of Dairy Products, Marth, E.H. (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC, p. 62.
- Lessing, M.P.A., Curtis, G.D.W. e Bowler, I.C.J., 1994. *Listeria ivanovii* infection. J. Infect., 29: 230-231.
- Littell, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.W. e Wolfinger, R.D., 1996. SAS® System for mixed models, Cary, NC: SAS Institute Inc., p.176.
- Lyver, A., Smith, J.P., Tarte, I., Farber, J.M. e Nattress, F.M., 1998. Challenge studies with *Listeria monocytogenes* in a value-added seafood product stored under modified atmospheres. Food Microbiology, 15: 379-389.
- McLauchlin, J., 1996. The relationship between *Listeria* and Listeriosis. Food Control, 7: 187-193.
- Mead, G.C. e Adams, B.W., 1977. A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads associated with poultry meat spoilage. British Poultry Science, 18: 661-70.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T. e Gibbs, P.A., 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. Food Microbiology, 21: 213-216.

- Miettinen, M.K., Björkroth, K. e Korkeala, H.J., 1999. Characterization of *Listeria monocytogenes* from ice cream plant by serotyping and pulsed field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiology*, 46: 187-192.
- Miettinen, M.K., Palmu, L., Björkroth, K.J. e Korkeala, H.J., 2001. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant and retail level. *J. Food Protection*, 64: 994-999.
- Nissen, H., Alvseike, O., Bredholt, S., Holck, A. e Nesbakken, T., 2000. Comparison between the growth of *Listeria enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. *Int. J. Food Microbiology*, 59: 211-220.
- Norma Portuguesa NP-2079 (1989). Microbiologia alimentar. Regras gerais para análise microbiológica. Instituto Português de Qualidade, Lisboa.
- Norma Portuguesa NP-3005 (1985). Microbiologia alimentar. Preparação das diluições para análise microbiológica. Instituto Português de Qualidade, Lisboa.
- Ojeniyi, B., Wegener, H., Jensen, N. e Bisngaard, M., 1996. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiology investigations in seven Danish abattoirs. *J. Appl. Bacteriol.*, 80: 395-401.
- Pin, C., Fernando, G.G., Ordóñez, J.A. e Baranyi, J., 2001. Applying a generalized z-value concept to quantify and compare the effect of environmental factors on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 18: 539-545.
- Regulamento (CE) Nº 2073/2005 (2005) da Comissão de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* L338, 26 p.
- Robinson, T., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J. e Mackey, B.M., 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiology*, 70: 163-173.
- Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Benos, G., François, K., Devlieghere, F. e Debevere, J., 2004. Evaluation of a challenge testing protocol to assess the stability of ready-to-eat cooked meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiology*, 90: 219-236.
- Windhorst, H., 2003. Patterns of EU poultry meat production and trade. *World Poultry Magazine on Production, Processing & Marketing*, 9 (19): 12-15.