



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ALIMENTOS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Fernanda Cunha Marques

Florianópolis – SC

2017

FERNANDA CUNHA MARQUES

Aplicação do método da Reação em Cadeia da Polimerase
quantitativa (qPCR) na identificação de *Weissella viridescens*

Orientadora: Gláucia Maria Falcão de Aragão

Coorientador: Wiaslan Figueiredo Martins

Florianópolis - SC

Este trabalho é dedicado aos meus pais Maria Marta da Cunha Marques e Jefferson Sabatini Marques.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao universo por ter me dado todas as condições necessárias para estar aqui nesse momento finalizando mais uma importante etapa de minha vida.

Quero agradecer também meus pais por terem me concedido o dom da vida, pois só assim tive o privilégio de ser Fernanda Cunha Marques e fazer parte da minha família, sendo filha de Maria Marta da Cunha Marques e de Jefferson Sabatini Marques, meus pais de coração e alma, que me deram todo suporte, amor, carinho e inclusive algumas broncas necessárias para que eu chegasse aqui e tivesse todo alicerce necessário para dar continuidade no caminho que eu escolhesse.

Sou muito grata a Universidade Federal de Santa Catarina que me proporcionou uma das melhores experiências da minha vida, me trazendo muito além de conhecimento de engenharia de alimentos, me trouxe uma visão maior do mundo. Dentro da UFSC tive também a oportunidade de trabalhar com a minha orientadora Professora Doutora Gláucia Maria Falcão de Aragão que abriu as portas deste projeto para que eu pudesse me aprofundar mais no assunto e realizar meu TCC, juntamente com meu incrível co-orientador Mestre Wiaslan Figueiredo Martins. Will gratidão por todos os ensinamentos, pela paciência para me ensinar cada etapa desse assunto, pelas dicas incríveis, por não ter desistido de mim e acreditado que conseguiríamos vencer esse desafio e também pelos puxões de orelha, eles fizeram diferença!

Meus grandes amigos que conquistei dentro dessa jornada, sou grata por cada momento que rimos, que choramos achando que não íamos nos formar nunca (AGORA VAI GENTE!), pelas noites de sono mal dormidas, pelas horas na BU fazendo e refazendo listas, pelas horas no bar podendo descontrair e curtir a vida e por terem também acreditado e me dado apoio quando eu precisei. Não sei mesmo o que seria sem vocês fazendo parte dessa loucura.

A lei da mente é implacável. O que você pensa, você cria. O que você sente, você atrai. O que você acredita torna-se realidade.

Budha

RESUMO

As Bactérias Ácido Lácticas (BAL) são um grupo microbiano deteriorante de produtos cárneos embalados a vácuo que podem causar o inchaço da embalagem e aparecimento de limo, dentre elas *Weissella viridescens* pode causar o esverdeamento na superfície do produto. Este trabalho tem como objetivo principal utilizar o método de *quantitative* PCR (qPCR) para identificação de *Weissella viridescens* em cultura pura. Ao longo desse trabalho foi desenvolvida uma metodologia para a identificação do DNA isolado de *W. viridescens*. Diluições seriadas do DNA foram utilizadas para amplificação por SYBR® Green qPCR e construção da curva padrão, correlacionando os valores de Ciclo *threshold* (Ct) *versus* log UFC/mL obtidos por contagem em placas. A curva padrão foi gerada com eficiência (E) de 1,12 e R² de 0,9979. O limite de detecção (LD) correspondeu a 3,7 log UFC/mL de *W. viridescens*, o que corresponde a 32,5 fg de DNA e um Ct de 26,75 ± 0,5. A especificidade da reação utilizando o corante de SYBR® Green I foi comprovada pela curva de *melting*, através da geração de apenas um pico de temperatura de *melting* (Tm) com o valor de 81,4 ± 0,08 °C. Assim, foi possível identificar *W. viridescens* em meio de cultivo na condição isotérmica de 30 °C utilizando o método de SYBR® Green qPCR. Espera-se, com este estudo, a definição das melhores condições para quantificação da biomassa de *W. viridescens*, em meio de cultura. Estes resultados servirão de base para estudos futuros do grupo de microbiologia preditiva, para identificação e quantificação de *W. viridescens* em produtos cárneos.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas, *Weissella viridescens*, deterioração, reação em cadeia da polimerase quantitativa, microbiologia preditiva.

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) are a deteriorating microbial group of vacuum-packed meat products that can cause packaging swelling and silting, among which *Weissella viridescens* can cause greening on the surface of the product. This work has as main objective to use the quantitative PCR (qPCR) method for identification of *Weissella viridescens* in pure culture. Throughout this work a methodology was developed for the identification of DNA isolated from *W. viridescens*. Serial DNA dilutions were used for amplification by SYBR® Green qPCR and construction of the standard curve, correlating the threshold Cycle (Ct) versus log CFU /mL values obtained by counting on plates. The standard curve was generated with efficiency (E) 1.12 and R² of 0.9979. The detection limit (DL) corresponded to 3.7 log CFU / mL of *W. viridescens*, corresponding to 32.5 fg of DNA and a Ct of 26.75 ± 0.5. The specificity of the reaction using the SYBR® Green dye was confirmed by the melting curve, by generating only a melting temperature peak (T_m) with a value of 81.4 ± 0.08 ° C. Thus, it was possible to identify *W. viridescens* in culture medium in the isothermal condition of 30°C using the SYBR® Green qPCR method. With this study, we hope to define the best conditions for the quantification of *W. viridescens* biomass in culture medium. These results will serve as a basis for future studies of the predictive microbiology group for the identification and quantification of *W. viridescens* in meat products.

Key-words: Lactic Acid Bacteria, *Weissella viridescens*, deterioration, quantitative chain polymerase reaction, predictive microbiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica das fases da qPCR.....	24
Figura 2. Aumento da fluorescência (ΔR_n) em relação ao número de ciclos de qPCR para as diluições em série de <i>W. viridescens</i>	30
Figura 3. Curva de <i>melting</i> . Fluorescência (dF/dT) em relação a temperatura de <i>melting</i> de cada ciclo para as diluições em série de <i>W. viridescens</i>	31
Figura 4. Curva padrão construída com os valores de C_t para as triplicatas de cada diluição seriada de DNA <i>versus</i> o respectivo valor de \log UFC/mL de <i>W. viridescens</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores usados para amplificação por SYBR® Green qPCR.....28

Tabela 2. Valores de Ciclo *threshold* (Ct) e Tm das reações de qPCR para as diluições decimais do DNA de *Weissella viridescens*.....34

LISTA DE ABREVIACÕES

ΔR_n - Aumento da fluorescência

A - Adenina

AM – Atmosfera modificada

a_w – Atividade de água

BAL – Bactérias ácido lácticas

C - Citosina

CT – *Cycle threshold* - Limiar da fase exponencial

dF/dT - Derivada da fluorescência sobre a derivada da temperatura

DNA – *Deoxyribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucleico

G- Guanina

LD – Limite de detecção

MRS – Meio de cultivo Man, Rugosa e Sharpe

pb – Pares de bases

PCR- *Polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase

qPCR – PCR em tempo real

RNA – *Ribonucleic acid*- Ácido ribonucleico

T- Timina

Taq - *Thermus aquaticus*

T_m - Temperatura de *melting*

UFC – Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

OBJETIVOS	13
Objetivo geral:.....	13
Objetivos específicos:	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA	16
2.2 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL).....	16
2.2.1 Weissella viridescens	18
2.3 DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS	19
2.4 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE BAL	21
3.5 METODOLOGIA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) QUANTITATIVA (qPCR)	22
3.5.1 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 MICRORGANISMO	26
3.2 PRÉ-INOCULO	26
3.3 PREPARO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	26
3.4 MÉTODO DE SYBR® Green PCR QUANTITATIVO (qPCR)	27
3.4.1 Isolamento do DNA microbiano	27
3.4.2 Quantificação e pureza do DNA	27
3.4.3 Iniciadores usados para o ensaio de SYBR® Green qPCR.....	27
3.4.4 Condições do qPCR	29
3.4.5 Curva Padrão	29
3.4.6 Análise das curvas de melting	29
4. RESULTADOS.....	30
5. CONCLUSÕES.....	37
6. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS	38
7. REFERÊNCIAS	39

JUSTIFICATIVA

As bactérias ácido-lácticas (BAL) estão entre os principais microrganismos deteriorantes de produtos cárneos, processados, curados e embalados a vácuo ou atmosfera modificada (AM) e armazenados a temperaturas de refrigeração. Algumas espécies, como *Weissella viridescens* (anteriormente denominada *Lactobacillus viridescens*) podem causar o esverdeamento na superfície de carnes. Em adição a estas alterações na cor da carne, *W. viridescens*, juntamente com outras BAL, está também relacionada com os processos de deterioração em numerosos produtos à base de carne, tais como a presença de limo, odores e sabores desagradáveis, perda de vácuo, descoloração e uma diminuição no pH.

Atualmente, a avaliação do crescimento microbiano em alimentos é realizada por métodos microbiológicos tradicionais, que apresentam algumas limitações como resultado tardio, baixa seletividade do meio de cultura e variabilidade da resposta biológica dos microrganismos. Na tentativa de contornar as deficiências apresentadas nos métodos tradicionais, o método da Reação em Cadeia da Polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) em tempo real ou quantitativa (qPCR) surge como método alternativo, por ser um método rápido, preciso e específico, reduzindo o tempo de análise.

Não há muitos estudos publicados na literatura sobre a quantificação da *Weissella viridescens* em produtos cárneos utilizando a metodologia de qPCR com a técnica SYBR® Green, o que justifica a realização desse trabalho. O uso dessa técnica permitirá também que, futuramente, sejam estudadas culturas mistas de bactérias lácticas, o que não é possível com os métodos tradicionais, como o plaqueamento.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer uma metodologia de PCR quantitativa (qPCR) para a quantificação de *Weissella viridescens* em meio de cultivo.

Objetivos específicos:

- Realizar o crescimento da cultura pura de *Weissella viridescens*, em meio de cultivo;
- Testar a especificidade de iniciadores selecionados na literatura para *Weissella viridescens*;
- Aperfeiçoar as condições do método de SYBR® Green qPCR para identificar *Weissella viridescens* em meio de cultivo;
- Elaborar curva padrão correlacionando os resultados do qPCR com a concentração celular em log UFC/mL, obtida por contagem em placa.

1. INTRODUÇÃO

As Bactérias ácido-lácticas (BAL) apresentam características morfológicas, fisiológicas, metabólicas e bioquímicas comuns, podendo ser classificadas como Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase negativa, apresentam-se na forma de cocos ou bacilos, microaerófilas e anaeróbicas facultativas (CARR et al., 2002; AXELSSON, 2004; MASSAGUER, 2006). Os principais gêneros são: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Weissella* (POFFO e SILVA, 2011). Dentre as BAL, o gênero *Weissella* foi primeiro descrito por Collins et al. (1993) que reclassificou as espécies *Leuconostoc paramesenteroides* e relacionou espécies como *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* e *Lactobacillus viridescens* dentro no novo gênero *Weissella* (GÓMEZ-ROJO et al. 2015).

Diversos estudos relatam as BAL como sendo os principais microrganismos deteriorantes de produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada (FADDA et al., 2008; NYCHAS et al., 2008 e LI et al., 2013). Para garantir a preservação destes produtos cárneos deve-se estudar os mecanismos de adaptação e deterioração microbiana.

Algumas espécies como o *Weissella viridescens* podem causar o esverdeamento na superfície de carnes. De acordo com Samelis et al. (2000), a atividade metabólica das BAL resulta no surgimento de deterioração como, azedamento, sabores e odores desagradáveis, presença de limo, perda de vácuo através da produção de gás carbônico e descoloração.

Para garantir uma melhor qualidade dos produtos cárneos, é necessário prever o crescimento dos microrganismos e determinar o grau de deterioração. De acordo com McMeekin e Ross (1996), podem-se usar métodos tradicionais de contagem em placas, porém, estes métodos são limitados, pois, requerem um longo tempo para obter resultados. Assim, uma alternativa a tais métodos é a aplicação da microbiologia preditiva, que envolve o desenvolvimento de modelos matemáticos a partir de conhecimentos sobre o comportamento de microrganismos, tornando-se uma ferramenta útil na previsão da vida útil, controle de qualidade e avaliações de risco (McMEEKIN et al., 2002).

De acordo com Gómez-Rojo et al. (2015), muitos métodos foram utilizados para identificar o gênero *Weissella* e suas espécies em produtos alimentícios. No entanto, a maioria dos métodos fenótipos baseados em características morfológicas, bioquímicas e

fisiológicas tem baixa resolução taxonômica e não fornece uma clara distinção entre espécies semelhantes de *Weissella*. Desta forma, os métodos moleculares como a qPCR podem ser utilizados para identificação de espécies do mesmo gênero, ou pertencentes ao mesmo grupo, como é o caso das BAL.

Em microbiologia de alimentos, a qPCR tem sido utilizada para detectar e quantificar sequências alvo de vários microrganismos (RAJKOVIC, 2006; MARTIN et al., 2006 e NORDSTROM et al., 2007). A metodologia da qPCR consiste em uma amplificação convencional de DNA, porém a detecção e monitoramento dos produtos de amplificação são feitos ao longo dos ciclos em tempo real, baseado na emissão e quantificação de um sinal fluorescente feito pelo reagente fluoróforo SYBR® Green, captado por um sistema óptico que é convertido em dados no *software* ligado ao aparelho (GINZINGER, 2002; MACKAY, 2004; McKILLIP e DRAKE, 2004 e NOVAIS e ALVES, 2004).

Desta forma, a metodologia de qPCR com o uso da técnica SYBR® Green apresenta uma excelente alternativa para identificar *Weissella viridescens* em meio de cultivo frente às técnicas convencionais de contagem em placas, como será abordada nesse estudo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão serão abordados alguns assuntos de interesse para este trabalho referentes à importância do estudo das BAL como deteriorantes de carnes e produtos cárneos, as técnicas de quantificação de BAL para construção das curvas de crescimento, tais como a PCR convencional e a qPCR, focando nas aplicações desta técnica na quantificação de *Weissella viridescens*.

2.1 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC tem desenvolvido trabalhos de pesquisa na área de Microbiologia Preditiva sob orientação da Profa. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão. Esta linha de pesquisa teve início em 2003 e envolve alunos de graduação e pós-graduação através de trabalhos de iniciação científica, dissertações e teses, sendo um grupo de pesquisa pioneiro nesta área em Santa Catarina. No grupo, foram defendidas até o momento nove dissertações de mestrado e seis teses de doutorado.

As BAL são importantes no estudo da deterioração de carnes e produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada, o que justifica o interesse do grupo de pesquisa na modelagem do crescimento destas bactérias com cinco dissertações de mestrado e quatro teses de doutorado defendidas até o momento, relacionadas com este tema. Alguns destes trabalhos avaliaram a modelagem matemática do crescimento de BAL em cultura pura e mista, sob condições isotérmicas e não isotérmicas, em meio de cultura e em produtos cárneos. No entanto, ainda não há na literatura trabalhos com a quantificação da *W. viridescens* em produtos cárneos utilizando o método SYBR® Green qPCR. Esses dados podem servir como base para futuros estudos do grupo como ferramenta auxiliar, para construção de curvas de crescimento em microbiologia preditiva, o que justifica a realização desse trabalho.

2.2 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL)

As BAL estão presentes em pequenas quantidades na microbiota inicial de alimentos, como carnes, vegetais, leite, produtos lácteos, molhos para saladas, frutos do mar, entre outros. Também estão presentes no trato oral e gastrointestinal dos seres

humanos e animais (HAMMES e VOGEL, 1995; SLONGO et al., 2009 e DOULGERAKI et al., 2010).

De acordo com Wessels et al. (2004), as BAL podem ser usadas em uma extensiva variedade de aplicações nos produtos alimentícios. O estudo da fisiologia das BAL é importante para promover um entendimento mais amplo dos mecanismos de adaptação empregados por estes microrganismos (POFFO e SILVA 2011).

Taxonomicamente, o termo BAL denota um diverso grupo de bactérias que compartilham as seguintes características: Gram-positivas, geralmente, não móveis, não formadoras de esporos, toleram com facilidade baixos valores de pH, catalase negativas e oxidase negativas. Apresentam-se na forma de cocos ou bacilos, microaerófilas e anaeróbicas facultativas. São geralmente mesófilas, pois tem a temperatura ótima de crescimento entre 30 °C e 35 °C, no entanto, conseguem se desenvolver numa ampla faixa de temperatura entre 5 °C e 45 °C. São produtoras de ácido láctico, podendo ser classificadas como homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com o produto final da fermentação que é originado (HUGENHOLTZ, 1998; CARR, 2002; AXELSSON, 2004 e POFFO e SILVA, 2011).

Os gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Pediococcus* são homofermentativas e os gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* e *Lactosphaera* são heterofermentativas. As bactérias homofermentativas produzem ácido láctico como produto final da fermentação, já as heterofermentativas produzem ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético e etanol, com isso, são responsáveis pelo desenvolvimento da acidez dos produtos e também pelo aparecimento de aromas e sabores específicos (POT et al., 1994; HAMMES e VOGUEL, 1995; LYHS, 2002; JAY, 2005 e MASSAGUER, 2006;).

As BAL são de grande importância para os produtos cárneos refrigerados, embalados a vácuo ou em atmosfera modificada, sendo consideradas como microrganismos específicos de deterioração destes alimentos. Segundo Hugas (1998), as BAL em produtos cárneos constituem uma parte da microbiota inicial (JAY, 1996; STILES, 1996; SAMELIS et al., 2000 e FADDA et al., 2008). Sob condições anaeróbicas, as BAL podem provocar modificações nos produtos cárneos, como o aumento da acidez, com exsudatos viscosos, promovendo a perda da coloração e, com a produção de gás, podendo ainda provocar inchamento na embalagem (DEVLIEGHERE et al., 1998; CAYRÉ et al., 2005).

Dentre as BAL, pode-se destacar o interesse no estudo do gênero *Weissella* que se apresenta como um dos principais deteriorantes de carnes e produtos cárneos. Suas espécies podem gerar o aparecimento de cor esverdeada no produto, perda de vácuo em produtos embalados, presença de limo, cheiros e sabores desagradáveis e decaimento do pH (JAY, 2000; BJÖRKROTH e HOLZAPFEL, 2006 e COMI et al., 2007).

2.2.1 *Weissella viridescens*

O gênero *Weissella* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales e à família Leuconostocaceae. Nesse gênero, suas espécies são não formadoras de esporos, gram-positivas, catalase-negativo, heterofermentativas obrigatórias e anaeróbias facultativas. Podem produzir D ou DL isômeros de ácido láctico como produtos finais da fermentação e com uma temperatura de crescimento que varia entre 15 °C e 45 °C (NIVEN e EVANS, 1957; COLLINS et al., 1993 e BJÖRKROTH E HOLZAPFEL, 2006).

As bactérias do gênero *Weissella* habitam uma variedade de nichos ecológicos, sendo obtidos isolados de várias fontes, como vegetais frescos, caldos de cana, suco de cenoura, leite cru, linguiças fermentadas, mel, arroz, cacau, peixes; em diferentes ambientes, como em silagens fermentadas e do solo (HOLZAPFEL e VAN WYK, 1982; MILBOURNE, 1983; KANDLER et al., 1983; GREEN et al., 1990; COLLINS et al., 1993; HAMMES e VOGEL, 1995; WALTER et al., 2001; MAGNUSSON et al., 2002; ENNAHAR et al., 2003; SANTOS et al., 2005; KOORT et al., 2006; WANG e NISHINNO, 2008; GONZÁLEZ-QUIJANO et al., 2014 e HAN et al., 2014).

Com base nas sequências rRNA 16S, existem 19 espécies de *Weissella*: *Weissella beninensis*, *Weissella ceti*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Weissella diestrammenae*, *Weissella fabalis*, *Weissella fabaria*, *Weissella ghanensis*, *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica*, *Weissella kandleri*, *Weissella koreensis*, *Weissella minor*, *Weissella oryzae*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella soli*, *Weissella thailandensis*, *Weissella uvarum* e *Weissella viridescens* (GARVIE, 1967; NIVEN e EVANS, 1957; COLLINS et al., 1993; TANASUPAWAT et al., 2000; TANASUPAWAT et al., 2000; CHOI et al., 2002; BJÖRKROTH et al., 2002; LEE et al., 2002; MAGNUSSON et al., 2002; DE BRUYNE et al., 2008; PADONOU et al., 2010; DE BRUYNE et al., 2010; VELA et al., 2011; OH et al., 2013; SNAUWAERT et al., 2013; TOHNO et al., 2013 e NISIOTOU et al., 2014).

Dentre as BAL, Collins et al. (1993) foi o primeiro a descrever a bactéria *W. viridescens*, que era anteriormente conhecida como *Lactobacillus viridescens*. Essa bactéria, apesar de exercer uma influência positiva na preparação de produtos fermentados, tem sido associada com a deterioração de produtos cárneos, tais como o surgimento de manchas esverdeadas na superfície dos produtos. Isso se deve à sua habilidade de produzir H_2O_2 , que reage com o pigmento hemoglobina da carne para formar sulfomioglobina (NIVEN e EVANS, 1957; JAY, 2000; PEIRSON et al., 2003; SCHILLINGER et al., 2006; COMI et al., 2007 e GÓMEZ-ROJO et al., 2015).

Além disso, *W. viridescens* juntamente com outras BAL provocam outras deteriorações em produtos cárneos, como presença de limo, cheiros desagradáveis, perda de vácuo em produtos embalados, descoloração e acidificação do pH (SAMELIS et al., 2000; BJÖRKROTH e HOLZAPFEL, 2006 e COMI e IACUMIN, 2012).

Gómez-Rojo et al. (2015) relataram que *W. viridescens* foi encontrado em *morcilla de burgos*, um embutido a base de sangue de porco, cebola, gordura animal, arroz, sal e uma combinação de diferentes especiarias, que pode ser vendido embalado a vácuo ou fresco. Albano et al. (2009) identificaram 14 espécies de BAL, sendo uma delas a *W. viridescens* no produto Alheira, uma linguiça fermentada típica da região norte de Portugal, que pode ser vendida fresca ou embalada com atmosfera modificada. Outro estudo que relatou a presença de *W. viridescens* foi o de Samelis et al. (2000), que encontraram esta bactéria em lombo suíno defumado embalado a vácuo, bacon, mortadela, assim como em salsichas embaladas a vácuo sob refrigeração.

2.3 DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

A carne fresca é um produto altamente perecível, pois sua carcaça é exposta ao ambiente externo logo após a remoção da pele que constituía uma barreira natural. O alto conteúdo de água ($a_w > 0,99$), pH próximo da neutralidade (5,5-6,5) e vários nutrientes e vitaminas disponíveis fazem com que a carne seja um ambiente ideal para o desenvolvimento microbiano e tenha uma vida útil muito curta (BORCH et al., 1996; BUNCIC et al., 2014 e POTHAKOS et al., 2015).

A indústria de alimentos no setor cárneo vem investindo no desenvolvimento de novos produtos que atendam à demanda de produtos de fácil preparo e que sejam saudáveis, como presuntos cozido fatiado, presunto defumado, peito de peru fatiado, mortadelas, entre outros. A vida útil destes produtos é limitada principalmente pelo

fator microbiológico de segurança e degradação. Mesmo após o tratamento térmico em que são submetidos, estes produtos com alta atividade de água, em torno de 0,945, e um pH próximo da neutralidade serão expostos à um ambiente não estéril pelos manipuladores, podendo ser contaminados na etapa de corte e embalagem (HU et al., 2009 e VERCAMMEN, 2011).

Alguns autores, como Borch et al. (1996), Korkeala e Bjorkroth (1997) e Samelis et al. (2000) afirmaram que as BAL são o maior grupo de bactérias associado com a deterioração de carnes cozidas e produtos cárneos embalados a vácuo e estocados em temperaturas de refrigeração, pois toleram baixos valores de pH, presença de NaCl e sais de cura que são comumente encontrados nestes produtos (HUGAS, 1998; CAYRE et al., 2005 e CAYRE et al., 2003).

A microbiota natural das carnes e produtos cárneos que são, geralmente, embalados a vácuo ou em atmosfera modificada, é composta por *Lactobacillus* spp., geralmente, *L. plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus*, *Leuconostoc* spp., como *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum* e *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella viridescens* e *Carnobacterium divergens* e *Carnobacterium maltaromicus* (BORCH et al., 1996; GUERRERO e CHABELA, 2000 e VERMEIREN et al., 2004).

Quando a carne é embalada a vácuo ou é usada uma atmosfera modificada com mais de 20% de CO₂, o crescimento de *Pseudomonas* spp. é suprimido. Sob estas condições, as BAL (*Lactobacillus*, *Carnobacterium* e *Leuconostoc*) crescem mais rapidamente e são, frequentemente, os únicos microrganismos detectáveis durante a armazenagem refrigerada de produtos em atmosfera modificada (FADDA et al., 2008 e MANTILLA et al., 2010).

Stahl et al. (2015) em seu estudo para avaliar a cor, textura, atividade de água, umidade e exsudato de presunto cozido e patê de presunto, armazenados à 8°C por 6 semanas, identificaram as BAL *Lactobacillus sakei* e *Leuconostoc mesenteroides*. Outro estudo realizado por Chenoll et al. (2007), identificaram a presença de *Leuconostoc mesenteroides* como sendo a principal BAL deteriorante dos produtos cárneos *morcilla de burgos* e fiambre de magro adobado, ambos típicos da Espanha.

A deterioração da carne e produtos cárneos durante o processamento, distribuição, armazenamento e venda para o consumidor é um assunto de grande interesse na literatura, pois pode levar a grandes perdas econômicas para a indústria de alimentos. Diante disso, torna-se importante desenvolver técnicas de preservação para

umentar a vida útil dos produtos, eliminando ou retardando o crescimento de microrganismos.

2.4 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE BAL

Existem diferentes métodos para quantificar o crescimento microbiano, sendo eles: Contagem de células totais, Contagem de células viáveis, Massa de células, Turbidimetria, Número Mais Provável (NMP) e o mais utilizado Contagem em placas (VASAVADA et al., 1993).

O método de contagem de microrganismos em placas é um método geral, que pode ser utilizado para contagem de grandes grupos microbianos, como aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos, termófilos, bolores e leveduras, variando-se o tipo de meio, a temperatura e o tempo de incubação (SILVA et al., 1997 e HAJDENWURCEL, 1998). Para Franco e Landgraf (1996), essa metodologia é, certamente, a mais utilizada nos laboratórios de análise de alimentos, pois diferentes grupos de microrganismos podem ser enumerados de acordo com o meio de cultura e/ou as condições de incubação (tempo, temperatura e atmosfera) empregadas.

Por esse método, de acordo com Jay (1998) e Swanson et al. (1992), amostras de alimentos são homogeneizadas, diluídas em série, em diluente apropriado, plaqueadas com ou sobre um meio de ágar apropriado e incubadas, após que todas as colônias visíveis são contadas, ou seja, o procedimento se baseia na premissa de que cada célula microbiana presente em uma amostra irá formar uma colônia separada e visível, quando fixada com meio que lhe permita crescer.

As técnicas microbiológicas tradicionais utilizam meios de cultura, seletivos e não seletivos, de enriquecimento para amostras contendo baixo número de células, complementados por testes bioquímicos. Segundo Farber et al. (2001), os testes bioquímicos utilizados para identificação e tipagem bacteriana podem apresentar variabilidade devido à fatores ambientais sobre a expressão gênica, apresentando outras desvantagens, como o baixo poder discriminatório em microrganismos com pouca variabilidade genética e o risco de interpretações errôneas, quando se utiliza um número limitado de testes. Esses métodos tradicionais de detecção de microrganismos, embora sejam confiáveis, requerem vários dias ou mesmo semanas para que os resultados sejam obtidos (MARIN et al., 2006).

Para Farber et al. (2001), as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas, e os resultados podem ser suscetíveis à variação de interpretação, além da possibilidade de existência de células viáveis, porém não cultiváveis. Além disso, os métodos tradicionais apresentam desvantagens na quantificação dos microrganismos, devido a não homogeneização das colônias em meio de cultura, o que leva a sobreposição das células. Esses métodos são mais trabalhosos, visto que utilizam uma grande quantidade de vidrarias e equipamentos, aumentando a necessidade de espaço para o cultivo em estufas de incubação (JAY e HALL, 1992), caso queira aumentar a confiabilidade das análises.

O método clássico de identificação de BAL segue o protocolo que envolve cultivo seguido de caracterização fenotípica. Está disponível uma série de meios de cultura para o isolamento de BAL, com morfologia de cocos utiliza-se o ágar M17, e para as BAL com morfologia de bastões utiliza-se o MRS (Man, Rugosa e Sharpe) (CARVALHO, 2007; HASSAN e FRANK, 2001 e BRUNO, 2011 e).

A utilização de apenas testes fenotípicos para a identificação de BAL pode gerar maus resultados, uma vez que a identificação de cepas da mesma espécie é muito difícil dada a sua proximidade morfológica e genética. Uma alternativa para a identificação e caracterização é o uso de métodos moleculares que são mais rápidos, consistes e reprodutíveis, possuindo grande eficiência para diferenciar espécies muito próximas (AMMOR, 2005 e SINGH et al., 2009).

Diversos métodos moleculares têm sido desenvolvidos para identificar, classificar e quantificar de forma mais confiável os microrganismos. Dentre eles, o uso do método de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) tem sido empregado para confirmar a identificação bioquímica de BAL (BRUNO, 2011).

3.5 METODOLOGIA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) QUANTITATIVA (qPCR)

Técnicas tradicionais para a detecção de BAL, em particular *W. viridescens*, baseadas em métodos fenotípicos e genotípicos vêm sendo amplamente estudadas e utilizadas. Porém, são métodos que exigem muito trabalho laboratorial, são difíceis de padronizar e podem consumir de 8 a 10 dias para obter-se resultados, os quais apresentam uma baixa resolução taxonômica, não fornecendo uma clara distinção entre as espécies semelhantes de *W. viridescens*. Por isso, estão surgindo mais trabalhos na

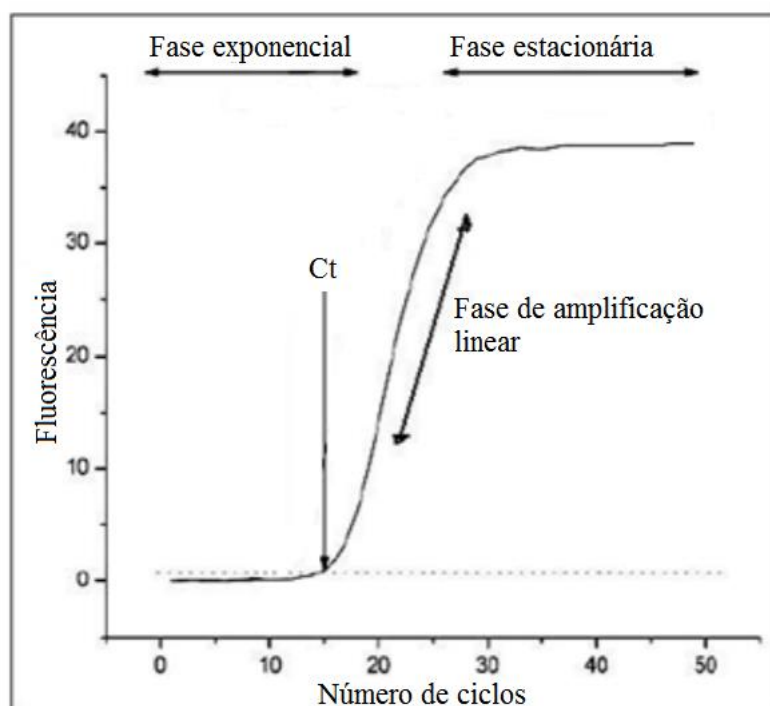
literatura utilizando as metodologias moleculares, como a PCR e a qPCR. Esses métodos oferecem a vantagem de serem rápidos, com alta especificidade e eficientes, podendo identificar e quantificar sequência de ácidos nucleicos em pequenas amostras de alimentos (SHAW e HARDING, 1984; SCHILLINGER 1987; MONTEL et al., 1991; HUGAS et al., 1993; TSAKALIDOU et al., 1997; SAMELIS et al., 1998; BJÖRKROTH et al., 2002; AYMERICH et al., 2003; SANTOS et al., 2005; BJÖRKROTH e HOLZAPFEL, 2006; SCHILLINGER et al., 2008; MARTÍNEZ et al., 2011 e HERBEL et al., 2013).

3.5.1 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

A qPCR surgiu devido à necessidade de monitorar simultaneamente a quantidade e qualidade do DNA amplificado, baseando-se na amplificação de uma sequência específica de DNA inúmeras vezes, utilizando a combinação da técnica de PCR convencional com um método de detecção e quantificação do DNA microbiano por fluorescência. Nesse sistema, a amplificação e a detecção são realizadas simultaneamente em um sistema fechado. Além dos iniciadores, o sistema inclui a utilização de fluoróforos. O monitoramento da técnica de qPCR ocorre em tempo real e os dados são recolhidos ao longo de toda a reação (MARTÍNEZ et al., 2011).

O procedimento da técnica da qPCR segue o princípio geral da PCR convencional, apresentando três fases: a fase de amplificação exponencial, fase de amplificação linear e fase estacionária (Figura 1). A primeira fase é bastante específica e precisa. Os produtos da reação são consumidos durante a fase de amplificação linear e inicia-se o processo de degradação. A fase estacionária refere-se ao final da análise devido ao elevado nível de degradação dos produtos da PCR. Os compostos fluorescentes adicionados ao DNA geram um sinal de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado ao longo das diferentes fases (KUBISTA et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2011).

Figura 1. Representação gráfica das fases da qPCR (adaptado de Kubista et al., 2006).



A fase de amplificação exponencial é considerada a melhor para se estudar os produtos da reação devido à elevada eficiência registada de aproximadamente 100 %, é nesta fase que a relação entre a quantidade de produto e do *input* de DNA é, provavelmente, mais consistente permitindo uma quantificação mais precisa do que a do final da reação (HEID et al., 1996; OLIVEIRA, 2009 e STRACHAN, 2013).

Há um ponto durante a fase exponencial em que a fluorescência começa a ser detectada definida pelo *software* da qPCR (Figura 1). Este ponto, chamado de Ct (*cycle threshold*) corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável. Quanto menor o número de ciclos necessários para se detectar fluorescência acima da linha de base, que corresponde ao limiar mínimo de detecção de fluorescência do instrumento sendo considerado ‘ruído de fundo’ do equipamento, maior é o número de moléculas iniciais que se introduziu na reação de amplificação de PCR (NICKLAS e BUEL, 2003 e KUBISTA et al., 2006).

Após a amplificação do DNA, é necessário quantificá-lo. Para analisar quantitativamente os resultados obtidos da qPCR, usa-se uma curva padrão. Para tal, o valor de Ct (de uma dada amostra de concentração desconhecida) é projetado num gráfico Ct em função do logaritmo da concentração de DNA, onde está representada a

curva padrão, e a partir da qual pode-se obter a concentração de DNA da amostra em questão (PELT-VERKUIL et al., 2008).

Para cada etapa existe uma temperatura ideal, na qual o desempenho da reação é máximo. Esta é a temperatura *de melting* (T_m), ou temperatura de pareamento, na qual metade das moléculas estão pareadas e a outra metade não. A T_m depende da composição do DNA e está diretamente relacionada com o conteúdo de Guanina+Citosina do mesmo. Já que cada fragmento tem um tamanho e composição específica, eles podem ser identificados através da análise da curva de *melting* (DELIDOW et al., 1993; CORREIA, 2007; MACKAY et al., 2007 e BECKER et al., 2013).

Os métodos de fluorescência utilizados na qPCR são baseados no uso de fluoróforos, que são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico (MACKAY et al., 2007; PELT-VERKUIL et al., 2008). Existem diversos tipos de compostos fluorescentes, o mais utilizado é o SYBR® Green (LOGAN e EDWARDS, 2009), que apresenta vantagens, como baixo custo, facilidade na utilização e alta sensibilidade (MACKAY et al., 2007). No início do processo a fluorescência é reduzida, visto que as moléculas SYBR® Green livres não estão ligadas ao DNA de dupla cadeia. Após a detecção dos iniciadores, quantidades crescentes dos fluoróforos ligam-se à dupla cadeia de DNA pré-sintetizada pela enzima *Taq* DNA polimerase. No fim da fase de extensão de cada ciclo, a fluorescência é monitorizada e quantificada e, conseqüentemente o DNA amplificado é determinado (MACKAY et al., 2007 e OLIVEIRA, 2010).

Esta técnica tem sido utilizada para identificar espécies de BAL em diversos produtos, como em salsichas de baixa acidez e linguiças fermentadas e também para quantificar determinadas espécies em amostras de alimentos como *L. helveticus* e *L. reuteri* em iogurte, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *L. johnsonii* em outros produtos lácteos fermentados e, *Lactobacillus sakei* e *W. viridescens* em produtos cárneos (COEURET et al., 2003; FURET et al., 2004 ; HERBEL et al., 2013 e GÓMEZ-ROJO, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

W. viridescens (ATCC 12706; CCT 5843) usada nesse estudo é uma cepa referência da *American Type Culture Collection*, e foi adquirida na forma liofilizada da coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello, em Campinas, Brasil. A cepa foi reidratada em um caldo baseado nas formulações de deMan, Rogosa e Sharpe (MRS) (De Man et al., 1960) (Acumedia Manufactures, Inc., Lansing, Michigan, USA), em seguida foi armazenada em tubos de *Eppendorf* com caldo MRS contendo 20% (v/v) de glicerol a -24 °C até o seu uso.

3.2 PRÉ-INOCULO

Para o preparo do pré-inóculo, *W. viridescens* foi reativada em 160 mL de caldo MRS a 30 °C por 18 horas. Em seguida, foi preparada a diluição de 10 vezes (1:10), e medida em espectrofotômetro com 600 nm de comprimento de onda ($A_{600nm} = 0,380$) em cubetas de vidro. Esse valor de absorbância corresponde à fase estacionária, como descrito por Dalcanton (2010).

3.3 PREPARO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O experimento foi realizado em duplicata em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 320 mL de caldo MRS e pré-inóculo (1%, v/v) de *W. viridescens*, correspondendo a concentração inicial de, aproximadamente, 1×10^3 UFC/mL. O crescimento foi avaliado a temperatura isotérmica de 30 °C. A temperatura foi registrada a cada 1 minuto por mini *data loggers* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha), sendo conduzidos até a fase estacionária de crescimento.

3.4 MÉTODO DE SYBR® Green PCR QUANTITATIVO (qPCR)

3.4.1 Isolamento do DNA microbiano

O DNA usado para o método de qPCR foi extraído de 2 mL de uma cultura de células, usando o kit de isolamento de DNA Microbiano UltraClean™ da MO BIO Laboratories (Carlsbad, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante para Bactérias Gram-positivas. O processo foi efetuado de acordo com o manual de instruções do kit UltraClean™ (Manual de instruções UltraClean™) com as seguintes modificações: A homogeneização e a solução tampão nos tubos *MicroBeads* foram aquecidas a 65 °C por 10 min e fracionadas com eluição de solução estéril de 50 µL (fornecida no kit).

3.4.2 Quantificação e pureza do DNA

O DNA foi quantificado utilizando um espectrofotômetro *Thermo Scientific NanoDrop* 1000. A pureza do DNA foi avaliada baseada na razão de absorbância a 260 e 280 nm, conforme descrito por Nanodrop (2007).

3.4.3 Iniciadores usados para o ensaio de SYBR® Green qPCR

Para a detecção da *W. viridescens*, iniciadores utilizados no trabalho de Gómez-Rojo et al. (2015) foram usados empregando gene alvo *recN* (*GenBank* número de acesso: AM698022.1) (Tabela 1).

Os iniciadores WvrecN-F e WvrecN-R foram sintetizados pela empresa Síntese Biotecnologia Ltda (Belo Horizonte, MG, Brasil). Todos os iniciadores foram sintetizados em uma escala de 25 nmol dessanilizados.

Tabela 1 Iniciadores usados para amplificação por SYBR® Green qPCR.

Cepa de interesse	Gene	Nome do iniciador ^a	Sequencia (5'-3')	T _m (°C) ^b	Comprimento do Amplicão (pb)	Posição	Referência
<i>W. viridescens</i>	<i>recN</i>	WvrecN-F	CGCAAACACAACAAGCCTAT	82	20	908-927	Gómez-Rojo et al. (2015)
		WvrecN-R	TGTTGAGCAAGTTCCAAAGC		20	998-979	

^aO iniciador é nomeado de acordo com o gene de interesse, e F e R no fim de cada iniciador indica a orientação 'para frente' (*forward*) e 'para trás' (*reverse*) respectivamente.

^bA temperatura teórica de *melting* (*T_m*) dos fragmentos de qPCR foi determinada usando o *Melting Curve Predictions Software* v2.0.2 (uMeltSM, University of Utah, USA). (<https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html>).

3.4.4 Condições do qPCR

O método de qPCR foi executado no equipamento Real Time Rotor-Gene Q® (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) usando o kit Rotor-Gene SYBR® Green PCR (Qiagen, Hilden, Germany). As condições de ciclagem para a identificação de *W. viridescens* foram aplicadas assim como descritas por Gómez-Rojo et al. (2015). A técnica otimizada de SYBR® Green qPCR foi realizada com um volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de 2 × Rotor-Gene SYBR® Green Master Mix, 300 nM de iniciadores WvrecN-F/R e 2 µL de DNA molde. Água livre de RNase foi adicionada para se obter um volume final de 25 µL. Todas as reações foram executadas em triplicatas sob as seguintes condições de ciclagem: 5 min a 95 °C, seguida por 45 ciclos por 1 min a 95 °C, 30 s a 64 °C, 30 s a 72 °C e uma fase final de extensão feita por 10 min a 72 °C. Em todas as reações feitas nesse estudo, cada rotor incluía uma reação realizada com água livre de DNases como um controle negativo.

3.4.5 Curva Padrão

A curva padrão foi construída para *W. viridescens* utilizando-se valores padrões obtidos por uma série de dez diluições do DNA extraído da fase estacionária de crescimento (aproximadamente 1×10^9 a 1×10^3 UFC/mL). Essas diluições foram testadas em triplicata e usadas como quantificação para construir a curva padrão, plotando o número de log UFC/mL obtido por contagem em placas pelo valor de ciclos *threshold* (Ct). O *threshold* foi determinado usando a função *Auto-Find Threshold* do Rotor-Gene Q, que ajusta uma faixa de níveis de limites para obter o melhor resultado de curva padrão usando as amostras que foram definidas como padrão. A eficiência foi determinada pela equação $E = [10^{(-1/S)} - 1]$, em que, E é a eficiência e S (*slope*) é o coeficiente angular da reta gerada na curva padrão. Segundo Thermo Fisher Scientific (2016), o valor obtido do slope pode variar de 80 a 100%.

3.4.6 Análise das curvas de *melting*

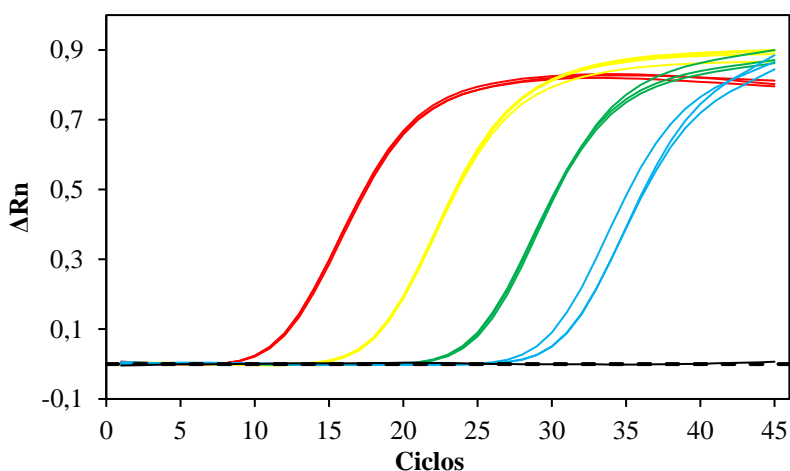
Para confirmar a eficiência e a sensibilidade do ensaio utilizando o SYBR® Green, foi realizada uma análise da curva de *melting* para verificar a especificidade da

ampliação da reação durante o processo de qPCR. Após a amplificação completa do qPCR, uma análise de *melting* foi realizada partindo de 65 °C para 95 °C a acréscimos de 0,5 °C/s. Picos de *melting* foram visualizados plotando a primeira derivada pela temperatura de *melting*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gráfico típico de amplificação (fluorescência *versus* ciclos de qPCR) construído a partir dos valores de fluorescência gerados para a quantificação de *W. viridescens* está apresentado na Figura 2. A curva foi construída a partir da diluição em série do DNA extraído da fase estacionária de crescimento (32,5 ng), em que ΔRn representa a normalização de Rn (intensidade de emissão de fluorescência do corante repórter SYBR® Green). A alta qualidade do DNA foi obtida de *W. viridescens* com uma relação A_{260}/A_{280} média de $1,87 \pm 0,13$. De acordo com Wilfinger et al. (1997) a razão = 1,8 é considerado puro para DNA.

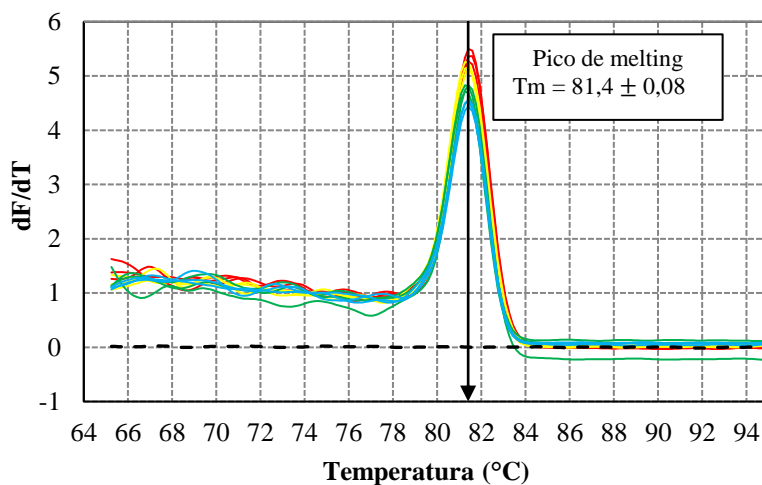
Figura 2 Aumento da fluorescência (ΔRn) em relação ao número de ciclos de qPCR para as diluições em série de *W. viridescens*, correspondente a (—) $4,2 \times 10^9$, (—) $4,2 \times 10^7$, (—) $4,2 \times 10^5$, (—) $4,2 \times 10^3$ UFC por reação, (—) controle negativo e (---) *threshold*.



No presente trabalho, apenas as amostras contendo DNA da *W. viridescens* foram amplificadas, o controle negativo, que continha apenas água livre de DNases, permaneceu na faixa do *threshold* sem amplificação.

A especificidade da reação de SYBR® Green qPCR foi testada pela análise da Temperatura de *melting* (T_m). As curvas de *melting* foram convertidas em picos de *melting*, traçando a derivada da fluorescência pela derivada da temperatura (dF/dT) *versus* a temperatura (°C) (Figura 3).

Figura 3 Curva de melting. Fluorescência (dF/dT) em relação a temperatura de melting de cada ciclo para as diluições em série de *W. viridescens*, correspondente a (—) $4,2 \times 10^9$, (—) $4,2 \times 10^7$, (—) $4,2 \times 10^5$, (—) $4,2 \times 10^3$ UFC por reação, (—) controle negativo e (---) *threshold*.



O pico de cada curva representa a temperatura de *melting* (T_m) (média \pm desvio padrão) igual a $81,4 \pm 0,08$ °C, confirmando a especificidade do método de SYBR® Green qPCR, com a obtenção de apenas um pico de *melting*, provando que não há formação de dímeros de iniciadores ou produtos não específicos (Figura 3). A T_m teórica calculada pelo *software* uMelt® para o produto de 91 pb do gene *recN* foi de 82 °C (BLACKKE e DELCOURT 1998), próximo ao encontrado neste trabalho. A T_m de um produto gerado pelas reações de qPCR depende de muitos fatores, como o tamanho do produto, composição da sequência e sua estrutura secundária (DWIGHT e WITWER, 2011). Segundo Herrmann et al. (2007), pode haver uma diferença de 0,5 a 1 °C entre a T_m encontrada em estudos utilizando o método da qPCR com o uso da técnica SYBR® Green, no presente estudo encontrou-se uma diferença de apenas 0,08°C.

Queipo-Ortuño et al. (2005), em estudo do crescimento da bactéria Gram-negativa *Brucella* através da técnica de SYBR® Green verificaram que a curva de *melting* gerou maior validação para a rotina de qPCR realizada, dado que houve formação de apenas um pico de *melting* (T_m igual a $88,16 \pm 0,05$ °C), formando apenas o produto de interesse dessa reação. Oliveira et al. (2005) fez o uso da técnica SYBR® Green qPCR para detectar a bactéria *Campylobacter jejuni* em pele de frango natural e artificialmente contaminada, utilizando a análise da curva de *melting* para provar a especificidade desta técnica. Os autores constaram que as amostras positivas possuíam T_m média de 81°C enquanto que os produtos não desejáveis possuíam T_m de 77,5°C,

comprovando que a análise de *melting* é uma ótima ferramenta para provar a especificidade da técnica de SYBR® Green. Christine Achilleos e Françoise Berthier (2013) quantificaram *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactococcus lactis* em amostras de queijo pelo método da qPCR com a utilização do corante SYBR® Green. A especificidade do método foi avaliada a partir da análise da T_m dos produtos gerados, produzindo um único pico com valor único da T_m , enquanto não houve produção de outros picos para os controles negativos.

Não foram encontrados trabalhos na literatura com o uso do método de SYBR® Green qPCR para a identificação e quantificação de *W. viridescens* pela análise da curva de *melting*. Gomez-Rojo et al. (2015) utilizou a técnica da sonda TaqMan® para quantificação e identificação da *W. viridescens* em *morcilla de burgos*. Houve somente amplificação dos produtos desejados utilizando o iniciador e a sonda. No entanto, o uso da técnica de SYBR® Green para rotinas de qPCR se torna mais viável por ser mais barata frente a outros métodos como a sonda TaqMan®.

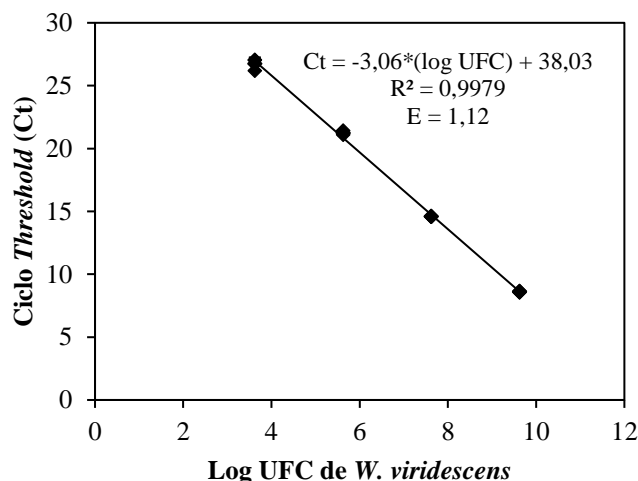
A partir desses resultados, propôs-se uma rotina de SYBR® Green qPCR para identificar *W. viridescens* em caldo MRS incubado a 30 °C. O uso da técnica de SYBR® Green quando comparada ao uso de sondas pode fornecer resultados mais rápidos, eficientes e específicos. Neste trabalho foi possível identificar e garantir a especificidade do método de SYBR® Green qPCR através da análise da T_m ($81,4 \pm 0,08$ °C).

A curva padrão foi obtida das diluições seriadas do DNA bacteriano extraído do cultivo de *W. viridescens* na fase estacionária de crescimento realizadas em triplicata. As concentrações variaram de $4,2 \times 10^9$ a $4,2 \times 10^3$ UFC/mL obtidas por contagem em placa, equivalentes às massas de 32,5 a $32,5 \times 10^{-6}$ ng.

A concentração de $4,2 \times 10^7$ UFC/mL obtida por contagem em placa de *W. viridescens* gerou um valor de C_t de médio de $14,59 \pm 0,04$ (Tabela 1). Esses valores corroboram com os encontrados no trabalho de Gómez-Rojo et al. (2015), em que obtiveram uma concentração de 10^7 UFC/mL, correspondendo a um C_t médio de $15,4 \pm 0,6$ para quantificação de *W. viridescens* CETC 284™ em meio de cultivo através do uso da sonda TaqMan®. A partir desses resultados, pode-se destacar a importância do uso da técnica de SYBR® Green como alternativa ao uso de sondas, por apresentar resultados semelhantes.

A curva padrão apresentou um valor de inclinação de -3,06, próximo do valor teórico ótimo de -3,32 (RODRÍGUEZ-LÁZARO e HERNÁNDEZ, 2013) e coeficiente de correlação $R^2 > 0,99$ e uma eficiência $E=1,12$ (Figura 4).

Figura 4 Curva padrão construída plotando os valores de Ct para as triplicatas de cada diluição seriada de DNA com o respectivo valor de log UFC/mL de *W. viridescens*.



O limite de detecção (LD) é definido como a quantidade mínima de DNA ou UFC detectáveis em uma única reação (GÓMEZ-ROJO et al., 2015). O LD para identificação de *W. viridescens* foi calculado como a quantidade de UFC/mL, de acordo com a curva padrão correspondente à menor diluição em que um sinal de fluorescência é detectado para as amostras testadas. O LD correspondeu a 3,7 log UFC de *W. viridescens*, o que corresponde a 32,5 fg de DNA e um Ct (média \pm desvio padrão) de $26,75 \pm 0,5$ (Tabela 1). Gomez-Rojo (2015) encontrou LD de 40 UFC/reação (1,6 log UFC), o que correspondeu a 82 fg de DNA e um Ct de $40 \pm 0,08$ para *W. viridescens* em cultura pura. O valor de LD encontrado por Gómez-Rojo (2015) para quantificação de *W. viridescens* foi menor do que o encontrado neste trabalho. Esse resultado pode ser explicado devido ao rendimento da extração de DNA, enquanto obteve-se neste trabalho 32,5 ng de DNA de *W. viridescens* em $4,2 \times 10^9$ UFC/mL, Gómez-Rojo et al (2015) obtiveram 82 ng de DNA em 10^7 UFC/mL. Assim, alternativas de melhorias nos protocolos de extração de DNA podem investigadas para aumentar o rendimento do DNA extraído.

Tabela 2 Valores de Ciclo *threshold* (Ct) e Tm das reações de qPCR para as diluições decimais do DNA de *Weissella viridescens*.

DNA por reação (ng)	UFC em meio de cultura (UFC/mL) ^a	Ct (Média ± DP) ^b	IC ^c inferior	IC superior	Tm
32,5	$4,2 \times 10^9$	$8,6 \pm 0,06$	8,44	8,75	$81,50 \pm 0,00$
$32,5 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^7$	$14,59 \pm 0,04$	14,49	14,68	$81,40 \pm 0,09$
$32,5 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^5$	$21,23 \pm 0,17$	20,80	21,66	$81,33 \pm 0,08$
$32,5 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^3$	$26,75 \pm 0,50$	25,51	27,9	$81,38 \pm 0,03$

^a Obtido por contagem em placa.

^b Média mais desvio padrão.

^c Intervalo de confiança de 95%.

Ye et al. (2012) utilizaram em seu trabalho o método de SYBR® Green qPCR como ferramenta adicional à microbiologia preditiva para obter a curva de crescimento microbiano da bactéria patogênica *Listeria monocytogenes* em carne de porco resfriada embalada a vácuo em condições isotérmicas. A aplicação deste método molecular aplicado à modelagem do crescimento obteve resultados muito semelhantes aos resultados obtidos através da contagem em placa, comprovando ser um método eficaz para quantificação e identificação do patógeno *L. monocytogenes*. Schwendimann et al. (2015) desenvolveram uma forma rápida de detecção de *Lb. plantarum* e *Lb. fermentum* em fermentação de grãos de cacau pelo método de contagem em placa e qPCR, utilizando iniciadores e sondas. Os valores em log UFC/g encontrados em ambos os métodos foram muito próximos, comprovando que o método de qPCR possui resultados confiáveis.

5. CONCLUSÕES

Realizou-se o crescimento da cultura pura de *W. viridescens* em meio de cultivo, executando em seguida o isolamento e quantificação de seu DNA através do método SYBR® Green qPCR.

Os iniciadores desenhados para o gene *recN* foram específicos para identificar a *W. viridescens*, garantindo assim a especificidade do método utilizado através da obtenção de apenas um pico de temperatura de *melting*.

A curva padrão foi construída pelo método de SYBR® Green qPCR, que apresentou bons parâmetros, com $R^2 > 0,99$ e eficiência de $E=1,12$. O LD obtido foi de 3,7 log UFC de *W. viridescens*, que é adequado para quantificação de BAL em produtos cárneos, já que estas encontram-se na microbiota natural desses produtos na faixa de 10^3 UFC/g.

Conclui-se que é possível estabelecer uma metodologia de PCR quantitativa (qPCR) com utilização do fluoróforo SYBR® Green I para a identificação de *W. viridescens* em meio de cultivo, servindo como base para futuros estudos sobre a quantificação e identificação de BAL no âmbito da microbiologia preditiva.

6. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Sugere-se, para estudos futuros, a elaboração de curvas de crescimento (cinética/quantificação) e modelagem matemática através de modelos preditivos para obtenção de parâmetros de crescimento de *W. viridescens* em cultura pura pelo método de contagem em placa (CP), SYBR® Green e com o uso da sonda TaqMan® qPCR.

Propõem-se o estudo de outras BAL deteriorantes (*L. plantarum*, *L. sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*) de produtos cárneos utilizando a mesma metodologia para quantificação das mesmas, assim como verificar a interação dessas BAL em cultura mista através da técnica de SYBR® Green.

Aperfeiçoar o método da qPCR com a técnica SYBR® Green para utilizá-lo como uma ferramenta adicional na modelagem do crescimento de BAL deteriorantes de produtos cárneos.

7. REFERÊNCIAS

ALBANO, H.; VAN REENEN, C.A.; TODOROV, S.D.; CRUZ, D.; FRAGA, L.; HOGG, T.; DICKS, L. M. T.; TEIXEIRA, P. **Phenotypic and genetic heterogeneity of lactic acid bacteria isolated from “alheira”, a traditional fermented sausage produced in Portugal.** Meat Sci. 82, 389–398, 2009.

ALTEKRUSE, S. F.; R. D. Bishop, BALDY, L. M.; THOMPSON, S. G.; WILSON, S. A.; RAY, B. J.; GRIFFIN, P. M. **Vibrio gastroenteritis in the US Gulf of Mexico region: the role of raw oysters.** Epidemiol. Infect. v.124, p. 489–495, 2000.

AMMOR, S. **Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages.** Food Microbiology, v. 22, p. 373-382, 2005.

ANASTÁCIO, A. **Microbiologia Preditiva Alimentar: As sinergias entre a microbiologia, a matemática e as tecnologias da informação.** Segurança e Qualidade alimentar, n.7, p.56-59, 2009.

AXELSSON, L. **Lactic acid bacteria: classification and physiology.** In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 2004.

AYMERICH, M. T.; MARTÍN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; **Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages.** Appl. Environ. Microbiol. v.69, p. 4583–4594, 2003.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. **A dynamic approach to predicting bacterial-growth in food.** International Journal of food Microbiology, v. 23, p. 277-294, 1994.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. **Mathematics of predictive food microbiology.** International Journal of Food Microbiology, v. 26, p. 199-218, 1995.

BARANYI, J.; ROBINSON, T. P.; KALOTI, A.; MACKAY, B. M. **Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature.** International Journal of Food Microbiology, v. 27, n. 1, p. 61-75, 1995.

BARANYI, J.; TAMPLIN, M. L. **Combase: a combined database on microbial responses to food environments.** Journal of Food Protection, v.67, 1967–1971, 2004.

BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M.L. **Estimating the bacterial lag time: which model, which precision.** International Journal of Food Microbiology, v.91, p. 261–277, 2004.

BECKER, C. E.; KRETZMANN, N. A.; MATTOS, A. A.; VEIGA, A. B. G. **Melting curve analysis for the screening of hepatitis b virus genotypes a, d and f in**

patients from a general hospital in southern brazil. *Arq. Gastroenterol*, v.50, no.3, São Paulo, 2013.

BJÖRKROTH, J.; DICKS, L.M.T.; HOLZAPFEL, W.H. **Genus III. *Weissella***. In: De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (Eds.), *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology* vol. 3. Springer, New York, NY, USA, pp. 643–654, 2009.

BJÖRKROTH, J.; HOLZAPFEL, W. **Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella***. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Springer, New York, NY, USA, pp. 267–319, 2006.

BJÖRKROTH, J.; KORKEALA, H. **rRNA gene restriction patterns as a characterization tool for *Lactobacillus sake* strains producing ropy slime**. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 293–302, 1996.

BJÖRKROTH, K.J.; SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; WEISS, N.; HOSTE, B.; HOLZAPFEL, W.H.; KORKEALA, H.J.; VANDAMME, P. **Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples**. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 141–148, 2002.

BJORKROTH, K.J.; VANDAMME, P.; KORKEALA, H.J. **Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham**. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, p. 3313–3319, 1997.

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

BRUNO, L.M. **Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: bactérias Ácido-Lácticas**. Embrapa recurso Genéticos e Biotecnologia – Brasília – DF, 2011.

BUCHANAN, R. L. **Identifying and Controlling Emerging Foodborne Pathogens: Research Needs**. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, n.4, p.517-521, 1997.

BUCHANAN, R. L. **Using spreadsheet software for predictive microbiology applications**. *Journal of Food Safety*, v.11, 123–134, 1991.

BUNCIC, S.; NYCHAS, G. J.; LEE, M.R.F.; KOUTSOUMANIS, K.; HÉBRAUD, M.; DESVAUX, M.; ANTIC, D. **Microbial pathogen control in the beef chain: recent research advances**. *Meat Science*, v. 97(3), p.288–297, 2014.

CAMARGO, A.P.R.S. **Modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em cultura pura e mista sob condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.

CARMELA PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F. **Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 134, p. 230–236, 2009.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. **The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey.** *Critical Reviews in Microbiology*, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas.** 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

CAYRÉ, M. E.; GARRO, O.; VIGNOLO, G. **Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions.** *Food Microbiology*, v. 22, p.505-512, 2005.

CAYRÉ, M. E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. **Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures.** *Food Microbiology*, v. 20, p. 561-566, 2003.

CHELO, I. M.; ZÉ-ZÉ, L.; TENREIRO, R. **Genome diversity in the genera *Fructobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* determined by physical and genetic mapping.** *Microbiology* 156,420–430, 2010.

CHEN, B.-Y.; JANES, H.W. **PCR cloning protocols.** Second Edition. Humana Press 192, 439 pp, 2002.

CHENOLL, E.; MACIÁN, M. C.; ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R. **Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 498–508, 2007.

CHOI, H. J.; CHEIGH, C. I.; KIM, S. B.; LEE, J. C.; LEE, D. W.; CHOI, S. W. ***Weissella kimchi* sp.nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi.** *Int.J.Syst. Evol.Microbiol.* 52,507–511, 2002.

COEURET, V.; DUBERNET, S.; BERNARDEAU, M.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J.P. **Isolation, characterization and identification of *lactobacilli* focusing mainly on cheeses and other dairy products.** *Lait*, 83, 2003.

COLLINS, M. D.; SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; WALLBANKS, S. **Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species.** *J.Appl.Bacteriol.* 75,595–603, 1993.

COMI, G.; IACUMIN, L. **Identification and process origin of bacteria responsible for cavities and volatile off-flavour compounds in artisan cooked ham.** *International Journal of Food Science and Technology*, v. 47, p. 114-121, 2012.

COMI, G.; IACUMIN, L.; MANZANO, M.; GIUSTO, C.; OTTAVIANI, S.; BOSCOLO, D. **Alterazione di prosciutto cotto da *Weissella viridescens***. *Ind. Aliment.* 467, 267–273, 2007.

CORREIA, F. L. A. **Desenho e montagem de método rápido para diagnóstico da *Borreliose de Lyme* por PCR em tempo real**. Tese de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa. Porto, 70 pp, 2007.

DALGAARD, P.; KOUTSOUMANIS, K. **Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models**. *Journal of Microbiological Methods*, v.43, p.183- 196, 2001.

DANNENHAUER, C. É. **Desenvolvimento de um Aplicativo Computacional para Microbiologia Preditiva**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, SC, Brasil, 2010.

DE BRUYNE, K.; CAMU, N.; DE VUYST, L.; VANDAMME, P. ***Weissella fabaria* sp.nov., from a Ghanaian cocoa fermentation**. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 60, 1999–2005, 2010.

DE BRUYNE, K.; CAMU, N.; LE FEBVRE, K.; DE VUYST, L.; VANDAMME, P. ***Weissella ghanensis* sp.nov., isolated from a Ghanaian cocoa fermentation**. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 58,2721–2725, 2008.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. **Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products**. *Food Reviews International*, n°18, v.2, 3, p.191-208, 2002.

DELIDOW, B.C.; LYNCH, J.P.; PELUSO, J.J.; WHITE, B.A. **PCR protocols: current methods and applications**. Edition A White. Totowa, NJ, 2 pp, 1993.

DELLAGLIO, F.; FELIS G.E. **Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria**. *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects* (Tannock GW, ed), pp. 25–49. Caister Academic Press, Norfolk, 2005.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J.F. **Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres**. *International Journal of Food Microbiology*, v.41, p.231-238, 1998.

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

DOULGERAKI, A. I.; PARAMITHIOTIS, S.; KAGKLI, D. M.; NYCHAS, G-J. E. **Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions**. *Food Microbiology*, v. 27, p. 1028-1034, 2010.

ENNAHAR, S.; CAI, Y.; FUJITA, Y. **Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis.** Appl. Environ. Microbiol. 69, 444–451, 2003.

FADDA, S.; CHAMBON, C.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M. C.; TALON, R.; VIGNOLO, G. ***Lactobacillus* role during conditioning of refrigerated and vacuum-packaged Argentinean meat.** Meat Science, v. 79, p. 603-610, 2008.

FADDA, S.; OLIVER, G.; VIGNOLO, G. **Protein Degradation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* in a Sausage Model System.** Journal of Food Science, v. 67, n. 3, p. 1179-1183, 2002.

FAKRUDDIN, M.; MAZUMDER, R.M.; MANNAN, K.S.B. **Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food.** Ceylon Journal of Science, v. 40, n. 2, p.121-131, 2011.

FARBER, J. M.; GENDEL, S. M.; TYLER, K. D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W. L.; FRITSCHER, S. J.; BARRETT, T. J. FARBER, J.M. **Molecular typing and differentiation. In: FARBER, J.M. Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Washington, D.C.: APHA, p. 127-158, 2001.

FERRER J., PRATS, C.; LÓPEZ, D.; VIVES-REGO, J. **Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis.** International Journal of Food Microbiology, v. 134, p. 2-8, 2009.

FORSYTHE, J.S. **Aspectos básicos. In: FORSYTHE, J.S. Microbiologia da segurança alimentar,** São Paulo: Artmed. Cap. 2, p. 21-64, 2007.

FRANCO, B. G. M. F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** Editora Atheneu. São Paulo. SP. Brasil. 1996.

FURET, J.P.; QUENEE, P.; TAILLIEZ, P. **Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR.** International Journal of Food Microbiology 97:197-207, 2004.

GARVIE, E. I. **The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc* including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp.nov.) and *Leuconostocoenos*.** J.Gen.Microbio, v.48, p.439–447, 1967.

GASSER, F. **Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections.** Bulletin Institut Pasterur, 92, 45–67, 1994.

GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T. A. **The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry.** Journal of Applied Bacteriology, v. 62, p. 479-490, 1987.

GINZINGER, D. G. **Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream.** *Experimental Hematology*, v.30, p. 503-512, 2002.

GÓMEZ-ROJO E. M.; ROMERO-SANTACREU L.; JAIME I.; ROVIRA J. **A novel real-time PCR assay for the specific identification and quantification of *Weissella viridescens* in blood sausages.** *International Journal of Food Microbiology*, v 215, p.16–24, 2015.

GONZÁLEZ-QUIJANO, G.K.; DORANTES-ALVAREZ, L.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; JARAMILLO-FLORES, M.E.; PEREA-FLORES, M.J.; VERA-PONCE DE LEÓN, A.; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, C. **Halotolerance and survival kinetics of lactic acid bacteria isolated from jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) fermentation.** *J. Food Sci.* 79, 1545–1553, 2014.

GREEN, M.; WADOWSKY, R. M.; BARBADORA, K. **Recovery of vancomycin- resistant gram-positive cocci from children.** *J.Clin.Microbiol.* 28,484–488, 1990.

GUERRERO, I.; CHABELA, L. **Meat and Poultry. Spoilage of cooked meats and meat products. Problems caused by bacteria.** In: Robinson, R.; Batt, C.; Patel, P. *Encyclopedia of food microbiology.* v. 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. p. 1266-1272, 2000.

HAJDENWURCEL, J. R.; **Atlas de microbiologia de alimentos.** São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 66p, 1998.

HAMMES, W.P.; VOGEL, R.F. **The genus *Lactobacillus*.** *The Genera of Lactic Acid Bacteria.* vol. 2., Aspen Publishers, Gaithersburg,MD, 19-54, 1995.

HAN, S.-K.; HONG, Y.; KWAK, H.-L.; KIM, E.-S.; KIM, M.-J.; SHRIVASTAV, A.; OH, M.-H.; KIM, H.-Y. **Identification of lactic acid bacteria in porkmeat and porkmeat products using SDS-PAGE, 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry.** *J. Food Saf.* 34, 224–232, 2014.

HAN, Y.; JIANG, Y.; XU, X.; SUN, X.; XU, B.; ZHOU, G. **Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham.** *Meat Science*, v. 88, p. 682-688, 2011.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. **Starter cultures and their use.** *Applied Dairy Microbiology*, 2^a ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HEID, C. A. **Real time quantitative PCR.** *Genome Research*, v.6, n.10, p.986-994, 1996.

HERBEL, S. R. **Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yoghurt by quantitative real-time PCR.** *Journal of Applied Microbiology* v. 115, n. 6, p. 1402-1410, 2013.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** Biotechnology Nature Publishing Company, v.11, p.1026-1030, 1993.

HOLZAPFEL, W. H.; VAN WYK, E. P. ***Lactobacillus kandleri* sp.nov., a new species of the sub genus Betabacterium with glycine in the peptidoglycan.** *Zentrbl.Bakteriol.Parasitenkd.Infektkrankh.Hyg.* C3,495–502, 1982.

HU, P.; ZHOU, G.; XU, X.; LI, C.; HAN, Y. **Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16 S rDNA-DGGE.** *Food Control*, v. 20(2), p.99–104, 2009.

HUGAS, M. **Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products.** *Meat Science*, v.49, p. 139-S150, 1998.

HUGAS, M.; M. GARRIGA, T.; AYMERICH, J.; MONFORT, M. **Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages.** *Int. J. Food Microbiol*, v.18, p.107–113, 1993.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBBEL, B. M.; PACE, N. R. **Impact of cultureindependent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity.** *J. Bacteriol.* 180, 4765–4774, 1998.

ILHA, E. C. ***Lactobacillus paracasei* FNU - Isolado de Fermento de Uva: Avaliação de Características Probióticas, Resistência a Microencapsulação por "Spray Drying e Quantificação em Iogurte por PCR em Tempo Real.** Tese doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Florianópolis, SC, 2015.

JAY M. J. **Modern Food Microbiology**, Chapman & Hall, New York, NY, 1996.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos.** Tradução de Eduardo César Tondo, *et al.* 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JAY, M. J. **Modern Food Microbiology, *Fermented Foods And Related Products Of Fermentation***, 3th ed., Van Nostrand Reinhold Company, New York, New York, 239-255 and 362-406, 1986.

KANDLER, O.; SCHILLINGER, U.; WEISS, N. ***Lactobacillus halotolerans* sp. nov., nom.rev. and *Lactobacillus minor* sp.nov.** *Syst.Appl.Microbiol.* 4,280–285, 1983.

KOORT, J.; COENYE, T.; SANTOS, E. M.; MOLINERO, C.; JAIME, I.; ROVIRA, J. **Diversity of *Weissella viridescens* strains associated with “morcilla de burgos.”** *Int.j.foodmicrobiol.* 109,164–168, 2006.

KOUTSOUMANIS, K. P.; TAOUKIS, P. **Meat safety, refrigerated storage and transport: modeling and management.** In: SOFOS, J. N. (Ed.). **Improving the safety of fresh meat.** Cambridge: Woodhead, p. 503-561, 2005.

KOUTSOUMANIS, K.; STAMATIOU, A.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G.J.E. **Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions.** Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 1, p. 124-134, 2006.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. **The real time polymerase chain reaction.** Molecular Aspects of Medicine, v.27, p.95-125, 2006.

LEE, J. S.; LEE, K. C.; AHN, J. S.; MHEEN, T. I.; PYUN, Y. R.; PARK, Y. H. **Weissella koreensis sp.nov., isolated from kimchi.** Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 52,1257–1261, 2002.

LI, M. Y.; SUN, X. M.; ZHAO, G. M.; HUANG, X. Q.; ZHANG, J. W.; TIAN, W.; ZHANG, Q. H. **Comparison of mathematical models of lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged raw beef stored at different temperatures.** Journal of Food Science, v. 78, i. 4, p. M600-M604, 2013.

LOGAN, J.; EDWARDS, K. **Performing real-time PCR.** In: Logan, J.; Edwards, K.; Saunders, N. (Eds.), **Real-time PCR.** Current technology and applications. Norfolk. UK: Caister Academic Press, 2009.

LYHS, U. **Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products.** 2002. 81 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finlândia, 2002.

MACKAY, I. M. **Real-time PCR in the microbiology laboratory.** Clinical Microbiology and Infection, v. 10, p. 190-212, 2004.

MACKAY, I. M.; MACKAY, J.F.; NISSEN, M.D.; SLOOTS, T.P. **Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay,** p.1-40, I.M. (Ed.), **Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization** . Caister Academic Press Norfolk, UK, 2007.

MAGNUSSON, J.; JONSSON, H.; SCHNURER, J.; ROOS, S. **Weissella soli sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil.** Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 52, 831–834, 2002.

MANTILLA, S. P. S.; MANO, S. B.; VITAL, H. C.; FRANCO, R. M. **Atmosfera modificada na conservação de alimentos.** Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais, v. 8, n. 4, p. 437-448, 2010.

MARIN, V. A.; LEMOS, A. A.; FREITAS, E. E.; IMARIN, V. A. **Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil.** Higiene Alimentar, São Paulo, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.

MARTIN, B.; JOFRÉ, A.; GARRIGA, M.; PLA, M.; AYMERICH, T. **Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented Sausages by real-time PCR.** Applied Environmental Microbiology, v. 72, p. 6040-6048, 2006.

MARTÍNEZ, N.; MARTÍN, M.C.; HERRERO, A.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M.A.; LADERO, V. **qPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: significance for food quality.** Trends Food Sci. Technol, v.22, p. 367–376, 2011.

MARTINS, W. F. **Predição do crescimento de *Weissella viridescens* sob condições não isotérmicas.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2015.

MASSAGUER, P. R. D. **Microbiologia dos processos alimentares.** São Paulo: Varela, 2006.

MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. **Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food.** Journal of Food Protection, v.67, p.823-832, 2004.

McMEEKIN, J. N.; OLLEY, T., ROSS, D. A.; Ratkowsky. **Predictive microbiology: Theory and application.** Research Studies Press Ltd., Taunton, Reino Unido, 1993.

McMEEKIN, J.N. O.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A. **Predictive microbiology: Theory and application.** Research Studies Press Ltd., Taunton, Reino Unido, 1993.

McMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. **Predictive microbiology: Towards the interface and beyond.** International Journal of Food Microbiology , v. 73, p. 395- 407, 2002.

McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. **Shelf life prediction: status and future possibilities.** International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, NL, v. 33, p. 65-83, 1996.

MILBOURNE, K. **Thermal tolerance of *Lactobacillus viridescens* in ham.** Meat Science, 9, 113 e 119, 1983.

MOLINA, A. L.; TOBO, P.R. **Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico.** Editora Associada da Einstein, p.139-142, 2004.

MONTEL, M. C.; TALON, R.; FOURNAUD, J.; CHAMPOMIER, M. C. A **simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat.** J. Appl. Bacterio, v.70, p. 469–472, 1991.

MOURA, F. S. **Desenvolvimento de método molecular para a quantificação de bactérias em produtos industrializados / Fábio dos Santos Moura.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, Sp, Brasil, 2010.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, D.S.; FRANCO, B.D.G.M. **Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 3, p.41-51, 2000.

NANODROP TECHNOLOGIES. **INC.ND-1000 Spectrophotometer V3.5 User's Manual.** Wilmington, USA, p. 61, 2007.

NEUMEYER, K.; ROSS, T.; McMEEKIN, T. A. **Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage pseudomonads.** International Journal of Food Microbiology , v.38, p. 45- 54, 1997.

NICKLAS, J. A., BUEL, E. **Quantification of DNA in forensic samples.** Anal Bioanal Chem, 376(8): 1160-1167, 2003.

NISIOTOU, A.; DOUROU, D.; FILIPPOUSI, M. E.; BANILAS, G.; TASSOU, C. **Weissella uvarum sp.nov., isolated from wine grapes.** *Int.J.Syst.Evol.Micro- biol.* 64,3885–3890, 2014.

NIVEN, C. F. JR.; EVANS, J. B. **Lactobacillus viridescens nov.spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments.** *J.Bacteriol.* 3,758–759, 1957.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. **PCR em tempo real - uma inovação tecnológica da Reação em cadeia da Polimerase (PCR).** Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Ed.33, 2004.

NYCHAS, G-J. E.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K. P. **Meat spoilage during distribution.** Meat Science, v. 78, p. 77-89, 2008.

OH, S. J.; SHIN, N.-R.; HYUN, D.-W.; KIM, P. S.; KIM, J.Y.; KIM, M.-S. **Weissella diestrammenae sp.nov., isolated from the gut of a camel cricket (Diestrammenacoreana).** *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 63,2951–2956, 2013.

OLIVEIRA, T. C. R. M.; SHAI B.; GRIFFITHS, M. W. **Detection of Campylobacter jejuni in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR.** International Journal of Food Microbiology, v.104, p. 105–111, 2005.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: Métodos e aplicações.** Tese (Mestrado) - Universidade de Aveiro. Aveiro, 2010.

PADONOU, S.W.; SCHILLINGER, U.; NIELSEN, D.S.; FRANZ, C. M.; HANSEN, M.; HOUN-HOUIGAN, J. D. **Weissella beninensis sp.nov., a motile lactic acid bacterium from submerged cassava fermentations, and emended description of the genus Weissella.** *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 60,2193–2198, 2010.

PATTERSON, M. F.; MCKAY, A. M.; CONNOLLY, M.; LINTON, M. **Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at**

normal and abuse refrigeration temperatures. Food Microbiology, v. 27, p. 226-273, 2010.

PEIRSON, M.D.; GUAN, T.Y.; HOLLEY, R.A. **Thermal resistances and lactate and diacetate sensitivities of bacteria causing bologna discolouration.** Int. J. Food Microbiol. 86, 223–230, 2003.

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J.P. **Principles and technical aspects of PCR amplification,** Springer, 332 pp, 2008.

POFFO, F.; SILVA, M. A. C. **Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho.** Ciência e Tecnologia. Alimentar, Campinas, p.303-307, 2011.

POT B., LUDWIG W.; KERSTERS K.; SCHLEIFER K. H. **Taxonomy of lactic acid bacteria. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Genetics and Applications** (de Vuyst L & Vandamme EJ, eds), pp. 13–89. Chapman & Hall, Glasgow, UK, 1994.

POTHAKOS, V.; DEVLIEGHERE, F.; VILLANI, F.; BJÖRKROTH, J.; ERCOLINI, D. **Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage.** Meat Science, v. 109, p.66-74, 2015.

QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; COLMENERO, J. D.; REGUERA, J. M.; GARCÍA-ORDONÑEZ, M. A.; PACHÓN M. E.; GONZALEZ, M.; MORATA, P. **Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples.** Clinical Microbiology Infect, v.11, p. 713–718, 2005.

RAJKOVIC, A. **Immunoquantitative real-time PCR for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in Foods.** Applied Environmental Microbiology. 72, 6593–6599, 2006.

RATKOWSKY, D. A.; OLLEY, J.; MCMEEKIN, T. A.; BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures, **Journal of Bacteriology**, v. 149, p. 1-5, 1982.

RICHARDS, F. **A flexible growth function for empirical use.** Journal of Experimental Botany, v. 10, n. 29, p. 290-300, 1959.

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M.; MONTVILLE, T. J.; CHIKINDAS, M. **Purification and mechanism action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolate, *Lactobacillus sake* 2a.** Journal of Food Safety, n° 22, p. 39-54, 2002.

ROSS, T.; DALGAARD, P. **Secondary models R.C. McKellar, X. Lu (Eds.). Modeling Microbial Responses in Foods.** CRC Press, Boca Raton, p. 63–150, 2004.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.; HORN, G.; ERLICH, H.; ARNHEIM, N. **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and**

restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v.230, p.1350-1354, 1985.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. **Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 41 °C.** *Food Microbiology*, v. 17, 2000.

SAMELIS, J.; REMENTZIS, J.; TSAKALIDOU, E.; METAXOPOULOS, J. **Usefulness of rapid GC analysis of cellular fatty acids for distinguishing *Weissella viridescens*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella hellenica* and some non-identifiable, arginine-negative *Weissella* strains of meat origin.** *Syst. Appl. Microbiol.* v.21, p.260–265, 1998.

SANDERS M.E. **Probiotics: considerations for human health.** *Nutr Rev* 61: 91–99, 2003.

SANTOS, E. M.; JAIME, I.; ROVIRA, J.; LYHS, U.; KORKEALA, H.; BJÖRKROTH, J. **Characterization and identification of lactic acid bacteria in “morcilla de Burgos.”** *Int.J.FoodMicrobiol.* 97,285–296, 2005.

SCHILLINGER, U.; BOEHRINGER, B.; WALLBAUM, S.; CAROLINE, L.; GONFA, A.; HUCH, M.; HOLZAPFEL, W.H.; FRANZ, C. M. A. P. **A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation.** *FEMS Microbiol. Lett.*v.286, p. 222–226, 2008.

SCHILLINGER, U.; F. K. LUCKE. **Identification of lactobacilli from meat and meat products.** *Food Microbiol*, v.4, p. 199–208, 1987.

SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W.H.; BJÖRKROTH, K.J. **Lactic acid bacteria.** In: **Blackburn, C.d.W. (Ed.), Food Spoilage Microorganisms.** Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, pp. 541–578, 2006.

SHAW, B. G.; HARDING, C. D. **A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon.** *J. Appl. Bacteriol*, v.56, p. 25–40, 1984.

SILVA, E. O. **Desenvolvimento de curvas-padrão com aplicabilidade na análise de expressão do RNA mensageiro de genes da superfamília dos receptores nucleares.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde São Paulo, 2014.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo; Varela, 259p., 1997.

SINGH, S.; GOSWAMI, P.; SINGH, P.; HELLER, K.J. **Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review.** *LWT - Food Science and Technology*, 42, 2009.

SLONGO, A. P.; ROSENTHAL, A.; CAMARGO, L. M. Q.; DELIZA, R.; MATHIAS, S. P.; ARAGÃO, G. M. F. **Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure.** Food Science and Technology, v. 42, p. 303-306, 2009.

SMITH, M. G. **The generation time, lag time, and minimum temperature of growth of coliform organisms on meat, and the implications for codes of practice in abattoirs.** Journal of Higieny the Cambrige, v. 94, p. 289-300, 1985.

SMITH-SIMPSON, S.; CORRADINI, M. G.; NORMAND, M. D.; PELEG, M.; SCHAFFNER, D. W. **Estimating microbial growth parameters from non-isothermal data: A case study with *Clostridium perfringens*.** International Journal of Food Microbiology, v. 118, p. 294-303, 2007.

SNAUWAERT, I.; PAPALEXANDRATOU, Z.; DE VUYST, L.; VANDAMME, P. **Characterization of strains of *Weissella fabalis* sp.nov. and *Fructobacillus tropaeoli* from spontaneous cocoabean fermentations.** *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 63, 1709–1716, 2013.

SOBOLEVA, T. K.; PLEASANTS, A.B.; ROUX, G. I. **Predictive microbiology and food safety.** International Journal of Food Microbiology, v. 57, p. 183-192, 2000.

STILES M.E. **Biopreservation by lactic acid bacteria.** Antonie Van Leeuwenhoek 70: 331–345, 1996.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética molecular humana.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013

SU, Y. C.; C. LIU. ***Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety.** Food Microbiol, v.24, p. 549–558, 2007.

SWANSON, K. M. J.; BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H.; JOHNSON, M. G. **Colony count methods.** In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. (Ed). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 3.ed. Washington: American Public Health Association, chap.4, p.75-95, 1992.

TANASUPAWAT, S.; SHIDA, O.; OKADA, S.; KOMAGATA, K. ***Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand.** J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 1479–1485, 2000.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC- **Real-time PCR: understanding Ct.** [online] Disponível em: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PJ1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>. Acessado em 20 de maio 2017.

TOHNO, M.; KITAHARA, M.; INOUE, H.; UEGAKI, R.; IRISAWA, T.; OHKUMA, M. ***Weissella oryzae* sp.nov., isolated from fermented rice grains.** *Int.J. Syst.Evol.Microbiol.* 63, 1417–1420, 2013.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Crescimento microbiano**. Microbiologia. 10.ed. São Paulo: Artmed. cap. 6, p. 156-186, 2012.

TSAKALIDOU, E.; SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; KALANTZOPOULOS, G. **A typical *Leuconostoc*-like *Weissella* strains isolated from meat, sharing low phenotypic relatedness with the so far recognized arginine-negative *Weissella spp.* as revealed by SDS-PAGE of whole cell proteins**. Syst. Appl. Microbiol, v.20, p.659–664, 1997.

V. STAHL, V.; NDOYE, F. T.; JABRIC, M. E.; LE PAGE, J. F.; HEZARD, B.; LINTZ, A.; GEERAERD, A. H.; ALVAREZ, G.; THUAULT, D. **Safety and quality assessment of ready- to-eat pork products in the cold chain**. Journal of Food Engineering, v. 148, p. 43-52, 2015.

VAN IMPE, J. F. **Towards a novel class of predictive microbial growth models**. International Journal of Food Microbiology, v. 100, n. 1-3, p. 97-105, 2005.

VASAVADA, P. C.; CHANDLER, R. E.; HULL, R. R. **Evolving methodologies for microbiological examination of milk and dairy foods**. Dairy Food And Environmental Sanitation. v. 13. n. 9, p. 510-515. 1993

VELA, A. I.; PORRERO, C.; GOYACHE, J.; NIETO, A.; SÁNNCHEZ, B.; BRIONES, V.; MORENO, M. A.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁ BAL, J. F. ***Weissella confusa* infection in primate (*Cercopithecus mona*)**. Emerg. Infect. Dis. 9, 1307–1309, 2011.

VERCAMMEN, A.; VANOIRBEEK K. G. A.; LURQUIN, I.; STEEN, L.; GOEMAERE, O.; SZCZEPANIAK, S.; PAELINCK, H.; HENDRICKX, M. E. G.; MICHIELS, C. W. **Shelf-life extension of cooked ham model product by high hydrostatic pressure and natural preservatives**. Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 12, p.407–415, 2011.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHIERE, F.; DEBEVERE, J. **Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products**. International Journal of Food Microbiology, 96, 149-164, 2004.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G.W.; LIS, C.M.; MUNRO, K.; HAMMES, W.P. **Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis**. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2578–2585, 2001.

WANG, F.; NISHINNO, N. **Ensiling of soybean curd residue and wet brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration**. J. Dairy Sci. 91, 2380–2386, 2008.

WESSELS, S.; AXELSSON, L.; HANSEN, B. E.; VUYST, D. L.; LAULUND, S.; LA HTEENMA KI, L. L.; LINDGREN, S.; MOLLET, B.; SALMINEN, S.; WRIGHT, A. **The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation**. Trends in Food Science & Technology, v. 15, p. 498–505, 2004.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. **A classification of models in predictive microbiology e reply**. Food Microbiology, 10(2), 175e177, 1993.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. **A classification of models in predictive microbiology e reply**. Food Microbiology, 10(2), 175e177, 1993.

WILFINGER W. W., MACKEY K. E CHOMCZYNSKI P. **Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity**. BioTechniques, v 22, p.474-481, 1997.

WILSON, I. G. **Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification**. Appl. Environ. Microbiol, v.63, p. 3741–3751, 1997.

YAZD, E.F.; SADEGHIZADEH, M.; HOSSEINKHANI, S.; KHALAJ-KONDORI, M.; EMAMZADEH, R. **Molecular cloning, expression and sequence analysis of DNA polymerase I from an Iranian thermophilic bacterium, *Bacillus sp. G***. Journal of the Iranian Chemical Society, v.6, p. 831-837, 2006.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; VAN'T RIET, K. **Modeling of bacterial growth curve**. Applied and Environmental Microbiology, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.