

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

Bruna Marchesan Maran

**Identificação e quantificação de bactérias usando as regiões V3-V4 do gene 16S rRNA
em salame artesanal através de análise metagenômica**

Florianópolis

2020

Bruna Marchesan Maran

**Identificação e quantificação de bactérias usando as regiões V3-V4 do gene 16S rRNA
em salame artesanal através de análise metagenômica**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvani Verruck

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Maran, Bruna Marchesan

Identificação e quantificação de bactérias usando as regiões V3-V4 do gene 16S rRNA em salame artesanal através de análise metagenômica / Bruna Marchesan Maran ; orientador, Silvani Verruck, 2020.
57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2020. Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Produto fermentado. 3. genômica. 4. sequenciamento genético. I. Verruck, Silvani. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a minha orientadora Prof^a. Dr.^a Silvani Verruck por toda dedicação, apoio e confiança durante a execução deste trabalho e ao longo da minha graduação.

A minha família por todo o amor, apoio e incentivo incondicional. Em especial a minha irmã Emanuéli por todo o suporte fornecido.

A todos os professores do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina que contribuíram para a minha formação.

A Universidade Federal de Santa Catarina pela estrutura física e qualidade de ensino.

RESUMO

O salame artesanal é um embutido cárneo fermentado tradicionalmente consumido e produzido na região Sul do Brasil e apresenta microbiota específica em cada região em que é produzido. O uso de ferramentas avançadas de identificação bacteriana como o sequenciamento do genoma bacteriano permite a compreensão completa da ecologia bacteriana destes produtos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a microbiota predominante em salame artesanal, através do uso de sequenciamento genético. Para isso a identificação de bactérias em salame artesanal nos dias 0, 14 e 28 de fermentação foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA usando os *primers* 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG), e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), com 300 ciclos e sequenciamento *single-end* no equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). Foram encontrados 197 gêneros e 572 espécies de bactérias ao longo do período de fermentação. *Acinetobacter* spp. (13%), *Enterobacter* spp. (10%), *Enterococcus* spp. (9%) e *Bacillus* spp. (9%) foram mais abundantes no dia 0. Também no início da fermentação destacaram-se as espécies *Enterococcus casseliflavus* (8%), *Enterobacter cloacae* (6%), *Acinetobacter baumannii* (6%), *Wautersiella falsenii* (6%). Estas espécies representam uma imagem das condições de processamento do embutido cárneo fermentado, sugerindo uma possível contaminação no início do processo produtivo. No dia 14 de fermentação os gêneros *Acinetobacter* (20%), *Enterobacter* (18%), *Citrobacter* (17%), *Lactobacillus* (20%) e *Aeromonas* (10%), além das espécies *Citrobacter freundii* (18%), *Enterobacter aerogenes* (13%), *Companilactobacillus farciminis* (10%) e *Enterobacter cloacae* (9%) apresentaram maior abundância. *C. freundii*, *E. aerogenes* e *E. cloacae* destacaram-se como espécies produtoras de aminas biogênicas indesejáveis ao produto. Destacou-se também a espécie *C. farciminis* como bactéria ácido láctica com potencial de aplicação como cultura *starter*. No final da maturação (dia 28) *Companilactobacillus* spp. (10%) e *Staphylococcus* spp. (64%) bem como as espécies *C. farciminis* e *S. saprophyticus* apresentaram maior abundância, 10% e 63%, respectivamente, e caracterizam-se pela alta taxa de acidificação do produto inibindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis finalizando o processo fermentativo.

Palavras-chave: produto fermentado, genômica, metataxonômica, metagenômica, metagenoma, sequenciamento genético.

ABSTRACT

Artisanal salami is a fermented meat sausage traditionally consumed and produced in the southern region of Brazil and has a specific microbiota in each region where it is produced. The use of advanced bacterial identification tools such as sequencing the bacterial genome allows a complete understanding of the bacterial ecology of these products. Thus, the objective of this work was to evaluate a predominant microbiota in artisanal salami, through the use of genetic sequencing. For this, the identification of bacteria in artisanal salami on days 0, 14 and 28 days of fermentation was performed using high performance sequencing of the VS / V4 regions of the 16S rRNA gene using primers 341F (CCTACGGGRRSGCAGCAG), and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), with 300 cycles and single-end sequencing without MiSeq Sequencing System equipment (Illumina Inc., USA). 197 genera and 572 species of bacteria were found throughout the fermentation period. *Acinetobacter* spp. (13%), *Enterobacter* spp. (10%), *Enterococcus* spp. (9%) and *Bacillus* spp. (9%) were more abundant on day 0. *Enterococcus casseliflavus* (8%), *Enterobacter cloacae* (6%), *Acinetobacter baumannii* (6%), *Wautersiella falsenii* (6%) also stood out. These species represent an image of the processing conditions of the fermented meat sausage, suggesting a possible contamination at the beginning of the production process. On day 14 of fermentation the genera *Acinetobacter* (20%), *Enterobacter* (18%), *Citrobacter* (17%), *Lactobacillus* (20%) and *Aeromonas* (10%), in addition to the species *Citrobacter freundii* (18%), *Enterobacter aerogenes* (13%), *Companilactobacillus farciminis* (10%) and *Enterobacter cloacae* (9%) source greater source. *C. freundii*, *E. aerogenes* and *E. cloacae* stood out as species that produce undesirable biogenic amines to the product. A *C. farciminis* species also stood out as a lactic acid bacterium with potential for application as a starter culture. Without final maturation (day 28) *Companilactobacillus* spp. (10%) and *Staphylococcus* spp. (64%) as well as the species *C. farciminis* and *S. saprophyticus* source greater abundance, 10% and 63%, respectively, and are characterized by the high acidification rate of the product inhibiting the development of undesirable bacteria ending the fermentation process .

Keywords: fermented product, genomic, metataxonimic, metagenomic, genetic sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de produção do salame.....	14
Figura 2. Diminuição de pH de salame ao longo do processo de maturação.....	16
Figura 3. Geração de clusters por amplificação em ponte.....	24
Figura 4. Mecanismo de sequenciamento da plataforma Ion Torrent.	26
Figura 5. Mecanismo de sequenciamento da plataforma DNA Oxford Nanopore.	27
Figura 6. Fluxograma de produção de salame artesanal.....	32
Figura 7. Abundância relativa de filos presentes no salame artesanal ao longo do tempo de maturação.....	35
Figura 8. Gêneros de bactérias mais abundantes no salame com 0 (a), 14 (b) e 28 (c) dias de maturação.....	37
Figura 9. Abundância relativa das espécies bacterianas presentes no salame sem maturação (dia 0).....	38
Figura 10. Espécies com maior abundância relativa presentes no salame com 14 dias de fermentação.	44
Figura 11. Espécies com maior abundância relativa presentes no salame com 28 dias de fermentação.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Visão generalizada de algumas das tecnologias de sequenciamento genético disponíveis comercialmente.	18
Tabela 2. Estudos de aplicação de métodos microbiológicos moleculares em produtos cárneos.	19
Tabela 3. Quantidade de sequências identificadas das espécies mais abundantes ao longo do período de maturação.	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS	12
1.1.1	Objetivo Geral.....	12
1.1.2	Objetivos Específicos	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	SALAME ARTESANAL	13
2.1.1	Processamento do Salame	14
2.2	MÉTODOS GENOTÍPICOS PARA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA EM EMBUTIDOS CÁRNEOS	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	ELABORAÇÃO DO SALAME.....	31
3.2	ANÁLISE METAGENÔMICA	32
3.3	BIOINFORMÁTICA.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5	CONCLUSÃO.....	49
6	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Embutidos cárneos são produtos produzidos a partir de carnes ou órgãos comestíveis, podendo ser curados, condimentados, cozidos, defumados e dessecados, envolvido por uma tripa, sendo que esta pode ser de origem natural ou artificial (BRASIL, 2017). No sul do Brasil, devido à forte colonização italiana e alemã e sua influência para a cultura da região, os produtos embutidos, tais como salames artesanais, possuem uma forte aceitação, além de serem tradicionalmente elaborados de maneira artesanal nos próprios domicílios ou em pequenas indústrias, e então, comercializados em supermercados, feiras ou bancas de produtos coloniais (MAGRO; KLEIN, 2006).

Conforme o Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019 produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal são produtos elaborados com predominância de matérias primas de origem animal oriundas de produção própria ou de origem determinada, que passam por processo de produção predominantemente manual submetido ao controle de inspeção oficial, que mantém a singularidade e suas características tradicionais, culturais ou regionais do produto (BRASIL, 2019). Neste sentido, o processo de produção de embutidos fermentados compreende a moagem da carne *in natura* com adição de gordura, sal, agentes de cura e temperos. São as interações entre os processos químicos, físicos e microbiológicos que determinam a qualidade, cor, textura e sabor do produto final (GOTTARDO *et al.*, 2011). Tradicionalmente, o produto embutido fermentado artesanal não consegue apresentar constância em seu padrão de qualidade em diferentes locais de produção, isso porque depende dos microrganismos provenientes da microbiota presente nas matérias primas, nos equipamentos e instalações para que ocorra a fermentação (ROSELINO, 2016).

No entanto, o uso de culturas *starters* tornou-se cada vez mais necessário, garantindo assim, a segurança microbiana e padronização das propriedades do produto como a cor, sabor e consistência (COCOLIN *et al.*, 2001). Portanto, conhecer a composição da microbiota naturalmente presente em embutidos fermentados artesanais torna-se uma necessidade, a fim de desenvolver novas culturas *starters* específicas que poderão ser usadas em produtos artesanais sem que estes percam suas características tradicionais. Uma das ferramentas mais avançadas para identificação e caracterização da microbiota presente em produtos artesanais é o sequenciamento genético de amplo espectro dos microrganismos.

O estudo da composição microbiana de embutidos fermentados já foi realizado por métodos tradicionais de contagem de bactérias em placas, isolamento e identificação

bioquímica dos microrganismos. Contudo, sabe-se que somente microrganismos facilmente cultiváveis podem ser detectados, enquanto os que necessitam de meios mais complexos ou que se encontram injuriados não são possíveis de se detectar (RANTSIOU *et al.*, 2005). No entanto, com o desenvolvimento da microbiologia molecular e a descoberta de que o DNA carrega informações hereditárias, indicando que todas as propriedades dos microrganismos estão criptografadas no genoma (MARDANOV; KADNIKOV; RAVIN, 2018), tornou-se possível o uso de métodos moleculares para identificação dos microrganismos presentes em alimentos, entre estes os produtos fermentados (FRANCIOSA *et al.*, 2018).

Os métodos de tipagem genotípica, por exemplo, avaliam a variação dos genomas dos microrganismos em relação a sua composição, estrutura ou sequência específica de nucleotídeos. Para o sequenciamento genético, existem várias regiões do gene que podem ser analisadas com grande variabilidade, no entanto, dependendo da espécie bacteriana a ser analisada utiliza-se inicialmente um marcador específico, não sendo uma técnica padronizada. O gene 16S rDNA, devido sua presença em todos os procariotos, e por possuir tanto regiões conservadas como variáveis que evoluem em taxas diferentes e são essenciais na determinação de relações filogenéticas próximas e distantes, é considerado o padrão ouro para a taxonomia bacteriana (CUNHA, 2016). A partir dessas metodologias é possível identificar a microbiota de qualquer alimento, entre eles os embutidos fermentados artesanais. Desta forma, começam a emergir os estudos relacionados à metagenômica de produtos cárneos e cárneos fermentados (FERROCINO *et al.*, 2017; FRANCIOSA *et al.*, 2018).

A metagenômica destaca-se por executar o sequenciamento para a identificação de toda a microbiota de uma amostra através de genes marcadores como o gene 16S para as bactérias e o gene ITS para fungos. Esta metodologia apresenta resultados a nível taxonômico do filo até a espécie do microrganismo identificado, utilizando ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos como o GreenGene e RibosomalDatabase (DE CESARE, 2019; FRANCIOSA *et al.*, 2018).

Em embutidos fermentados de carne de porco, estudos metagenômicos possibilitam o acompanhamento da microbiota ao longo do processo fermentativo (FERROCINO *et al.*, 2017; GIELLO *et al.*, 2018). Desta forma, esta ferramenta permite a identificação de cepas que atuam no desenvolvimento de compostos desejáveis característicos do embutido fermentado artesanal, possibilitando, por exemplo, a identificação de possíveis culturas *starters* que garantam a qualidade higiênica-sanitária e características organolépticas dos

produtos artesanais (FRANCIOSA *et al.*, 2018; FUKA *et al.*, 2020; SANTIYANONT *et al.*, 2019).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Analisar a microbiota presente em amostra de salame artesanal ao longo do processo fermentativo utilizando a metagenômica como ferramenta analítica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar o microbioma bacteriano presente em amostras de salame artesanal ao longo de 28 dias de fermentação utilizando como base as regiões V3-V4 do gene 16S;
- Realizar o sequenciamento do genoma das amostras utilizando o sistema Diagnóstico Microbiológico Digital;
- Analisar o metagenoma através da plataforma Miseq da Illumina;
- Determinar as bactérias prevalentes ao longo do tempo de fermentação nas amostras;
- Propor, com base nos resultados, quais as cepas poderiam ser utilizadas para o desenvolvimento de fermento tipo artesanal para salames artesanais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SALAME ARTESANAL

O salame é o produto cárneo obtido de carne suína e de toucinho, com adição ou não de outros ingredientes, condimentado, embutido em envoltórios naturais ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não, e dessecado (BRASIL, 2017).

A produção de salames artesanais no Brasil surgiu com a chegada de imigrantes italianos que ao se instalarem, principalmente na região sul, encontraram condições climáticas favoráveis para iniciar a produção (CASTILHO, 2014). Atualmente, os produtos artesanais são produzidos, em sua grande maioria, por pequenas agroindústrias familiares como fonte de renda extra e são amplamente consumido devido sua qualidade sensorial diferenciada (VERDAN; ISAKA, 2015).

Conforme o Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019, produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal são produtos elaborados com predominância de matérias primas de origem animal oriundas de produção própria ou de origem determinada, que passam por processo de produção predominantemente manual, submetido ao controle de inspeção oficial, que mantém a singularidade e suas características tradicionais, culturais ou regionais do produto (BRASIL, 2019).

Tradicionalmente, o produto embutido fermentado artesanal não consegue apresentar constância em seu padrão de qualidade em diferentes locais de produção, isso porque depende dos microrganismos provenientes da microbiota presente nas matérias primas, nos equipamentos e instalações para que ocorra a fermentação (ROSELINO, 2016). A fermentação realizada de maneira natural e sem adição de culturas iniciadoras é uma característica marcante do produto. Além disso, o produto obtido desta forma não possui um padrão de produção e, apesar de apresentar ingredientes com fatores antimicrobianos, deve ser considerado a possibilidade de sobrevivência de microrganismos patogênicos (PEREIRA; BARCELLOS; BERSOT, 2019; SCHMITT, 2017).

Com o intuito de garantir a segurança microbiana e a padronização das propriedades do produto, como a cor, sabor e consistência, podem ser empregadas culturas iniciadoras (SCORSIO, 2015). Portanto, conhecer a composição da microbiota naturalmente presente em embutidos fermentados artesanais torna-se uma necessidade, a fim de desenvolver novas

culturas starters específicas que poderão ser usadas em produtos artesanais sem que estes percam suas características tradicionais.

2.1.1 Processamento do Salame

O processo de fabricação do salame possui seis etapas representadas na Figura 1, todas elas devem ser realizadas de maneira higiênica a fim de obter um produto que atenda os padrões de qualidade, não representando riscos à saúde, à segurança e aos interesses do consumidor (BRASIL, 2017; CENCE, 2016). A primeira e segunda etapa do processo de fabricação consiste na escolha da carne de porco atendendo as condições higiênicas e com pH na faixa de 5,4 a 5,8 preferencialmente, passando pela moagem da carne *in natura* e do toucinho com granulometria conforme a Instrução Normativa nº22 de 31 de julho de 2000 para cada tipo de salame (BRASIL, 2000; CENCE, 2016).

Figura 1. Fluxograma de produção do salame.



Fonte: Adaptado de Cence (2016).

Após a moagem, ocorre a mistura dos ingredientes que é considerada uma etapa crítica, porque deve garantir a união dos fragmentos de carne e demais ingredientes do salame pela extração das proteínas miofibrilares (SCORSIO, 2015).

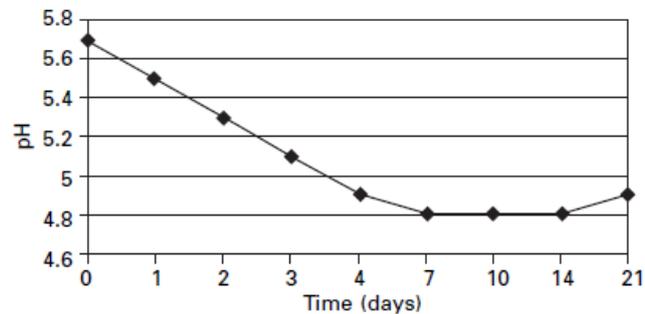
Na etapa de embutimento, responsável por dar forma ao produto, a massa preparada é introduzida em tripas naturais ou artificiais previamente higienizadas tomando o cuidado para não haver presença de ar entre a superfície da tripa e a carne, isso porque o oxigênio interfere negativamente na cor e sabor do produto final. É nesta etapa que ocorre a modificação do ambiente que favorece o desenvolvimento de micro-organismos presentes (GUEVARA, 2014; SCHMITT, 2017).

Então, o produto pode passar ou não pela etapa de defumação em temperatura máxima de 30°C e umidade relativa de 75 a 80%. A fumaça proveniente da defumação tem a função de dessecar superficialmente, retardar a rancidez oxidativa, coagular proteínas e atuar como antimicrobiano na superfície do alimento (SCHMITT, 2017). Porém, a ação antimicrobiana da defumação é limitada, sendo necessária a utilização em conjunto de outros procedimentos, tais como cura, fermentação ou secagem (CENCE, 2016).

A secagem e maturação é a próxima etapa e ocorrem em uma câmara de maturação com temperatura e umidade relativa controlada de maneira a garantir uma boa fermentação (CENCE, 2016). Nas primeiras 24 horas de fermentação, bactérias da família *Micrococcaceae*, que possuem o sistema nitrato nitrito redutase, realizam a redução de nitratos e contribuem para a coloração rosa avermelhada característica deste produto. Já a fermentação dos açúcares é realizada por diferentes espécies de *Lactobacillus* produzindo ácido lático (SCORSIO, 2015). O ácido lático produzido na fermentação irá acumular no produto, resultando no abaixamento do pH que pode ser observado na Figura 2 e, conseqüentemente, ajudará no controle de crescimento de microrganismos indesejáveis, tais como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes*, além da obtenção de textura, desidratação e coloração desejada do embutido (VARGAS, 2019).

Já na segunda etapa da maturação ocorre a maior parte da desidratação e processos de proteólise e lipólise pelas enzimas produzidas através da biota do produto ao longo da fermentação, que agem sobre os aminoácidos e gorduras e produzem compostos que contribuem para o aroma e provocam um ligeiro aumento no pH final (Figura 2) (SCORSIO, 2015).

Figura 2. Diminuição de pH de salame ao longo do processo de maturação.



Fonte: Feiner (2006)

Para melhor controle do processo fermentativo, maturação e desenvolvimento das características do produto são utilizadas culturas iniciadoras ou *starters*. Estas culturas são geralmente compostas por vários micro-organismos, dos quais os mais utilizados são bactérias lácticas como *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que promovem a segurança do produto com a redução do pH, *Micrococcus* e *Staphylococcus* responsáveis pelo desenvolvimento do cor, aroma e sabor do embutido, e fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, responsáveis pelo controle de incidência de luz sobre o embutido e passagem de oxigênio, impedindo a rancificação e melhorando o *flavour* do produto (CENCE, 2016; SCHMITT, 2017).

2.2 MÉTODOS GENOTÍPICOS PARA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA EM EMBUTIDOS CÁRNEOS

O estudo da composição microbiana de um determinado alimento tradicionalmente é realizado por técnicas baseadas em crescimento em meio de cultura, contudo essas técnicas têm baixa sensibilidade e necessitam de fatores de cultivos microbianos previamente conhecidos, o que nem sempre é possível. Além disso, sabe-se que muitos microrganismos não são facilmente cultiváveis em meios de laboratório como no habitat natural, podendo levar a subestimação da diversidade microbiana (DE FILIPPIS; PARENTE; ERCOLINI, 2018). Desta forma, com o desenvolvimento da microbiologia molecular e a descoberta de que o DNA carrega informações hereditárias, indicando que todas as propriedades dos microrganismos estão criptografadas no genoma (MARDANOV; KADNIKOV; RAVIN, 2018), tornou-se possível o uso de métodos moleculares para a identificação dos microrganismos presentes em alimentos (COCOLIN *et al.*, 2018; FRANCIOSA *et al.*, 2018).

Os métodos de tipagem genotípica, por exemplo, avaliam a variação dos genomas dos microrganismos em relação a sua composição, estrutura ou sequência específica de nucleotídeos. Um exemplo destes métodos é a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) desenvolvida por Schwartz e Cantor em 1984 conhecida como padrão ouro para a genotipagem bacteriana. O DNA bacteriano é clivado em sítios específicos por uma enzima de restrição e então seus fragmentos são separados por tamanhos através da eletroforese em gel (CUNHA, 2016). A separação do DNA pelo PFGE consiste na alternância de direção da aplicação de dois campos elétricos e a capacidade dos fragmentos de DNA se orientarem na nova direção do campo elétrico dependendo do seu tamanho, onde moléculas menores reorientam-se mais rapidamente de maneira a retardar a migração através do gel das moléculas maiores, separando-as. Então, após a coloração com agente fluorescente, a imagem dos padrões de bandas de DNA gerados são digitalizados para análise (LOPEZ-CANOVAS *et al.*, 2019). No entanto, este método é aplicável somente em estudos locais e pequenos com variabilidade genética presumidamente limitada, o que dificulta sua aplicação em alimentos com uma microbiota diversificada. Desta forma, com o intuito de solucionar este problema, surgiram os métodos baseados em sequenciamento de DNA, os quais possuem a vantagem de serem armazenados em bancos de dados on-line e compartilhados entre laboratórios e pesquisadores (CUNHA, 2016).

Os métodos de tipagem por sequenciamento de DNA são métodos moleculares que diferem entre si de acordo com a quantidade de DNA que será analisada e representam um grande progresso na determinação microbiana devido a sua capacidade de detecção de microrganismos não cultiváveis, reprodutibilidade, versatilidade e fácil compartilhamento de dados (CUNHA, 2016). O sequenciamento completo do genoma, do inglês *Whole genome sequence* (WGS), é um termo utilizado para descrever o sequenciamento de todo o genoma de um organismo e é diferenciado em três gerações (primeira, segunda e terceira geração) conforme a Tabela 1 (OAKLEY; GONZALEZ-ESCALONA; MOLINA, 2015).

Tabela 1. Visão generalizada de algumas das tecnologias de sequenciamento genético disponíveis comercialmente.

Geração	Companhia	Plataforma	Método de preparação	Química	Precisão (%)
Primeira	ABI	3700/3730		Sanger	100
Segunda	Roche	454-Flx	emPCR	Pyro	99,5
		Titanium			
	454 GS junior	emPCR	Pyro	99,5	
	Illumina-Solexa	Hiseq 2000	CBA	RDT	-
		MiSeq	CBA	RDT	>98,5
Life Technologies	SOLid		emPCR	OPL	99
		Ion Torrent	emPCR	Pyro (pH)	99
		Ion Proton	emPCR	Pyro (pH)	99
Terceira	Pacific BioScience Oxford Nanopore			Single Molecule	86
		MinION	emPCR	Single Molecule	-
		PromethION	emPCR	Single Molecule	-

CBA : clonal bridge amplification; emPCR: emulsion PCR; OPL: oligonucleotide probe ligation; Pyro: pirosequencing; RDT: reverse dye terminators

Fonte: Adaptado de Oakley; Gonzalez-Escalona e Molina (2015) e Chritoff (2017).

O método de primeira geração, desenvolvido por Frederick Sanger, faz o sequenciamento de uma cadeia simples de DNA que serve de molde para gerar a outra metade da dupla hélice, identificando continuamente e sequencialmente o último nucleotídeo incorporado na extremidade de alongamento da cadeia (SANTOS *et al.*, 2013). Os dideoxynucleotídeos de terminação em cadeia impedem a incorporação de nucleotídeos adicionais, os quais juntamente com marcadores de fluorescência e nucleotídeos reguladores produzem fragmentos sequenciais com tamanhos variados que são separados em gel de agarose ou eletroforese capilar de acordo com seu tamanho (PROFAIZER; KUMÁNOVICS, 2018). Este método pode ser utilizado em estudos de diversidade microbiana em produtos cárneos apresentados na Tabela 2 (BUSCONI; ZACCONI; SCOLARI, 2014).

Tabela 2. Estudos de aplicação de métodos microbiológicos moleculares em produtos cárneos.

Produto analisado	Metodologia	Principais Microrganismos	Principais Resultados	Referência
Copa e Bacon de porco	Sanger	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Tetragenococcus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp.	A copa e o bacon obtiveram diferença na sua microflora, compostas de microrganismos específicos de cada produto. As bactérias mais presentes em cada produto foram dependentes do local de produção.	(BUSCONI; ZACCONI; SCOLARI, 2014)
Salame italiano de carne de porco	Illumina	Lactobacillaceae, Staphylococcaceae, Listeriaceae, Brevibacteriaceae, Enterobacteriaceae	O método Illumina revelou uma diversidade maior de microrganismos que métodos mais antigos. Apresentou potencial de diferenciação microbiana de produtos alimentícios fermentados locais.	(POLKA <i>et al.</i> , 2015)
Salame de carne de porco	454 GS junior	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Leuconostoc camosum</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Staphylococcus</i>	Algumas espécies puderam ser consideradas metabolicamente ativas e contribuir para determinar a qualidade do produto final. A análise baseada em RNA pode aumentar a capacidade de identificar o impacto dos microrganismos presentes nas características organolépticas dos produtos alimentícios.	(GREPPI <i>et al.</i> , 2015)
Carne de porco moída	Metagenômica usando 454 FLX	<i>Pseudomonas</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Arthrobacte</i> ,	A diversidade entre as microbiotas dos produtos analisados tem pouca variabilidade sendo possível a rastreabilidade da contaminação. São necessárias mais análises para melhores conclusões.	(KOO <i>et al.</i> , 2016)

		<i>Lactobacillus</i>		
Bacon fermentado	454GS-FLX	Proteobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria	Sugeriu-se que as etapas dos processamentos apresentaram efeito na diversidade microbiana presente. Em uma das amostras encontrou-se bactérias causadoras de infecções, além de, no geral encontrar microrganismos deteriorantes do bacon e outros microrganismos responsáveis pela qualidade sensorial melhorando o sabor e segurança do mesmo.	(YI <i>et al.</i> , 2017)
Embutido fermentado de carne de porco	Metagenômica <i>Shotgun</i> e Metabolômica	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Staphylococcus xylosum</i>	A presença de <i>L. sakei</i> garantiu rápido consumo de substratos fermentáveis com alta taxa de acidificação observando um declínio da diversidade microbiana com o tempo. Comparando embutidos com adição de cultura <i>starter</i> e com fermentação natural o primeiro obteve menor pH, mas o último uma melhor aceitação sensorial com maior variabilidade de genes.	(FERROCINO <i>et al.</i> , 2017)
Fermentado de carne de porco, ‘saum’	Metagenômica	<i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>Planctomycetes</i>	Foram identificados 72 gêneros de bacterianos onde os funcionais estavam relacionados a metabolitos energéticos, carboidratos e aminoácidos, mas outros encontrados podem causar problemas de saúde ao consumidor.	(DE MANDAL <i>et al.</i> , 2018)
Embutido fermentado de carne de porco	Metagenômica Illumina	<i>Pseudomonas</i> , <i>Brochothrix</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> ,	A análise 16S rRNA revelou a capacidade de <i>Lb. Curvatus</i> 54M16 dominar e efetuar o ecossistema bacteriano, mas outras bactérias associadas a deterioração foram encontradas até o final do processo fermentativo.	(GIELLO <i>et al.</i> , 2018)

		<i>Streptococcus</i>		
Salame, linguiça chinesa defumada e linguiça chinesa curada a seco	Ilumina	<i>Firmicutes</i> spp., <i>Protobacteria</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Pantoea</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp., <i>Brochothrix</i> spp.	A bactéria mais abundante encontrada no salame foi <i>Staphylococcus</i> a qual também estava presente nas linguiças chinesas de cura seca. Já a <i>Weissella</i> estava presente em ambas linguiças chinesas, mas na linguiça chinesa defumada possuiu dominância de <i>Pediococcus</i> e <i>Lactobacillus</i> também. Concluiu-se que o sequenciamento de alto rendimento é eficiente no monitoramento de patógenos de origem alimentar em embutidos.	(WANG <i>et al.</i> , 2018)
Carne ácida fermentada	Ilumina	<i>Macrooccus</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Weissella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>	Observou que houve um aumento na produção de ácido láctico e redução do pH a medida que aumentou o tempo e temperatura. Correlacionou positivamente os lactobacilos com as modificações citadas, representando uma melhora na qualidade e vida útil do produto.	(LV <i>et al.</i> , 2019)
Produto fermentado de carne de porco	454 FLX	Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Peptostreptococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae,	Detectaram riscos à saúde devido ao acúmulo de aminas biogênicas (BA) associado negativamente com bactérias ácido lácticas como a <i>W. hellenica</i> . Uso de cultura starter que suprima para controlar as atividades das bactérias produtoras de BA introduzidas com os ingredientes.	(SANTIYANO NT <i>et al.</i> , 2019)
Salames de carne de bovino, cavalo, javali e porco	Ilumina	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Photobacterium</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.	O uso de quatro espécies de animais de diferentes açougues não afetou negativamente na qualidade físico-química e microbiológica dos salames. Confirmou uma maior adequação da carne de cavalo e bovino para a produção de salame livre de nitrito e nitrato proveniente de fermentação natural.	(SETTANNI <i>et al.</i> , 2020)

Embutidos fermentados de carne de javali ou carne de veado misturados com carne de porco	Illumina	<i>Bacillus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Stenotrophomonas</i> spp., <i>Brochothrix</i> spp., <i>Carnobacterium</i> spp., <i>Weissella</i> spp.,	O gênero <i>Lactobacillus</i> foi o mais abundante e o principal fator de fermentação de embutidos. (FUKA <i>et al.</i> , 2020) Microorganismos deteriorantes presentes inicialmente obtiveram diminuição na sua concentração no produto final, mas indicam má condições higiênicas e baixa qualidade microbiológica da carne.
--	----------	---	---

Fonte: Do autor (2020).

No entanto, mesmo sofrendo alterações ao longo do tempo, o método de Sanger ainda continua sendo trabalhoso devido a quantidade de preparação de amostra necessária para sequenciar os ácidos nucleicos, além de ser um método caro e com comprimento de leitura muito curto (FARINAS, JAVIER, CHOW, ANDREA, PARCE, 2010; OAKLEY; GONZALEZ-ESCALONA; MOLINA, 2015).

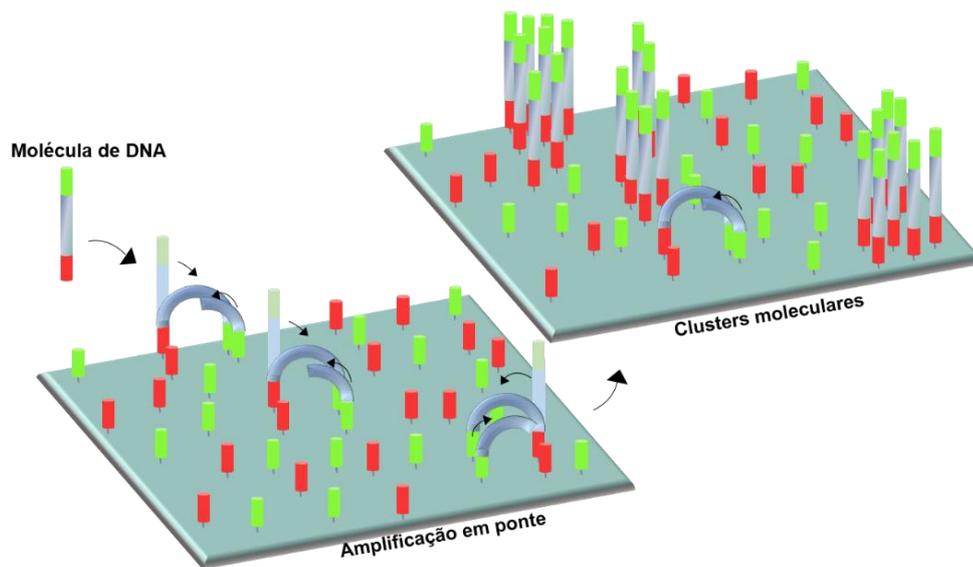
Desta forma, investimentos públicos e privados levaram a criação de tecnologias de sequenciamento de segunda geração ou sequenciamento de próxima geração (NGS) (Tabela 2). As máquinas de sequenciamento 454 são uma mudança de paradigmas e permitem a paralelização em massa das reações de sequenciamento, aumentando a quantidade de DNA que pode ser sequenciado (HEATHER; CHAIN, 2016). Neste sequenciamento, moléculas de DNA são geradas por fragmentação ou reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização de *primers*. Os fragmentos hibridizados em esferas são agitados com os reagentes de PCR e óleo e submetidos a ciclos térmicos para amplificar o DNA modelo. Para a realização do sequenciamento foi projetada a placa *Pico Titre* que é composta por milhões de poços microscópicos por onde as esferas e demais compostos, exceto os nucleotídeos, passam. A etapa final, denominada de pirosequenciamento é a adição cronológica de cada nucleotídeo o qual, ao ser adicionado pela DNA polimerase, libera fosfato inorgânico, resultando na descarga de um flash de luz detectado. Este processo é repetido centenas de vezes para a construção da sequência de imagens (PILLAI; GOPALAN; LAM, 2017).

O sequenciamento 454, em suas diferentes plataformas, é aplicado em estudos de embutidos fermentados de maneira a entender o microbioma presente nestes produtos e de que forma isto afeta na qualidade sensorial e segurança dos mesmos (GREPPI *et al.*, 2015; SANTIYANONT *et al.*, 2019; YI *et al.*, 2017). Outra plataforma desenvolvida após a 454 e que também vem sendo aplicada em estudos da microbiota de produtos cárneos é a plataforma Illumina, utilizada até o momento para carnes e derivados de diferentes espécies de mamíferos, tais como, cavalo, porco, veado e boi (Tabela 2) (FUKA *et al.*, 2020; SETTANNI *et al.*, 2020).

A plataforma Illumina, assim como a de Sanger, realiza síntese pela enzima DNA polimerase, mas a clonagem é realizada pelo processo *in vitro* de PCR em fase sólida (SANTOS *et al.*, 2013). O DNA sofre fragmentação aleatória e conecta-se a adaptadores em ambas as extremidades, as moléculas de DNA de fita simples aderem por afinidade ao suporte sólido onde estão ligados por alta densidade oligonucleotídeos complementares. Na amplificação da PCR ilustrada na Figura 3, o adaptador da extremidade livre da molécula

aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar, formando uma estrutura em ponte na qual a extremidade livre do oligonucleotídeo é utilizada como primer. Na desnaturação, a ponte é desfeita com a elevação da temperatura e então repete-se as etapas da PCR por vários ciclos até a obtenção de *clusters* de moléculas idênticas ligadas ao suporte, conforme demonstrado na Figura 3 (CARVALHO; SILVA, 2010).

Figura 3. Geração de clusters por amplificação em ponte.



Fonte: Adaptado de Cristoff (2017).

Através da incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser, é gerado um sinal captado pelo dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia. Este processo é realizado para cada nucleotídeo, montando ao fim, a sequência completa de cada *cluster* (CARVALHO; SILVA, 2010).

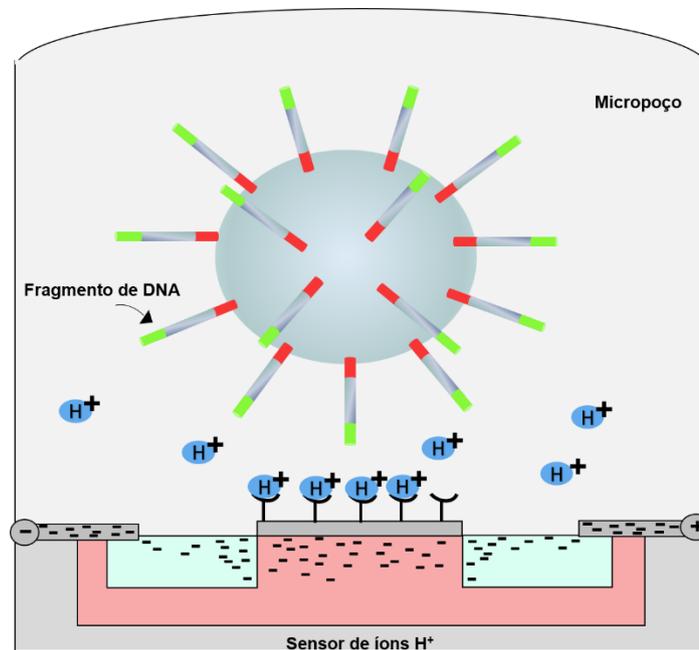
Segundo Polka *et al* (2015), o método utilizando sequenciamento de alto rendimento da plataforma Illumina apresentou uma diversidade microbiana maior no produto cárneo fermentado de carne de porco do que em outros métodos como PCR-DGGE (eletroforese em gel por gradiente desnaturante), fornecendo avanços de maneira significativa na caracterização da comunidade microbiana presente nos produtos analisados. Vale ressaltar que as técnicas de DGGE já foram amplamente aplicadas nos estudos da ecologia de embutidos fermentados, mas, sem dúvida, o sequenciamento de alto rendimento representa mudança na forma como é analisada a microbiota presente em fermentados, já que permite

observar um perfil detalhado das unidades taxonômicas operacionais (OTU) para entendimento dos processos fermentativos ocorridos nos alimentos (FRANCIOSA *et al.*, 2018).

O sequenciamento pelo sistema de ligação e detecção de oligonucleotídeos da plataforma SOLiD é outra tecnologia de sequenciamento que difere da Illumina somente no fato de que a reação é catalisada nesta pela DNAligase (SANTOS *et al.*, 2013). Os fragmentos de DNA a serem sequenciados são amplificados na superfície de uma esfera magnética em PCR de emulsão e sequenciados por ligação onde ocorre a hibridização de uma sequência de *primer* ao adaptador do fragmento. As enzimas DNAligase são fornecidas e inicia-se o método de ligação degenerada, com o reconhecimento e ligação do primer que hibridizou na molécula de DNA com o primer adjacente, emitindo um sinal de fluorescência. Então, o sinal é detectado pelo programa do equipamento que determina a sequência nucleotídica (CHRISTOFF, 2017).

Já a plataforma Ion Torrent, conhecida como sequenciamento pós-luz, utiliza uma abordagem indireta para sequenciamento de DNA e microchips como sensores de detecção do resultado representados na Figura 4 (HEATHER; CHAIN, 2016). Desta forma, após a fragmentação do DNA estes fragmentos são distribuídos em um chip que contém micro poços onde são liberados cada nucleotídeo a ser incorporado pela enzima polimerase. No momento em que cada nucleotídeo complementar é incorporado na fita-molde de DNA, ocorre a liberação de um hidrogênio que ocasiona a modificação do pH do meio detectado por um sensor de íons (Figura 4) (CHRISTOFF, 2017). Contudo, mesmo a plataforma Ion Torrent sendo a última da segunda geração, nos últimos anos a Illumina é a mais utilizada e mais bem sucedida entre as plataformas de segunda geração (HEATHER; CHAIN, 2016).

Figura 4. Mecanismo de sequenciamento da plataforma Ion Torrent.



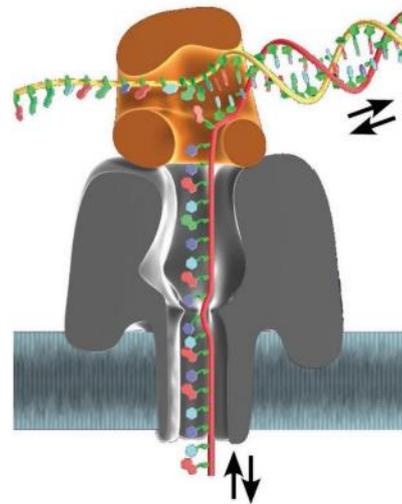
Fonte: Adaptado de da Silva (2015).

A terceira geração de sequenciamento difere das demais gerações por sequenciar moléculas únicas sem a necessidade de amplificação, simplificando os procedimentos e reduzindo os custos. A plataforma Pacific BioScience é uma das técnicas desta geração e é capaz ler em tempo real pequenos genomas como bactérias, plasmídeos e fagos (WASFI; AWWAD; AYESH, 2018). Baseia-se na atividade da DNApolimerase que catalisa a síntese de uma fita complementar de DNA através da sequência nucleotídica de uma fita molde (CHRISTOFF, 2017). A tecnologia utilizada nesta plataforma é conhecida como guias de onda de modo zero que são pequenos orifícios em escala nanométrica onde uma única polimerase é associada. Cada nucleotídeo, independentemente de ser incorporado posteriormente ou não, possui um marcador fluoróforo. Então, quando a incorporação ocorre rapidamente com os nucleotídeos específicos, estes emitem fluorescência enquanto os demais não incorporados se difundem (PROFAIZER; KUMÁNOVICS, 2018).

A plataforma DNA Oxford Nanopore é outro método de terceira geração e trabalha com nanoporos biológicos, sendo hoje considerada uma das tecnologias mais promissoras para o sequenciamento de terceira geração (WASFI; AWWAD; AYESH, 2018). O método inicia com a fragmentação do DNA e ligação de adaptadores sem a necessidade de amplificação por PCR para depois passar pelo sequenciamento de nanoporos. A célula de

fluxo do sequenciamento tem micropoços independentes acompanhados de uma bicamada sintética com nanoporos biológicos (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015). A cada base nucleotídica que passa através do poro é captada uma diferença de amplitude de corrente iônica que então é identificada de forma sequencial como pode ser observado na Figura 5 (CHRISTOFF, 2017).

Figura 5. Mecanismo de sequenciamento da plataforma DNA Oxford Nanopore.



Fonte: Adaptado de Christoff (2017).

Apesar dos métodos do sequenciamento completo do genoma (WGS) possibilitarem o sequenciamento em poucas horas em alta velocidade, ferramentas adequadas e eficiência no armazenamento em banco de dados, ainda há dificuldades em interpretar a grande quantidade de dados gerados bem como a complexidade na determinação dos marcadores genéticos mais úteis para a tipagem microbiana (CUNHA, 2016).

Outra abordagem de tipagem por sequenciamento é a Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Loci (MLST, do inglês *Multilocus Sequence Typing*) que analisa as sequências de fragmentos internos de vários genes de referência. Estes fragmentos são codificadores de proteínas essenciais para a manutenção da função celular básica e estáveis com relação à presença de mutações genéticas (CUNHA, 2016). O sequenciamento de fragmentos internos de cada gene analisa entre 400 a 500 pares de base de 6 a 10 genes de referência e permite a obtenção de um perfil para cada gene analisado, denominado alelo, que baseia-se na característica sequencial de nucleotídeos (OAKLEY; GONZALEZ-ESCALONA; MOLINA,

2015). Cada variação de sequência de nucleotídeos encontrada é considerada um alelo distinto e o conjunto destes é denominado de *sequence type* (ST) (CUNHA, 2016).

Os resultados do MLST podem apresentar diferentes expressões fenotípicas em termos de resistência aos antimicrobianos, virulência e patogênese. As análises por MLST podem também contribuir para elucidar a ocorrência de recombinações e de espécies críticas intraespecíficas. Sequências alélicas e perfis ST obtidos são compartilhados em bancos de dados on-line, o que permite a padronização e posteriormente comparação dos dados obtidos com outros estudos (CUNHA, 2016; SANTOS, 2019).

No entanto, a falta de diversidade de genomas completos, bem como a presença de espécies recentemente emergidas, pode produzir resultados de MLST muito limitados em poder discriminatório, onde nem todas as bactérias poderiam ser cultivadas com eficiência (EDERVEEN *et al.*, 2019; PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2013). Além do mais, há dificuldade de uso, falta de agilidade, acessibilidade limitada e o alto custo envolvido (BOCCIA *et al.*, 2015). Desta forma, uma alternativa mais rápida, barata, de fácil uso e alto poder discriminatório para algumas espécies é a Tipagem por Sequenciamento de Único Locus, do inglês *Single-locus Sequence Typing* (SLST), a qual necessita de uma quantidade limitada de DNA a ser sequenciado, mas é imperativo selecionar sequências genéticas que sejam altamente variáveis (BOCCIA *et al.*, 2015). Para esta metodologia, existem várias regiões do gene que podem ser analisadas com grande variabilidade, no entanto, dependendo da espécie bacteriana a ser analisada, utiliza-se inicialmente um marcador específico, não sendo uma técnica padronizada (CUNHA, 2016).

Os marcadores moleculares são sequências de DNA responsáveis por estabelecer quais microrganismos pertencem a uma mesma linhagem evolutiva, estas regiões devem pertencer a uma taxa evolutiva mediana que possua sítios suficientemente variáveis e permitam uma boa resolução filogenética, desta forma são uma ferramenta de fácil detecção e de grande importância na classificação taxonômica e organização de espécies (CHRISTOFF, 2016).

O gene 16S rDNA devido sua presença em todos os procariotos, possui tanto regiões conservadas como variáveis que evoluem em taxas diferentes e fornecem informações essenciais na determinação de relações filogenéticas próximas e distantes, é considerado o padrão ouro para a taxonomia bacteriana (CUNHA, 2016). As nove regiões hipervariáveis do 16S são diferentes entre si e a combinação escolhida pode ampliar a capacidade de identificação de espécies. A região V3 contém maior número de sítios variáveis deste gene podendo ser diferenciada entre a maioria das bactérias e, quando analisado juntamente com a

região V4, possibilita a análise em sequenciamento de nova geração sem necessidade de cultivo prévio (CHRISTOFF, 2016).

Para a identificação de fungos são utilizadas como marcadores as regiões ITS, as quais são regiões de espaçamento entre os três genes, 18S, 5.8S e 28S, e estão entre os melhores marcadores possíveis para esta finalidade. Tem como vantagem o aumento do nível de sensibilidade, visto que as regiões ITS podem chegar a 250 cópias por célula, garantindo a detecção mesmo com pouca presença na amostra (CHRISTOFF, 2016). Desta forma é possível identificar a microbiota de qualquer alimento, entre eles os embutidos fermentados artesanais, emergindo os estudos relacionados à metataxonômica e metagenômica de produtos cárneos fermentados (FERROCINO *et al.*, 2017; FRANCIOSA *et al.*, 2018).

A metataxonômica destaca-se por executar o sequenciamento para a identificação de toda a microbiota de uma amostra através de genes marcadores. Esta metodologia apresenta resultados a nível taxonômico do filo até a espécie do microrganismo identificado, utilizando ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos como o GreenGene e RibosomalDatabase (DE CESARE, 2019; FRANCIOSA *et al.*, 2018). Por outro lado, a metagenômica é uma abordagem que caracteriza o metagenoma e o microbioma sem necessitar de um único gene específico. Esta técnica realiza o sequenciamento tipo *shotgun*, processo que rompe aleatoriamente longas moléculas de DNA e depois sequencia os fragmentos de DNA resultantes vindos de locais diferentes da molécula original. Os dados deste sequenciamento fornecem informações sobre os organismos presentes e os genes funcionais na amostra (DE CESARE, 2019).

Com isso, a aplicação da análise metagenômica tem maior funcionalidade quando utilizada em alimentos que contém uma diversidade de microrganismos elevada (JONES, 2017). Estudos metagenômicos são encontrados para a análise de cárneos, como embutidos fermentados de carne de porco, possibilitando o acompanhamento da microbiota ao longo do processo fermentativo para o melhor entendimento dos microrganismos presentes e comparações de microbiotas naturais ou adicionadas de culturas *starters* (FERROCINO *et al.*, 2017; GIELLO *et al.*, 2018). A identificação de comunidades microbianas em produtos cárneos com o uso destes métodos moleculares, possibilita entender a relação entre os microrganismos, suas atividades e funcionalidades no alimento (FRANCIOSA *et al.*, 2018). Desta forma, entender o desenvolvimento microbiológico ao longo da fermentação do embutido, identificando quais cepas interferem negativamente nas características organolépticas e na deterioração do produto e quais atuam de maneira benéfica na

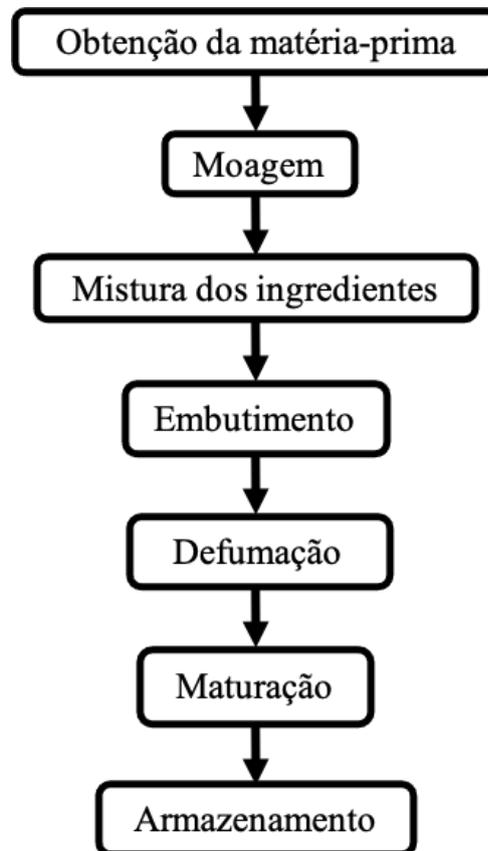
fermentação produzindo compostos responsáveis pela cor e aroma característicos do embutido fermentado artesanal, possibilita o desenvolvimento de culturas *starters* para produtos artesanais, as quais garantem a qualidade higiênica-sanitária e mantenham a qualidade sensorial do produto (FRANCIOSA *et al.*, 2018; FUKA *et al.*, 2020; SANTIYANONT *et al.*, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ELABORAÇÃO DO SALAME

O preparo do embutido cárneo fermentado, representado na Figura 6, foi realizado no outono de 2020 no local de produção tradicionalmente utilizado para o processamento de embutido cárneo artesanal, por produtor artesanal, no extremo oeste de Santa Catarina. O processo iniciou com a obtenção de carne de porco que constituiu 85% da matéria prima. A carne passou pelo processo de moagem e adicionou-se o toucinho previamente moído que constituiu os 15% restantes da matéria prima. Logo após, foi adicionado os demais ingredientes com porcentagem em relação a matéria prima (carne + toucinho), 2,5% de sal refinado extra iodado (Refinaria de Sal Graça LTDA, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil), 0,03% pimenta preta (Valar Indústria de Alimentos, São Miguel do Oeste, Santa Catarina, Brasil), 0,015% de alho (produtor artesanal), 0,12% de açúcar (Estrela, Usina Passa Tempo, Rio Brilhante, Mato Grosso do Sul, Brasil) e 5mL de vinagre a cada Kg (produtos artesanal). Então homogeneizou-se a massa e realizou-se o embutimento em tripa natural seca de bovino calibre 42 (Vita envoltórios, Getúlio Vargas, Rio Grande do Sul, Brasil) previamente higienizada. Este processo foi realizado para a obtenção das amostras do tempo 0, 14 e 28 dias de maturação realizadas em triplicata com peso aproximado de 200g cada.

Após o embutimento, as amostras do tempo 0 de maturação foram embaladas e armazenadas à -18°C para posterior análise. As amostras dos tempos 14 e 28 dias foram defumadas por 3h sob fumaça intensa. Então as amostras foram levadas a um local arejado onde ficaram ao longo do período de maturação para posterior procedimento de armazenagem conforme descrito para o tempo 0 anteriormente.

Figura 6. Fluxograma de produção de salame artesanal

Fonte: Do autor (2020).

3.2 ANÁLISE METAGENÔMICA

As amostras do tempo 0, 14 e 28 dias de maturação foram descongeladas e utilizando-se bag estéril, pesou-se uma alíquota de 25 g da amostra a qual foi homogeneizada com 225 mL de solução salina triptonada. Posteriormente, a extração de DNA foi realizada utilizando-se a técnica de beads magnéticas, com um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). A identificação de bactérias nos tempos 0, 14 e 28 dias foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para região V3-V4 do gene rRNA 16S, 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) (WANG; QIAN, 2009)) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (CAPORASO *et al.*, 2012). A reação de PCR foi realizada em triplicata utilizando Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, EUA) com as

seguintes condições: 95 °C por 5min, 25 ciclos de 95 °C por 45s, 55 °C por 30s e 72 °C por 45s e uma extensão final de 72 °C por 2min. A preparação da biblioteca (anexo de adaptadores TruSeq, purificação com esferas AMPureXP e a quantificação por qPCR) foi realizada usando o protocolo de preparação da biblioteca Illumina 16S (nota técnica Illumina 15044223 Rev. B) (MENEZES *et al.*, 2020). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*.

3.3 BIOINFORMÁTICA

As sequências foram analisadas por meio de um *pipeline* proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Resumidamente, todas as sequências de DNA resultantes do sequenciamento passaram, individualmente, por um filtro de qualidade, utilizando como base o somatório das probabilidades de erro de suas bases, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. Posteriormente, foram removidas as sequências de DNA correspondentes aos adaptadores da tecnologia Illumina. As sequências que passaram pelos procedimentos iniciais e que tiveram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/*clusters* e foram utilizadas para identificação taxonômica, por comparação com banco de dados de sequências acuradas de 16S rRNA (NeoRef, Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). A fim de avaliar as mudanças da comunidade microbiana entre as amostras, unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram somados nos mesmos gêneros e a abundância relativa de cada gênero foi comparada com um mapa de calor no pacote de software Quantitative Insights into Microbial Ecology (Qiime).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

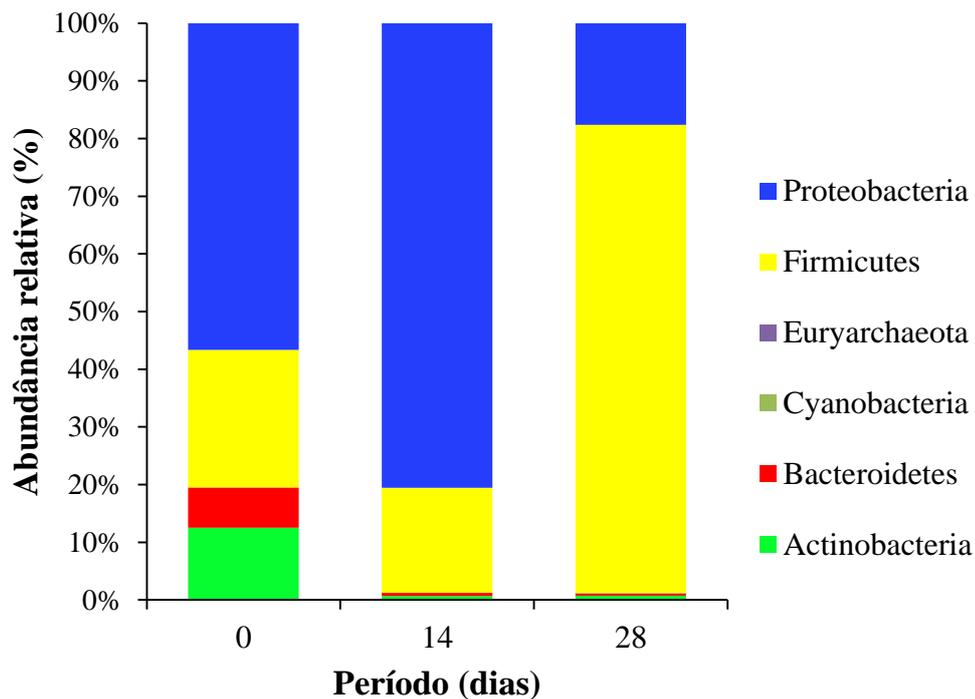
Através da análise metagenômica foram encontrados 335.024 *reads* dos quais apenas 784 estavam presentes antes do início da maturação, quantidade menor que as encontradas para os dias 14 e 28 de maturação, com 167.664 e 166.576 *reads*, respectivamente. *Read* é o resultado obtido após o sequenciamento de genomas através de métodos de sequenciamento de alto desempenho, corresponde a sequências de poucos pares de base provenientes do DNA previamente extraído, correlacionando a qual espécie estes pares de base pertencem a fim de identificar o organismo presente. Ao encontrar os organismos nos quais pertencem os *reads* torna-se possível a análise da quantidade e diversidade dos organismos encontrados, identificando possíveis genes de interesse industrial ou clínica (PEREIRA, 2014).

A complexidade da microbiota inicial do embutido cárneo fermentado é algo esperado uma vez que possivelmente a microbiota do ambiente onde ocorreu a elaboração do salame também apresenta-se complexa. A microbiota inicial do produto está correlacionada com o material da superfície nos quais foram processadas as amostras após a etapa de abate, além dos utensílios utilizados no processamento do salame, a microbiota presente no ar e a microbiota superficial das peças cárneas. Além disso, superfícies porosas podem apresentar maior aderência de bactérias com possível formação de biofilmes uma vez que estes materiais dificultam a limpeza completa e adequada (STELLATO *et al.*, 2016).

A abundância relativa de microrganismos classificados quanto aos filos presentes nas amostras de salame provenientes do tempo 0, 14 e 28 dias de maturação podem ser observados na Figura 7. Na amostra de salame coletada antes do início da maturação (Dia 0), destacou-se o filo Proteobacteria como o mais abundante na amostra (56,63%), seguido dos filos Firmicutes (23,85%), Actinobacteria (12,50%) e Bacteroidetes (7,02%). Enquanto isso, na amostra com 14 dias de maturação, houve um aumento na abundância relativa de bactérias do filo Proteobacteria (80,56%), seguida dos filos Firmicutes (18,19%), Actinobacteria (0,69%), Bacteroidetes (0,54%) e Cyanobacteria (0,02%). Lv *et al.* (2019) em estudo sobre a abundância microbiana em carnes ácidas, também observaram que o filo Proteobacteria apresentou maior abundância nos primeiros dia de maturação (89,19%). Por outro lado, o salame com 28 dias de maturação, apresentou maior abundância do filo Firmicutes (81,22%), seguido dos filos Proteobacteria (17,60%), Actinobacteria (0,75%), Bacteroidetes (0,39%), Cyanobacteria (0,02%) e Euryarchaeota (0,01%). Desta forma, pode-se perceber que entre os dias 14 e 28 de maturação as bactérias do filo Firmicutes desenvolveram-se com mais

intensidade, sendo as responsáveis pela finalização do processo, assim como observado por Lv *et al.* (2019) onde a presença do filo Firmicutes atingiu 95% das unidades taxonômicas operacionais (OTUS) ao final dos 28 dias de fermentação de carne ácida.

Figura 7. Abundância relativa de filos presentes no salame artesanal ao longo do tempo de maturação.



Fonte: Do autor (2020).

Em relação à abundância dos gêneros de bactérias na amostra de salame no tempo 0 (Figura 8a) foi possível constatar que os gêneros mais abundantes foram *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *Bacillus* spp. dos quais os dois primeiros gêneros são pertencentes ao filo Proteobacteria, filo mais abundante desta amostra, e os dois últimos gêneros pertencentes ao filo Firmicutes, segundo gênero mais abundante desta amostra. Por outro lado, Fuka e colaboradores (2020) encontraram *Bacillus* spp. como o gênero mais abundante no início da maturação em embutidos fermentados de carne de caça destacando este como um dos gêneros com potencial de deterioração do produto. No entanto, nem sempre este gênero está relacionado a deterioração de alimentos ou intoxicação alimentar, isso porque algumas espécies deste gênero também apresentam potencial probiótico podendo trazer

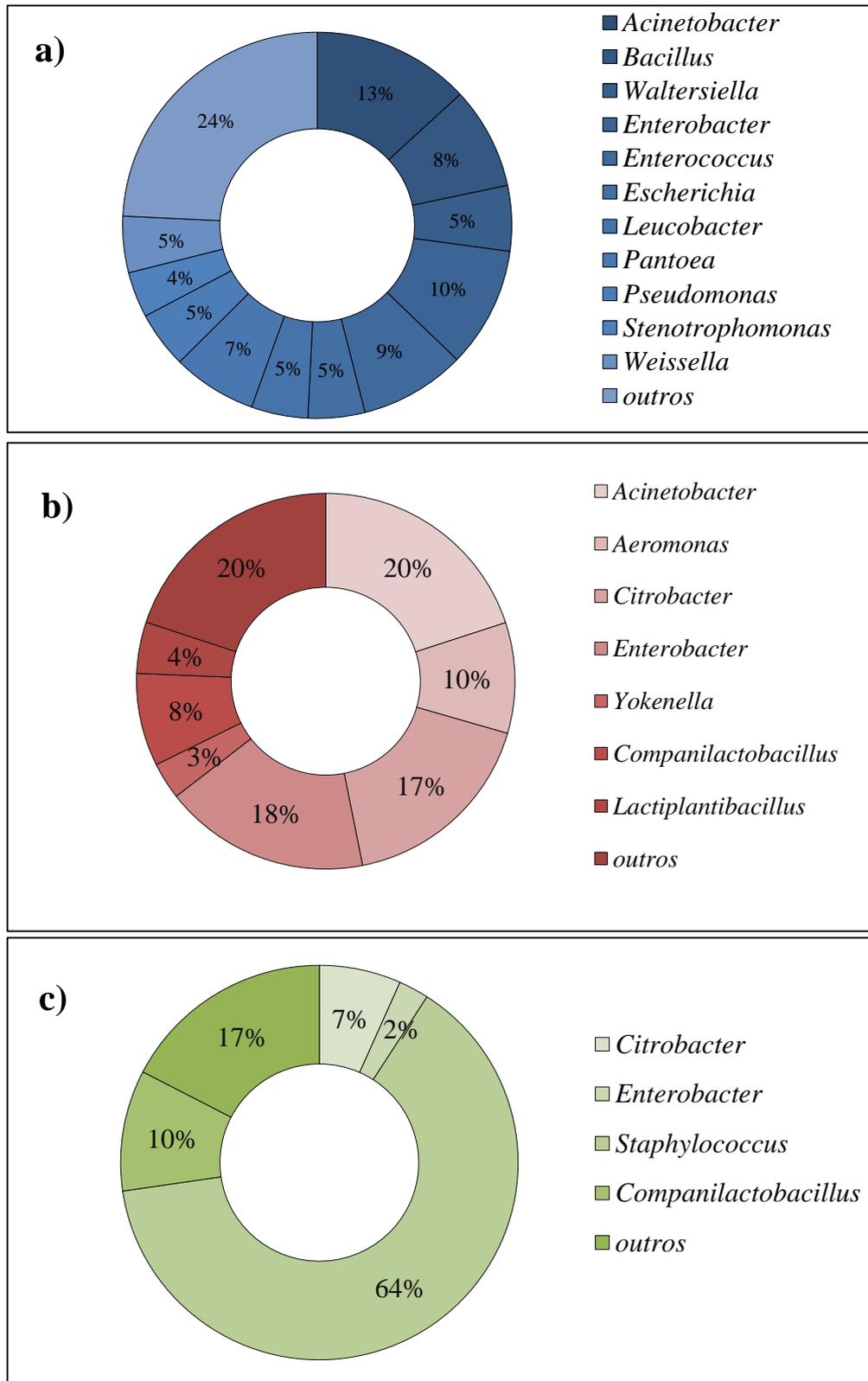
benefícios a saúde do consumidor (ABRIOUEL *et al.*, 2011). Desta forma torna-se interessante a investigação das espécies presentes ao longo da fermentação do embutido.

A presença de *Bacillus clausii* relatada no salame do dia 0 de maturação como uma das espécies de maior abundância (4,5%) (Figura 9), poderia ser relatada com grande interesse para a indústria de alimentos devido as suas propriedades probióticas e produção de protease alcalina (DOS SANTOS; AMÊNDOLA; DOS SANTOS, 2019; SANTOS, 2018; VARGAS, 2019). No entanto, seu crescimento em embutidos cárneos fermentados é indesejável em razão de seu metabolismo, o qual consome glicose produzindo amônia. Posteriormente, devido a grande quantidade de proteína presente no meio este induz a produção de protease alcalina, aumentando o pH do alimento podendo favorecer o crescimento de microrganismos patógenos e outros indesejáveis (TABANDEH *et al.*, 2011).

A presença de *Enterococcus* spp. e *Acinetobacter* spp. nas amostras antes do início da maturação pode ser justificada uma vez que estes são grupos de microrganismos que estão presentes em grandes concentrações na microflora nativa de carnes cruas (GUERRERO-LEGARRETA, 2014). As espécies de bactérias encontradas com maior abundância relativa no salame antes do início da maturação pertencentes a estes gêneros são *Enterococcus casseliflavus* (7,6 %), *Enterococcus cloacae* (5,6 %) e *Acinetobacter baumannii* (6,1 %).

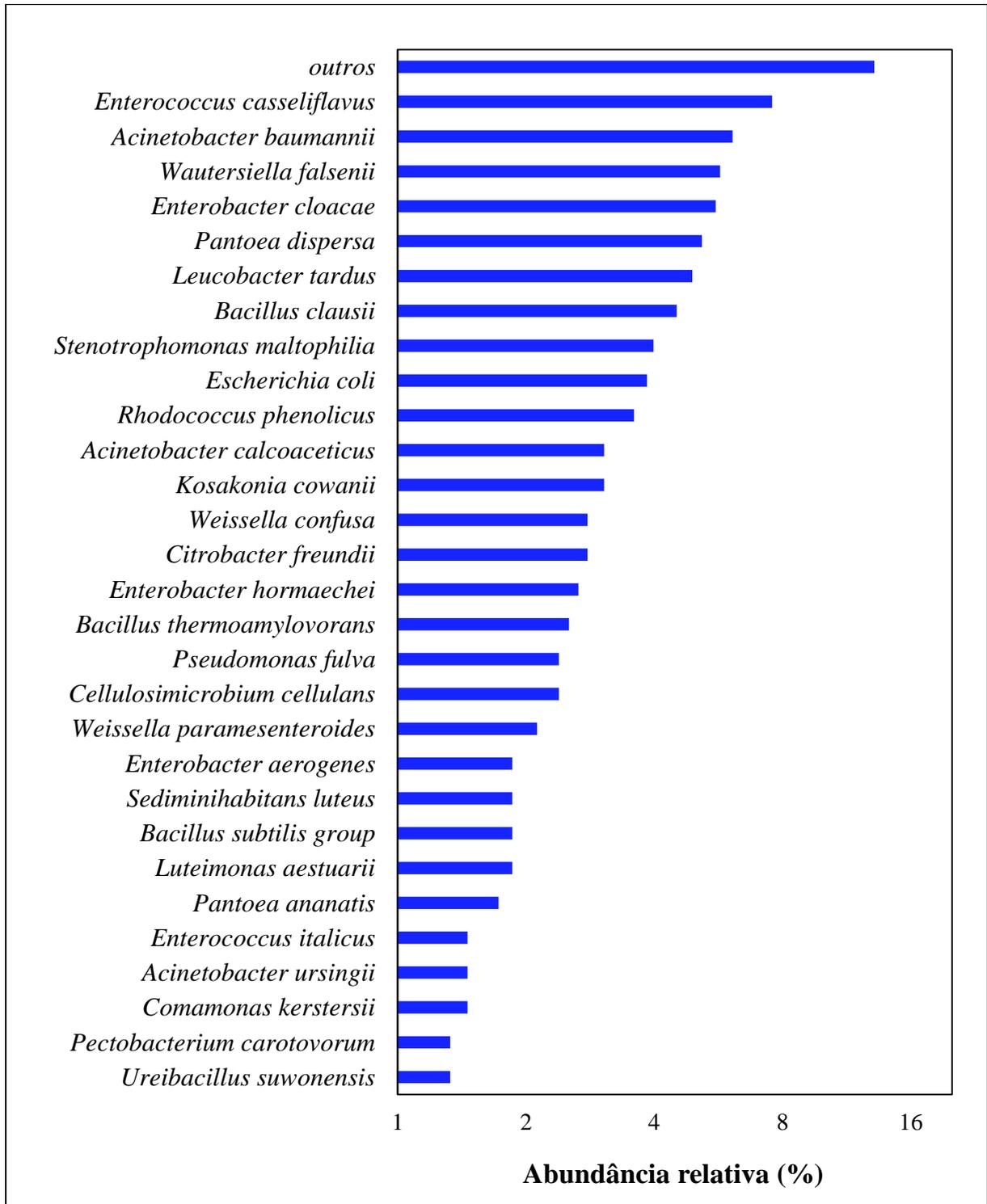
A abundância relativa de *Enterococcus cloacae* pode ter sido proveniente de contaminação através do solo ou água e presença em biofilmes nos equipamentos utilizados para o abate e produção do salame e seu desenvolvimento ao longo do processo fermentativo pode ocorrer devido a sua capacidade de fermentar glicose (DAVIN-REGLI; PAGÃS, 2015; MEZZATESTA; GONA; STEFANI, 2012; NYENJE *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2011; PINHEIRO; COITINHO; STOPIGLIA, 2017). Enquanto isso, a presença de *Enterococcus casseliflavus* em alimentos, bactéria com maior abundância relativa no início da maturação do salame artesanal, pode ter ocorrido de forma endógena, proveniente do próprio animal, ou exógena, ocasionada pela contaminação do abate até o final do processamento, através do solo, água, equipamentos e operadores. Pertencem ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL), apresentando um papel importante na etapa de fermentação do alimento (FALCÃO, 2018).

Figura 8. Gêneros de bactérias mais abundantes no salame com 0 (a), 14 (b) e 28 (c) dias de maturação.



Fonte: Do autor (2020).

Figura 9. Abundância relativa das espécies bacterianas presentes no salame sem maturação (dia 0).



Fonte: Do autor (2020).

Há relatos da presença de *Enterococcus casseliflavus* em carne de frango, leites e derivados atuando como BAL e apresentando capacidade inibitória de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* as quais não estiveram presentes no salame artesanal naturalmente fermentado em nenhum dia ao longo do período de maturação (GOMES, 2013). Desta forma, a presença de *E. casseliflavus* no salame no tempo zero de maturação representa um potencial de seu crescimento e possivelmente um auxílio na inibição de crescimento de determinados patógenos, auxiliando na segurança do produto final.

A espécie *Acinetobacter baumannii* pode estar presente devido as condições de manejo do animal, forma de abate, forma de processamento e embalagem do alimento. Foi relatada sua presença em carnes *in naturas* como peito de peru, peito de frango e carne bovina recém cortada, que podem atuar como veículo de transmissão desse patógeno (CARVALHEIRA *et al.*, 2017; FAROUK *et al.*, 2020; KOZIŃSKA *et al.*, 2014; SANTIYANONT *et al.*, 2019).

Outras espécies não correlacionadas com os gêneros mais abundantes, mas que destacaram-se por suas abundâncias relativas no início do processo fermentativo (tempo 0) são *Wautersiella falsenii* (5,7 %), *Pantoea dispersas* (5,2 %), *Leucobacter tardus* (4,9 %), *Stenotrophomonas maltophilia* (3,9 %), e *Escherichia coli* (3,9 %). A presença de *Wautersiella falsenii*, anteriormente denominada de *Empedobacter falsenii* pode estar correlacionada com tábuas de cortes de madeira e de plástico utilizadas no processamento do salame (ABDUL-MUTALIB *et al.*, 2015). Essa espécie de bactéria apresenta potencial de crescimento ao longo do período de maturação do salame uma vez que fermentam glicose, substrato presente na formulação do salame (COLLINS *et al.*, 2018; ZAMAN *et al.*, 2017; ZENG *et al.*, 2020).

Outra consequência das possíveis más condições higiênico-sanitárias do local de processamento é a presença de *Stenotrophomonas maltophilia*, anteriormente isolada em carne de porco (PERUZY *et al.*, 2020). Podem ser provenientes de biofilmes nas superfícies e equipamentos, os quais quando presentes são mais resistentes a ação de sanitizantes, a qual, juntamente com uma higienização inadequada dos equipamentos, pode ter causado a contaminação. Por não apresentarem metabolismo fermentativo tendem a diminuir a sua abundância ao longo do período de maturação, característica esperada uma vez que este microrganismo tem potencial patogênico (BROOKE, 2012; LOONEY; NARITA; MÜHLEMANN, 2009).

Escherichia coli também encontrada no salame no início da maturação tem sua abundância correlacionada com a possível contaminação na evisceração, má condição de higienização das mãos dos operadores no processo de abate e elaboração dos embutidos cárneos fermentados (BUSCONI; ZACCONI; SCOLARI, 2014; CHARLERMROJ *et al.*, 2019; DE CARVALHO, 2014; HESSAIN *et al.*, 2015; SCHAFFNER; SMITH-SIMPSON, 2014). Há relatos da presença de *E. coli* em salames coloniais comercializados em feiras livres e também fermentados espontaneamente. Porém, a concentração desta espécie tende a diminuir ao longo da fermentação devido à presença de bactérias fermentadoras com produção de ácido lático que acidificam o meio (BUSCONI; ZACCONI; SCOLARI, 2014; POŁKA *et al.*, 2015; SETTANNI *et al.*, 2020).

A presença de bactérias indesejáveis no produto no início da maturação pode estar relacionada não somente às condições higiênicas do local e dos operadores, mas também podem ser devido à contaminação pela microbiota presente nas matérias-primas (STELLATO *et al.*, 2016). *Pantoea dispersas*, anteriormente conhecida como *Enterobacter agglomerans*, foi relatada entre as nove espécies mais abundante no início da maturação de salame, e pode ter sido proveniente do vinagre artesanal adicionado como matéria prima do salame uma vez que esta faz parte da microbiota presente em uvas saudáveis e também já foi encontrada em vinhos, apesar de sofrer redução durante a fermentação do mosto (FUDGE *et al.*, 2016; NISIOTOU *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2018).

Apesar da presença de bactérias potencialmente patogênicas, vale ressaltar que a quantidade de *reads* encontradas em cada espécie presente no salame do dia 0 foram inferiores as encontradas para os dias 14 e 28 de maturação (Tabela 3). Estes resultados demonstram uma microbiota com grande diversidade, mas com baixa concentração de bactérias as quais não necessariamente se apresentavam viáveis e com potencial de multiplicação uma vez que estamos analisando a presença do DNA e não da viabilidade das mesmas.

Tabela 3. Quantidade de sequências identificadas das espécies mais abundantes ao longo do período de maturação.

Espécies	Sequências		
	<u>Dia 0</u>	<u>Dia 14</u>	<u>Dia 28</u>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	46	831	1151
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	7	5444	446
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	23	177	241
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	5	4251	247
<i>Acinetobacter tandoii</i>	9	13743	245
<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	0	1273	178
<i>Acinetobacter ursingii</i>	11	231	148
<i>Acinetobacter venetianus</i>	0	5371	1027
<i>Aeromonas dhakensis</i>	0	9515	42
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	2579	66
<i>Aeromonas veronii</i>	3	2981	115
<i>Aquitalea magnusonii</i>	0	1131	387
<i>Bacillus clausii</i>	34	285	254
<i>Bacillus subtilis group</i>	14	453	373
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	19	39	24
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	18	236	124
<i>Citrobacter freundii</i>	21	25391	9363
<i>Citrobacter murlinae</i>	4	1898	656
<i>Citrobacter werkmanii</i>	0	1790	1023
<i>Comamonas kerstersii</i>	11	230	255
<i>Companilactpbacillus farciminis</i>	0	13118	16180
<i>Enterobacter aerogenes</i>	14	17411	1298
<i>Enterobacter cloacae</i>	42	11916	2554
<i>Enterobacter hormaechei</i>	20	166	194
<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	0	7531	1717
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	57	615	675
<i>Enterococcus italicus</i>	11	26	46
<i>Escherichia coli</i>	29	4	6
<i>Kluyvera ascorbata</i>	0	2507	282
<i>Kosakonia cowanii</i>	23	55	113
<i>Lactiplantibacillus plantarum sbsp. plantarum</i>	0	4276	1512
<i>Lactiplantibacillus xiangfangensis</i>	0	3140	1580
<i>Leucobacter tardus</i>	37	28	33
<i>Ligilactobacillus acidipiscis</i>	0	423	1124
<i>levilactobacillus brevis</i>	0	1475	1848
<i>Luteimonas aestuarii</i>	14	43	114
<i>Morganella morgani</i>	0	1109	584
<i>Pantoea ananatis</i>	13	27	67

<i>Pantoea dispersa</i>	39	199	380
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	10	4	20
<i>Pseudomonas fulva</i>	18	86	143
<i>Raoultella terrigena</i>	0	1036	36
<i>Rhodococcus phenolicus</i>	27	0	14
<i>Sedimihabitans luteus</i>	14	0	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	68	103588
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	807	1718
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	30	1142	199
<i>Ureibacillus suwonensis</i>	10	12	12
<i>wautersiella falsenii</i>	43	203	139
<i>Weissella confusa</i>	21	282	242
<i>Weissella paramesenteroides</i>	16	270	160
<i>Yokenella regensburgei</i>	1	5308	1526
outros	69	16528	12107

Fonte: Do autor (2020).

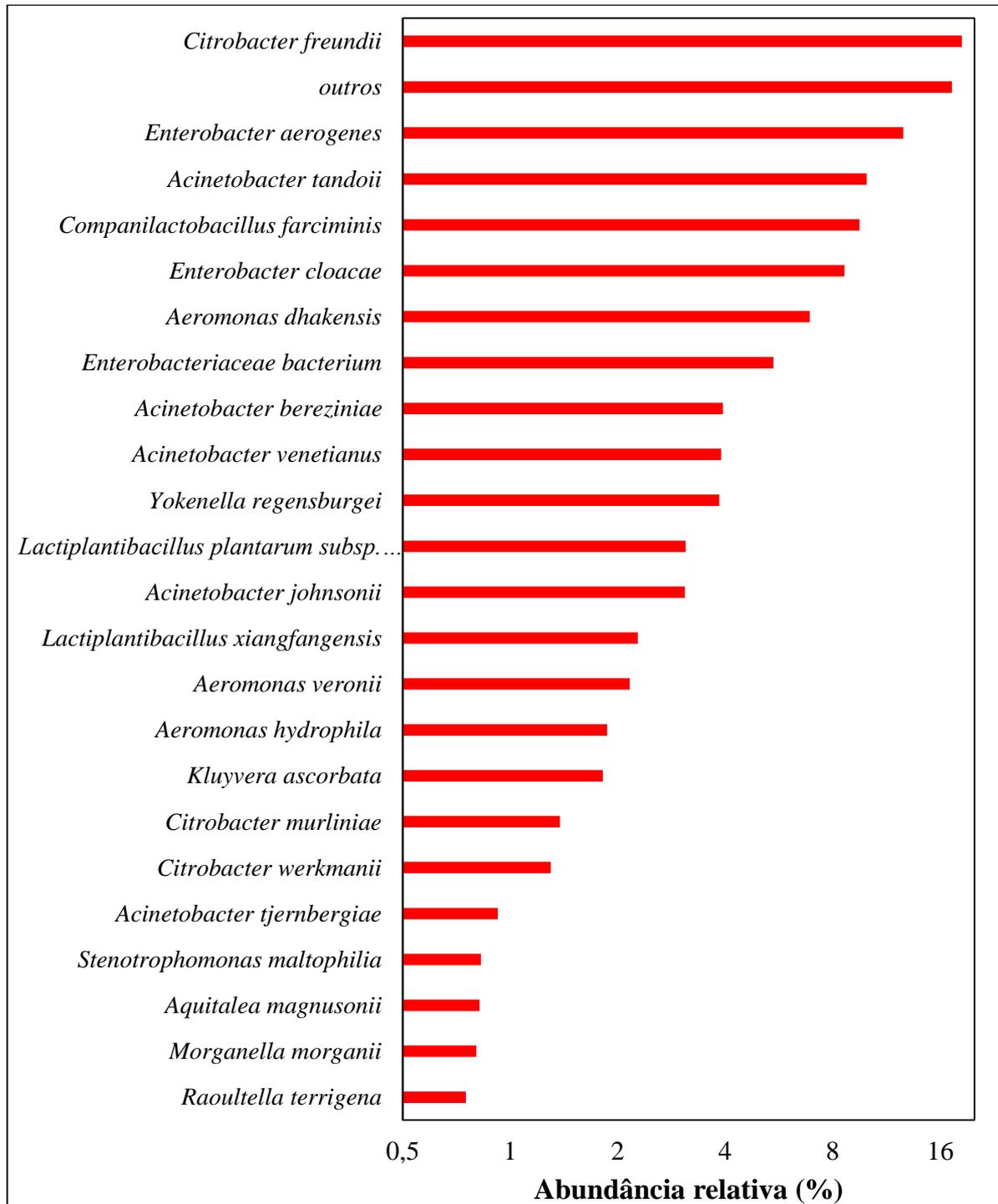
Com o início do processo de fermentação do produto e chegando ao 14º dia de maturação os gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Lactobacillus* e *Aeromonas* apresentaram-se com maior abundância relativa (Figura 8b). *Acinetobacter* spp. apresentou maior abundância no salame com 14 dias de maturação (8b) e pode ter seu desenvolvimento no início do processo de maturação justificado devido a capacidade deste gênero em utilizar diferentes fontes de carbono como hidrocarbonetos, álcoois, aminoácidos, ácidos alifáticos, açúcares pentoses e componentes aromáticos, além de apresentarem crescimento em diferentes condições de pH, temperatura e altas taxas de umidade (CHAGAS, 2015). Além disso, as bactérias pertencentes ao *Citrobacter* spp. também são fermentadores de glicose produzindo ácidos orgânicos e para seu desenvolvimento requerem atividade de água acima de 0,95 e pH superior a 4,5. Estes microrganismos são bons indicadores de níveis de higiene no processo de produção de alimentos, indicando práticas de higiene precária que podem estar relacionadas a todo o processo produtivo do salame (FEINER, 2006). Outro gênero que também pode ser relacionado a segurança do alimento é *Enterobacter* spp. Este gênero, encontrado em ambas as amostras (Dia 0 e Dia 14), apresenta-se em grande quantidade de alimentos, uma vez que crescem em uma ampla faixa de temperatura e fermentam carboidratos produzindo ácidos orgânicos, sendo responsável pelo desenvolvimento de sabor estranho, produção de gás e formação de limo em derivados cárneos como subprodutos metabólicos, causando danos no produto final (FEINER, 2006).

A espécie *Citrobacter freundii*, apresentou aumento de 3% para 10% ao longo dos 14 dias iniciais de maturação na amostra de salame (Figura 10). Seu desenvolvimento bem como o desenvolvimento de *E. cloacae* (8,6 %) e *E. aerogenes* (12,6 %) no salame do dia 14 (Figura 10) está correlacionado a descarboxilação de aminoácidos com possível produção de aminas biogênicas. Aminas biogênicas como a putrescina podem ser produzidas por *C. freundii*, e a histidina por *E. aerogenes* e *E. cloacae* e, quando ingeridas em altas concentrações, podem ocasionar dores de cabeça, problemas gástricos e intestinais ao consumidor (DURLU-ÖZKAYA; AYHAN; VURAL, 2001). Além disso, em embutidos fermentados as duas últimas espécies citadas geralmente se apresentam em baixas quantidades, porém quando presente em grande abundância nesses produtos é explicado por um possível armazenamento inadequado da matéria prima, ou fermentação incorreta, aumentando assim a descarboxilação no início da fabricação (SARKADI, 2020). Desta forma, pode-se supor que o processo de produção, bem como as condições fornecidas para a fermentação ao longo da maturação até o 14º da de maturação, favoreceram o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis caracterizando-se como uma fermentação não ideal.

Aeromonas spp. presente de maneira abundante na amostra de salame no dia 14 (Figura 8b) também pode estar diretamente ligado com as condições de manuseio e processamento da carne e gordura, da lavagem da carcaça com água contaminada, bem como a falta de higienização adequada ao longo da elaboração do produto (STRATEV; VASHIN; RUSEV, 2012). Uma abordagem para reduzir a contagem de *Aeromonas* spp. é escaldar a superfície interna e externa de carcaças com água à 80°C no processo de abate, cuidando para não haver recontaminação durante o manuseio e processamento adicionais como na maturação (LEVIN, 2014). No entanto este processo deve ser feito com temperaturas de 62 à 72 °C conforme Portaria do MAPA N° 1.304, de 7 de agosto de 2018 (BRASIL, 2018). Outro estudo também encontrou *Aeromonas* spp. como dominantes no início do processo do embutido fermentado, porém ao longo da fermentação este gênero não apresentou-se com concentrações significativas (LV *et al.*, 2019). O desenvolvimento de *Aeromonas* no início do processo fermentativo está relacionado ao pH e níveis de sal insuficientes para a inibição do seu desenvolvimento, porém a medida que ocorre o abaixamento do pH o crescimento de *Aeromonas* tende a diminuir. Vale ressaltar que diversas espécies deste gênero apresentam-se como um agente emergente de doenças transmitidas por alimentos e requerem atenção quando

presentes nos produtos prontos para o consumo tornando interessante o estudo das espécies presentes no produto final (FONTES *et al.*, 2012).

Figura 10. Espécies com maior abundância relativa presentes no salame com 14 dias de fermentação.



Fonte: Do autor (2020).

Aeromonas dhakensis (6,9 %) também apresenta-se como microrganismo indesejável no 14º dia de maturação devido seu potencial patogênico. Até o momento, não há relatos de *A. dhakensis* em embutidos cárneos fermentados, mas seu aparecimento no salame artesanal naturalmente fermentado pode ter ocorrido pela contaminação através da água utilizada no processamento e manipulação dos embutidos cárneos fermentados ao longo da maturação com possível crescimento devido sua capacidade de realizar fermentação (CHEN; LAMY; KO, 2016; LAU *et al.*, 2020; ZHONG *et al.*, 2019).

Por outro lado, ao longo do processo fermentativo ocorre o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas (BAL) como, por exemplo, os anteriormente denominados *Lactobacillus* (que agora também fazem parte de outros gêneros após reclassificação) (ZHENG *et al.*, 2020), *Micrococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Estes gêneros anteriormente pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, também presentes em grande quantidade no salame do dia 14 (Figura 8b) tem a capacidade de fermentar os açúcares presentes produzindo ácido láctico, baixando o pH do produto e conseqüentemente fazendo com que as fibras da carne desidratem-se, acelerando esse processo. O seu desenvolvimento contribui para o controle de desenvolvimento de microrganismos indesejáveis como patogênicos e deteriorantes citados anteriormente, melhora a cor e caracterizando o sabor ácido do produto final (SENER, 2014). Desta forma, recomenda-se que seja utilizado leite em pó na formulação do salame, o que não foi realizado neste estudo. O uso do leite em pó pode ser justificado devido a incapacidade de algumas bactérias patogênicas e deteriorantes de metabolizar a lactose, característica esta das bactérias ácido lácticas (TERRA; FRIES; TERRA, 2004). Sendo assim, quando a lactose é utilizada em substituição à sacarose é possível verificar um aumento na quantidade de bactérias ácido lácticas, com conseqüente diminuição de patógenos e deteriorantes (DEDUCH, 2018; KRÖCKEL *et al.*, 2003).

No salame com 14 dias de maturação podemos perceber uma crescente abundância de *Companilactobacillus* spp., anteriormente pertencente ao gênero *Lactobacillus*, que continua sua multiplicação e abundância até o 28º dia de maturação (Figura 10). Outros estudos demonstraram maior abundância do anteriormente denominado *Lactobacillus* spp. em embutidos cárneos fermentados produzidos com carnes de porco e de diferentes espécies como veado e javali em comparação ao nosso trabalho (FERROCINO *et al.*, 2017; FUKA *et al.*, 2020; POŁKA *et al.*, 2015). Vale ressaltar que, apesar de apresentar abundância relativa de 14% em conjunto (Figura 8b), as bactérias ácido lácticas dos gêneros *Companilactobacillus* spp., *Lactiplantibacillus* spp., *Ligilactobacillus* spp. e *Levilactobacillus* spp. não foram

dominantes ao longo da fermentação e outras bactérias ácido lácticas apresentaram pouca ou nenhuma abundância relativa. Desta forma, uma vez que a presença de BAL não apresenta uma abundância dominante nas amostras de salames fermentados naturalmente, ou seja, sem uso de cultura *starter*, o tempo para conseguir o pH adequado para inibição do desenvolvimento de microrganismos patogênicos se torna maior e, conseqüentemente alguns microrganismos indesejáveis podem se desenvolver no alimento (SENER, 2014).

Apesar de grande parte das espécies relatadas na maturação no 14º dia apresentarem-se com crescimento indesejável no salame, a espécie *Companilactobacillus farciminis* apresentou a quarta maior abundância relativa nessa amostra (9,5 %). Esta espécie apresenta características desejáveis com potencial de desenvolvimento ao longo do período de maturação. É uma bactéria do grupo BAL que faz parte da microbiota natural de embutidos cárneos fermentados espontaneamente (POLKA *et al.*, 2015; TU *et al.*, 2010). Essa bactéria apresenta papel importante para esse produto, pois é responsável pela diminuição do pH que auxilia na segurança microbiológica final dos salames. Esta reação ocorre juntamente com a produção de bacteriocinas, que garante a estabilidade e firmeza do embutido, além de produzirem compostos voláteis e possuem atividade proteolítica (ASPRI; TSALTAS, 2020). Além disso, apresentam capacidade de redução de nitrato a nitrito que auxilia na formação de cor, sabor e odor inicial e atua no hospedeiro com potencial probiótico que, quando administrados em quantidades adequadas, pode trazer benefícios ao consumidor apresentando potencial para sua aplicação como cultura *starter* (FELDMANN, 2015; SAYAS-BARBERÁ *et al.*, 2012).

Ao final do processo de maturação (dia 28), apesar de haver abundância significativa de *Companilactobacillus* spp. (10%), houve maior abundância de *Staphylococcus* spp. (63%) (Figura 8c), característica já esperada uma vez que o processo fermentativo ocorreu por vias naturais, e foi semelhante ao relatado por Wang e colaboradores (2018). Estes e outros microrganismos, quando coagulase negativa, representam um papel importante ao final da maturação uma vez que produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas responsáveis pela liberação de compostos de baixo peso molecular como peptídeos, aminoácidos, aldeídos, aminas e ácidos graxos livres, modificando o perfil aromático do produto final (COCOLIN; RANTSIOU, 2012).

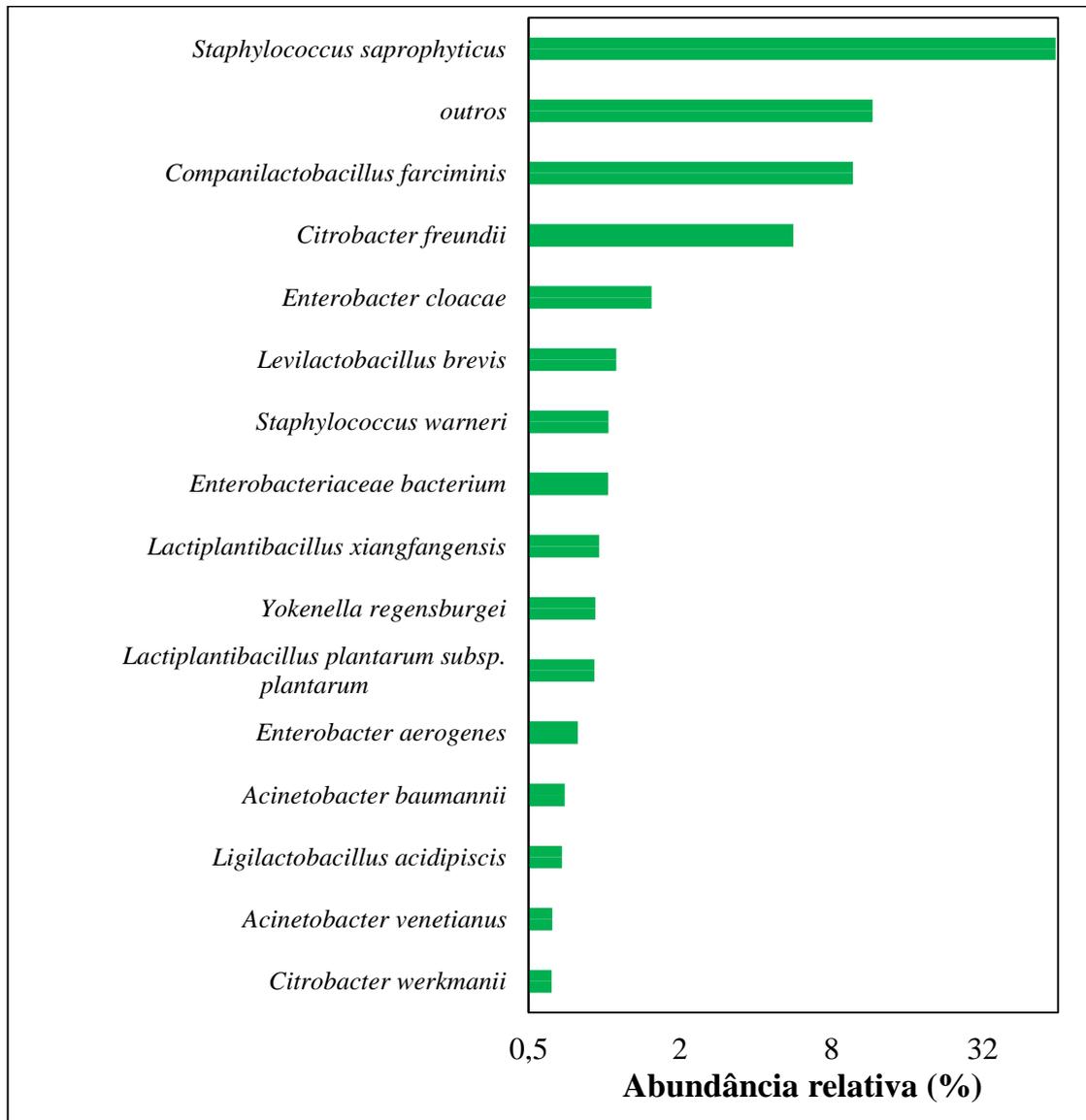
C. farciminis apresentou desenvolvimento até o 28º dia de maturação (9,8 %), atuando no processo fermentativo juntamente com *Staphylococcus saprophyticus*, espécie com maior abundância no 28º dia (62,6 %), auxiliando até o final do processo fermentativo

(Figura 11). *S. saprophyticus* é uma bactéria considerada contaminante comum em alimentos de origem animal (SOMMERS *et al.*, 2017; WIDERSTRÖM *et al.*, 2012). Além disso, é coagulase negativa e não apresenta atividade de redução de nitrito, porém ao longo do processo fermentativo apresenta produção de compostos voláteis, e rápida taxa de acidificação o que auxilia no abaixamento de pH e maior segurança microbiológica do produto (SÁNCHEZ MAINAR; STAVROPOULOU; LEROY, 2017). Há relatos de sua presença em embutidos naturalmente fermentados taiwandêses e em salames artesanais apresentando-se entre as espécies mais abundantes (CHARMPI *et al.*, 2020; TU *et al.*, 2010). Porém, uma vez que este microrganismo apresenta potencial patogênico, sua adição como cultura *starter* não deve ser recomendada e sua presença avaliada com cautela.

Neste estudo não foram utilizados sais de cura par a fabricação de salame artesanal. Porém, conforme recomendado por outros autores, a utilização de sais de cura, como nitrito e nitrato de sódio ou de potássio, na formulação do embutido cárneo fermentado poderia auxiliar no controle microbiológico, tornando o alimento seguro para o consumo (LIPSKI, 2017; PEREIRA; BARCELLOS; BERSOT, 2019). Esses sais apresentam capacidade inibitória de microrganismos patogênicos, inibindo o crescimento de células vegetativas e seus esporos através da formação de ácido nitroso e a reação de seus compostos (GUEVARA, 2014). Além disso, a utilização de sais de cura auxiliam na formação de sabor e aroma característico e protegem o produto da oxidação lipídica (DE CARVALHO, 2014).

Vale ressaltar que o uso de método genotípico para a identificação dos microrganismos presentes no salame tornou possível a identificação de espécies de microrganismos presentes que possivelmente não poderiam ser detectados utilizando métodos tradicionais de identificação microbiana. Isto porque somente microrganismos facilmente cultiváveis seriam detectados em métodos tradicionais, enquanto os que necessitam de meios de cultura mais complexos ou que se encontravam injuriados não seriam quantificados (RANTSIOU *et al.*, 2005).

Figura 11. Espécies com maior abundância relativa presentes no salame com 28 dias de fermentação.



Fonte: Do autor (2020)

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o salame artesanal fermentado espontaneamente apresentou uma grande diversidade ao longo do período de maturação com desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e possíveis patógenos. No entanto, com a acidificação do meio ao longo do processo fermentativo houve a redução de patógenos e deteriorantes com o surgimento de bactérias ácido lácticas. Desta forma, *Companilactobacillus farciminis* destacou-se como bactéria ácido láctica presente nos dias 14 e 28 dias de maturação, sendo responsável por grande parte do desenvolvimento das características sensoriais do salame artesanal, apresentando potencial para possível aplicação como cultura *starter*.

6 REFERÊNCIAS

ABDUL-MUTALIB, Noor-Azira *et al.* Pyrosequencing analysis of microbial community and food-borne bacteria on restaurant cutting boards collected in Seri Kembangan, Malaysia, and their correlation with grades of food premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 57–65, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.022>

ABRIOUEL, Hikmate *et al.* Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 1, p. 201–232, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>. Acesso em: 21 out. 2020.

ASPRI, Maria; TSALTAS, Dimitrios. Microbes and the environment. *In: The Interaction of Food Industry and Environment*. Elsevier, 2020. p. 119–154. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816449-5.00004-7>

BOCCIA, Stefania *et al.* Molecular epidemiology tools in the management of healthcare-associated infections: Towards the definition of recommendations. **Epidemiologia e Prevenzione**, v. 39, n. 4, p. 21–26, 2015.

BRASIL. Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Brasil: **Diário Oficial da União**, Brasília, 2019.

BRASIL, Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. Instrução Normativa Nº 22, de 31 de julho de 2000. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabres, de Sal. Brasil: **Diário Oficial da União**, Brasília, 2000.

BRASIL, Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. **Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasil: [s. n.], 2017.

BRASIL, Ministério da agricultura pecuária e avastecimento. *Portaria nº 1.304, de 7 de agosto de 2018*. **Diário oficial da União**, Brasília, 2018.

BROOKE, J. S. Stenotrophomonas maltophilia: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 2–41, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>

BUSCONI, Matteo; ZACCONI, Carla; SCOLARI, Gianluigi. Bacterial ecology of PDO Coppa and Pancetta Piacentina at the end of ripening and after MAP storage of sliced product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p. 13–20, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.023>

CAPORASO, J. Gregory *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the

Ilumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>

CARVALHEIRA, Ana *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* spp. isolated from meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 243, p. 58–63, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.001>

CARVALHO, Mayra Costa da Cruz Gallo de; SILVA, Danielle Cristina Gregorio da. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735–744, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000300040>

CASTILHO, Natália Parma Augusto de. **Avaliação de protocolos alternativos para enumeração de culturas starters e bactérias lácticas utilizadas na produção de salame**. 2014. - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

CENCE, Karine. **Avaliação do efeito das enzimas B-1,3-glucanase e quitinase como alternativa no controle de desenvolvimento de fungos de superfície de salame**. 2016. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2016.

CHAGAS, Thiago Pavoni Gomes. **Caracterização de *Acinetobacter* spp. multirresistentes produtores de carpenamases, dos tipos OXA e NDM, isolados de diferentes regiões do Brasil**. 2015. - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

CHARLERMROJ, Rattaphol *et al.* DNA-based bead array technology for simultaneous identification of eleven foodborne pathogens in chicken meat. **Food Control**, v. 101, p. 81–88, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.014>

CHARMPI, Christina *et al.* Raw meat quality and salt levels affect the bacterial species diversity and community dynamics during the fermentation of pork mince. **Food Microbiology**, v. 89, p. 103434, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103434>

CHEN, Po-Lin; LAMY, Brigitte; KO, Wen-Chien. *Aeromonas dhakensis*, an Increasingly Recognized Human Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00793>

CHRISTOFF, Ana Paula. **Utilizando marcadores moleculares para identificação de micro-organismos**. Florianópolis, SC: Neoprospecta, 2016. *E-book*.

CHRISTOFF, Ana Paula. Genômica e sequenciamento de nova geração. *In*: TURCHETTO-ZOLET, Andreia Carina *et al.* (org.). **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 21–50. *E-book*.

COCOLIN, L. *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5113–5121, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5113-5121.2001>. Acesso em: 23 mar. 2020.

COCOLIN, Luca *et al.* Next generation microbiological risk assessment meta-omics: The next need for integration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 287, p. 10–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.008>

COCOLIN, Lucas; RANTSIOU, Kalliopi. Meat Fermentation. *In*: HUI, Y. H. *et al.* (org.). **Handbook of Meat and Meat Processing**. 2. ed.: CRC Press, 2012. p. 557–572. *E-book*.

COLLINS, Chelsea *et al.* Whole-Genome Analysis of an Extensively Drug-Resistance *Empedobacter falsenii* Strain Reveals Distinct Features and the Presence of a Novel Metallo- β -Lactamase (EBR-2). **Current Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 1084–1089, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1498-9>

CUNHA, Patrícia. **Métodos de tipagem microbiológica para o rastreamento e controle de surtos**. Florianópolis: Neoprospecta, 2016. *E-book*.

DAVIN-REGLI, Anne; PAGÃ’S, Jean-Marie. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>

DE CARVALHO, Catharina Calochi Pires. **Aplicação e viabilidade de micro-organismos potencialmente probióticos em embutidos cárneos fermentados**. 2014. - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2014.

DE CESARE, Alessandra. Metagenomics to investigate the dynamics of microbial communities in poultry and. **Lohmann Information**, v. 53, n. September, 2019.

DE FILIPPIS, Francesca; PARENTE, Eugenio; ERCOLINI, Danilo. Recent Past, Present, and Future of the Food Microbiome. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 589–608, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012312>. Acesso em: 18 fev. 2020.

DE MANDAL, Surajit *et al.* Metagenomic analysis and the functional profiles of traditional fermented pork fat ‘sa-um’ of Northeast India. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 163, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0695-z>. Acesso em: 20 mar. 2020.

DEDUCH, Gabriella. **Desenvolvimento e avaliação físico-química do salame tipo italianinho com substituição parcial de cloreto de sódio**. 2018. - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2018.

DOS SANTOS, Douglas Ferreira; AMÊNDOLA, Isabela; DOS SANTOS, Silvana Soleo Ferreira. Bacillus clausii: Revisão de características e aplicações na medicina, biotecnologia e indústria alimentícia Bacillus clausii: Review of characteristics and applications in medicine, biotechnology and the food industry. **Revista Biociências**, v. 25, n. 2, p. 29–38, 2019. Disponível em: <http://periodicos.unitau.br/ojs/index.php/biociencias/article/view/2971>

DURLU-ÖZKAYA, Fügen; AYHAN, Kamuran; VURAL, Nilüfer. Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products. **Meat Science**, v. 58, n. 2, p. 163–166, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00144-3)

EDERVEEN, Thomas H. A. *et al.* A generic workflow for Single Locus Sequence Typing (SLST) design and subspecies characterization of microbiota. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9,

n. 1, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56065-y>

FALCÃO, Daiane Acosta. **Análise da presença de Enterococcus sp. resistentes a antimicrobianos isolados de alimentos de Porto Alegre-RS**. 2018. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

FARINAS, JAVIER, CHOW, ANDREA, PARCE, John Wallace. **Methods for sanger sequencing using particle associated clonal amplicons and highly parallel electrophoretic size-based separation**. 20100112588A1. Concessão: 2010.

FAROUK, Faten *et al.* Detection of *Acinetobacter baumannii* in fresh produce using modified magnetic nanoparticles and PCR. **Analytical Biochemistry**, v. 609, p. 113890, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113890>

FEINER, Gerhard. The microbiology of specific bacteria. *In*: FEINER, Gerhard (org.). **Meat products handbook: Practical Science and technology**. 1. ed. : Woodhead Publishing Limited e CRC Press LLC, 2006. p. 595–615. *E-book*.

FELDMANN, Vanessa. **Avaliação de linhagens bacterianas obtidas a partir do kefir como cultura iniciadora para a produção de embutido cárneo fermentado**. 2015. - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

FERROCINO, Ilario *et al.* Shotgun Metagenomics and Volatilome Profile of the Microbiota of Fermented Sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02120-17>

FONTES, M. C. *et al.* Phylogenetic Diversity of *Aeromonas* from “Alheira,” a Traditional Portuguese Meat Product. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 8, p. 713–718, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1103>

FRANCIOSA, Irene *et al.* Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 279, n. April, p. 26–32, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.038>

FUDGE, James *et al.* The isolation and identification of *Pantoea dispersa* strain JFS as a non-pathogenic surrogate for *Salmonella* Typhimurium phage type 42 in flour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 219, p. 1–6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.012>

FUKA, Mirna Mrkonjic *et al.* Bacterial diversity of naturally fermented game meat sausages: Sources of new starter cultures. **LWT**, v. 118, p. 108782, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108782>

GIELLO, Marina *et al.* Impact of *Lactobacillus curvatus* 54M16 on microbiota composition and growth of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 72, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.003>

GOMES, Myma Barbosa. **Caracterização de Enterococcus spp. isolados de alimentos quanto à presença de genes de virulência, da descarboxilase e de atividade antimicrobiana**. 2013. - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

GOTTARDO, Elisângela Thaisa *et al.* Embutidos cárneos fermentados artesanais como veículos de micro-organismos patogênicos de importância para saúde pública. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 97–102, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5380/cep.v29i1.22761>

GREPPI, Anna *et al.* Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 212, p. 67–75, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.016>

GUERRERO-LEGARRETA, I. CANNING. *In: Encyclopedia of Meat Sciences*. Elsevier, 2014. p. 137–141. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00101-X>

GUEVARA, Yessenia Elizabeth Díaz. **Inclusão de carne de corvina (Micropogonias furnieri) em embutido do tipo salame italiano**. 2014. - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

HEATHER, James M.; CHAIN, Benjamin. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>

HESSAIN, Ashgan M. *et al.* Molecular characterization of Escherichia coli O157:H7 recovered from meat and meat products relevant to human health in Riyadh, Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 6, p. 725–729, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.009>

JONES, Greg. Microbial metagenomics and the food industry. **New Food Magazine**, n. 510618, 2017. Disponível em: <https://www.newfoodmagazine.com/article/29192/microbial-metagenomics-food-industry/>

KOO, Ok-Kyung *et al.* Metagenomic assessment of the microbial diversity in ground pork products from markets in the North Central Region of South Korea. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. v. 51, n. 9, p. 622–627, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1181910>. Acesso em: 20 mar. 2020.

KOZIŃSKA, Alicja *et al.* Acinetobacter johnsonii and Acinetobacter lwoffii - the emerging fish pathogens. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 58, n. 2, p. 193–199, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/bvip-2014-0029>

KRÖCKEL, L. *et al.* Lactobacillus versmoldensis sp. nov., isolated from raw fermented sausage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 513–517, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02387-0>

LAU, Tien Tien Vicky *et al.* Genetic relatedness and novel sequence types of clinical Aeromonas dhakensis from Malaysia. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 909–918, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00239-8>

LEVIN, R. E. MICROBIOLOGICAL SAFETY OF MEAT | Aeromonas spp. *In: Encyclopedia of Meat Sciences*. Elsevier, 2014. p. 317–323. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00045-3>

- LIPSKI, Thamila dos Santos. **Avaliação do processo fermentativo de salame tipo italiano com a adição de diferentes doses de açúcares**. 2017. - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2017.
- LOONEY, W. John; NARITA, Masashi; MÜHLEMANN, Kathrin. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 312–323, 2009. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70083-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70083-0)
- LOPEZ-CANOVAS, Lilia *et al.* **Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future**. Academic Press Inc., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.020>
- LV, Jing *et al.* Relationships between bacterial community and metabolites of sour meat at different temperature during the fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 307, p. 108286, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108286>
- MAGRO, Graciele Regina; KLEIN, Catia Silene. Qualidade Microbiológica de Salames tipo Colonial Comercializados na Cidade de Concordia-SC: análise de. **Comunicado Técnico (CNPISA)**, n. 49, 2006.
- MARDANOV, Andrey V.; KADNIKOV, Vitaly V.; RAVIN, Nikolai V. Metagenomics: A Paradigm Shift in Microbiology. *In*: NAGARAJAN, M. (org.). **Metagenomics**. First ed. Elsevier, 2018. p. 1–13. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00001-X>
- MEZZATESTA, Maria Lina; GONA, Floriana; STEFANI, Stefania. **Enterobacter cloacae complex: Clinical impact and emerging antibiotic resistance**. *Future Microbiol*, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>. Acesso em: 7 nov. 2020.
- NISIOTOU, Aspasia A. *et al.* Bacterial species associated with sound and Botrytis-infected grapes from a Greek vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 2–3, p. 432–436, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.017>
- NYENJE, Mirriam E. *et al.* Current Status of Antibiograms of *Listeria ivanovii* and *Enterobacter cloacae* Isolated from Ready-To-Eat Foods in Alice, South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 9, p. 3101–3114, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph9093101>
- OAKLEY, Brian B.; GONZALEZ-ESCALONA, Narjol; MOLINA, Marirosa. 12. Molecular Typing and Differentiation. *In*: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association, 2015. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.2105/mbef.0222.017>
- OLIVEIRA, Fernanda de Souza. **Estudo da presença de agentes biológicos contaminantes em linguças de frango comercializadas na cidade de Ariquemes, Rondônia, Brasil**. 2011. - Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes, Rondônia, 2011.
- PEREIRA, Juliano Gonçalves; BARCELLOS, Vinicius Cunha; BERSOT, Luciano Dos Santos. Disseminação de salmonella no processamento industrial em pequena escala de salame artesanal. **Archives of Veterinary Science**, v. 24, n. 1, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5380/avs.v24i1.61169>

PEREIRA, Vivian Mayumi Yamassaki. **Montagem e análise de genomas a partir de metagenomas**. 2014. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PÉREZ-LOSADA, Marcos *et al.* **Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology**. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.009>

PERUZY, M. F. *et al.* Yersinia enterocolitica detection in pork products: Evaluation of isolation protocols. **Food Microbiology**, v. 92, p. 103593, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103593>

PILLAI, Suja; GOPALAN, Vinod; LAM, Alfred King Yin. Review of sequencing platforms and their applications in phaeochromocytoma and paragangliomas. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 116, p. 58–67, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.05.005>

PINHEIRO, Ticiane da Rosa; COITINHO, Greyce Nathalia; STOPIGLIA, Cheila Denise Ottoneli. Perfil de sensibilidade de enterobactérias isoladas de carne bovina comercializadas na cidade de Uruguaiana. *In:* 2017, Santana do Livramento: **Anais do 9º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 2017.

POŁKA, Justyna *et al.* Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. **Food Microbiology**, v. 46, p. 342–356, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.023>

PROFAIZER, Tracie; KUMÁNOVICS, Attila. Human Leukocyte Antigen Typing by Next-Generation Sequencing. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 38, n. 4, p. 565–578, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.07.006>

RANTSIOU, Kalliopi *et al.* Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1977–1986, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1977-1986.2005>

REUTER, Jason A.; SPACEK, Damek V.; SNYDER, Michael P. High-Throughput Sequencing Technologies. **Molecular Cell**, v. 58, n. 4, p. 586–597, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>

ROSELINO, Mariana Nougalli. **Desenvolvimento de um embutido cárneo fermentado, com teores reduzidos de gordura e sais de cura, através da utilização de culturas probióticas**. 2016. - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/138151>

SÁNCHEZ MAINAR, María; STAVROPOULOU, Despoina Angeliki; LEROY, Frédéric. Exploring the metabolic heterogeneity of coagulase-negative staphylococci to improve the quality and safety of fermented meats: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 247, p. 24–37, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.021>

SANTIYANONT, Pannita *et al.* Dynamics of biogenic amines and bacterial communities in a Thai fermented pork product Nham. **Food Research International**, v. 119, p. 110–118, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.060>

SANTOS, Larissa a Conceição. **Atividade antimicrobiana de probióticos comerciais frente à enterobactérias**. 2018. - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, 2018.

SANTOS, Letícia Bonato Souza. **Análise filogenética da espécie *Trichosporon asahii* por sequenciamento multilocus**. 2019. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.5.2019.tde-22082019-083951>. Acesso em: 4 mar. 2020.

SANTOS, Welika Faria *et al.* Sequenciamento De Dna : Métodos E Aplicações. **XIII Safety, Health and Environment World Congress**, p. 138–140, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.14684/SHEWC.13.2013.138-140>

SARKADI, Livia Simon. Biogenic Amines in Fermented Fish. *In*: SAAD, Bahruddin; TOFALO, Rosanna (org.). **Biogenic Amines in Food: Analysis, Occurrence and Toxicity**. 1. ed. Royal Society of Chemistry, 2020. p. 62–75. *E-book*.

SAYAS-BARBERÁ, E. *et al.* Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage ‘Longaniza de Pascua’. **Food Control**, v. 27, n. 2, p. 343–350, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.009>

SCHAFFNER, D. W.; SMITH-SIMPSON, S. MICROBIOLOGICAL ANALYSIS | Indicator Organisms in Meat. *In*: **Encyclopedia of Meat Sciences**. Elsevier, 2014. p. 301–305. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00068-4>

SCHMITT, Beatriz. **Avaliação do uso de diferentes culturas iniciadoras na produção de salame tipo italiano do Frigorífico Antônio Carlos**. 2017. - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SCORSIO, Maíra Adriana de Carvalho. **Análise sensorial de salame tipo italiano com substituição parcial de toucinho por farinha de linhaça dourada**. 2015. -

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015. Disponível em:

http://biblioteca2.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5491/1/MD_COEAL_2015_2_01.pdf

SENER, Luciana. **Isolamento e caracterização de bactérias ácido-láticas de linguças suínas defumadas e desenvolvimento de embutido potencialmente funcional**. 2014. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SETTANNI, Luca *et al.* Evolution of indigenous starter microorganisms and physicochemical parameters in spontaneously fermented beef, horse, wild boar and pork salamis produced under controlled conditions. **Food Microbiology**, v. 87, p. 103385, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103385>

SOMMERS, Christopher *et al.* Inactivation of *Staphylococcus saprophyticus* in chicken meat and purge using thermal processing, high pressure processing, gamma radiation, and ultraviolet light (254 nm). **Food Control**, v. 75, p. 78–82, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.020>

STELLATO, Giuseppina *et al.* Overlap of spoilage-associated microbiota between meat and

the meat processing environment in small-scale and large-scale retail distributions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 4045–4054, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00793-16>. Acesso em: 4 nov. 2020.

STRATEV, D.; VASHIN, I.; RUSEV, V. Prevalence and survival of *Aeromonas* spp. in foods—a review. **Revue Méd. Vét.**, v. 163, p. 486–494, 2012.

TABANDEH, F. *et al.* FED-BATCH FERMENTATION OF *BACILLUS CLAUSII* FOR EFFICIENT PRODUCTION OF ALKALINE PROTEASE USING DIFFERENT FEEDING STRATEGIES. **Chemical Engineering Communications**, v. 198, n. 9, p. 1063–1074, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00986445.2011.552024>

TERRA, Alexandro B. de M.; FRIES, Leadir Lucy Martins; TERRA, Nelcindo N. **Particularidades na fabricação do salame**. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2004. *E-book*.

TU, Rong Jen *et al.* Evaluation of microbial dynamics during the ripening of a traditional Taiwanese naturally fermented ham. **Food Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 460–467, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.12.011>

VARGAS, Klecio Ramos. **Substitutos parciais de gordura para derivados carneos: uma revisão**. 2019. Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2019.

VERDAN, Ana Paula; ISAKA, Graciele Viccini. Qualidade microbiológica de produtos artesanais comercializados em Canoinhas, SC. **Higiene Alimentar**, v. 29, p. 85–89, 2015.

WANG, Xinhui *et al.* Comparison of bacterial diversity profiles and microbial safety assessment of salami, Chinese dry-cured sausage and Chinese smoked-cured sausage by high-throughput sequencing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 108–115, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.011>

WANG, Yong; QIAN, Pei-Yuan. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>. Acesso em: 25 out. 2020.

WASFI, Asma; AWWAD, Falah; AYESH, Ahmad I. **Graphene-based nanopore approaches for DNA sequencing: A literature review**. Elsevier Ltd, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.072>

WIDERSTRÖM, M. *et al.* Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 7–20, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1270-6>

YI, Langbo *et al.* Diversity study of microbial community in bacon using metagenomic analysis. **Journal of Food Safety**, v. 37, n. 3, p. e12334, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfs.12334>. Acesso em: 15 mar. 2020.

ZAMAN, Kamran *et al.* *Empedobacter falsenii*: a rare non-fermenter causing urinary tract infection in a child with bladder cancer. **SOA-Clinical & Medical Case Reports, Reviews**,

v. 1, p. 2, 2017.

ZENG, Yu *et al.* Emergence of an *Empedobacter falsenii* strain harbouring a tet(X)-variant-bearing novel plasmid conferring resistance to tigecycline. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 3, p. 531–536, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz489>

ZHANG, Jian *et al.* Isolation and identification of histamine-producing Enterobacteriaceae from Qu fermentation starter for Chinese rice wine brewing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 281, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.014>

ZHENG, Jinshui *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>. Acesso em: 16 nov. 2020.

ZHONG, Chaofang *et al.* Comprehensive Analysis Reveals the Evolution and Pathogenicity of *Aeromonas*, Viewed from Both Single Isolated Species and Microbial Communities. **mSystems**, v. 4, n. 5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00252-19>