

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**DEGRADAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS
(PCBs) POR MICRORGANISMO DE INTERESSE
TECNOLÓGICO NA INDÚSTRIA CÁRNEA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Leal Leães

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**DEGRADAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs)
POR MICRORGANISMO DE INTERESSE TECNOLÓGICO NA
INDÚSTRIA CÁRNEA**

por

Fernanda Leal Leães

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos,
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para a obtenção do grau de
MESTRE em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Ijoni Hilda Costabeber

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2005

Leães, Fernanda Leal, 1979-

L434d

Degradação de bifenilos policlorados (PCBs) por microorganismo de interesse tecnológico na indústria cárnea / por Fernanda Leal Leães ; orientadora Ijoni Hilda Costabeber. – Santa Maria, 2005.

96 f . ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

1. Tecnologia de alimentos 2. Massa cárnea 3. Degradação 4. Bifenilos policlorados 5. Staphylococcus xylosus I. Nörnberg, José Laerte, orient. II. Título

CDU: 637.5

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

Universidade Federal de Santa Maria

Centro de Ciências Rurais

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

A comissão examinadora, abaixo assinada,

aprova a Dissertação de Mestrado

**DEGRADAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs) POR
MICRORGANISMO DE INTERESSE TECNOLÓGICO NA INDÚSTRIA CÁRNEA**

Elaborada por

Fernanda Leal Leães

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Ijoni Hilda Costabeber

(Presidente/Orientador)

Prof^a. Dr^a. Leadir Lucy Martins Fries (UFSM)

Prof^a. Dr^a. Elisete Maria Pedron Moro (UCS)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2005.

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas colaboraram, de uma forma ou de outra, para a realização deste trabalho. A todas elas quero expressar meus agradecimentos, e em especial:

Aos meus pais, Adoniran e Fátima, que não pouparam esforços para a realização deste sonho, tendo sempre como princípio que o maior legado que se pode deixar para um filho é a educação e o conhecimento. A vocês e ao meu irmão, Fábio, agradeço o amor, a compreensão e o apoio. Aos demais familiares, pelo carinho e a expectativa de ter a primeira mestra na família.

Ao meu noivo, Alain, pela compreensão, carinho, companheirismo, apoio e incentivo. Seu amor me deu forças e foi imprescindível para a conclusão desta jornada.

A minha orientadora, prof^a. Ijoni, por acolher-me em seu grupo de pesquisa e guiar-me, com experiência e sabedoria, neste trabalho. Agradeço por partilhar seus conhecimentos sempre com muito carinho, amizade e paciência, minha eterna gratidão e lembrança.

A minha co-orientadora, prof^a. Leadir, por me introduzir no “universo” da microbiologia de alimentos. Seus ensinamentos foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A prof^a. Tatiana Emanuelli, pela sabedoria e dedicação à pesquisa. Seus ensinamentos, paciência e amizade foram imprescindíveis na construção do meu conhecimento.

Aos amigos Joice, Stanislau, Jucieli, Francieli e Ana Augusta, pelo apoio e companheirismo nas descobertas e inquietações nos caminhos da ciência.

As amigas Ana Paula, Geisi e Vanessa, pelo auxílio e parceria nas infindáveis horas de dedicação no laboratório, grande parte deste trabalho se deve a vocês.

Ao pessoal do NIDAL, em especial a prof^a. Leila, o prof. Laerte, os colegas de mestrado e os estagiários, pelo apoio e amizade.

Aos professores e funcionários do DTCA e do PPGCTA, pelos conhecimentos transmitidos, colaboração e amizade.

Aos colegas e alunos da UERGS, pelo apoio e compreensão da minha ausência em alguns momentos, decorrente da realização deste trabalho.

A todos os amigos e amigas que foram apenas espectadores desta caminhada, agradeço o carinho e as muitas vezes que me trouxeram de volta à realidade.

Ao CNPq (Processos 477779/01-8 e 540032/01-8) e a FAPERGS (Processos 02/50701.8 e 03/50774.9), pelo apoio financeiro

INDEPENDENTE DOS CAMINHOS QUE EU VENHA A TRILHAR,
VOCÊS ESTARÃO SEMPRE EM MINHAS MELHORES LEMBRANÇAS....

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Sistema de identificação dos bifenilos policlorados (PCBs).....	06
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura molecular dos bifenilos policlorados (PCBs)..... 05

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

BHI – Brain heart infusion

DDD - Diclorodifenildicloroetano

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

CG/ μ ECD – Cromatógrafo gasoso com micro detector de captura eletrônica

HCB – Hexaclorobenzeno

HCH - Hexaclorociclohexano

IUPAC - The International Union of Pure and Applied Chemistry

MSM – Mineral salts medium

NBR – Instrução normativa

PCBs – Bifenilos policlorados

TCDD - Tetraclorodibenzodioxina

WHO – World Health Organization

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

DEGRADAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs) POR MICROORGANISMO DE INTERESSE TECNOLÓGICO NA INDÚSTRIA CÁRNEA

Autora: Fernanda Leal Leães

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ijoni Hilda Costabeber

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Leadir Lucy Martins Fries

Local da defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2005.

É de grande importância o conhecimento dos diversos fatores que podem reduzir a contaminação causada por bifenilos policlorados (PCBs) em alimentos, já que resíduos destes compostos podem trazer graves riscos à saúde humana. Diversas investigações têm demonstrado que o processamento dos alimentos modifica, tanto qualitativa quanto quantitativamente, a contaminação organoclorada, especialmente de PCBs, presente na matéria prima. Além disso, os microrganismos de interesse tecnológico na indústria alimentícia poderiam ser de grande importância no processo de degradação. Investigou-se o crescimento do microrganismo starter *Staphylococcus xylosus* em meio de cultura líquido contendo PCBs (10, 28, 52, 138, 153 e 180), e sua capacidade degradativa em meio líquido e massa cárnea durante 168 horas de incubação. A presença de PCBs não afetou o crescimento do microrganismo em meio de cultura nutritivo (BHI) ou meio de cultura salino (MSM) quando comparados com o controle (sem a presença de PCBs). O microrganismo demonstrou capacidade de degradar alguns dos congêneres de PCBs testados. Os PCBs 138 e 153 foram degradados em meio nutritivo (78% e 68%, respectivamente; $p < 0,05$) e em meio salino (71% e 66%, respectivamente; $p < 0,05$), sendo observada uma máxima degradação nas primeiras 24 horas de incubação. Relação exponencial significativa foi observada entre o período de incubação e os PCBs 28 e 180 em BHI, assim como para os PCBs 52 e 180 em meio salino. Relação exponencial significativa foi observada entre o período de incubação e as concentrações do PCB 10 em massa cárnea. Estes resultados indicam que a fermentação realizada por *Staphylococcus xylosus* em produtos cárneos pode reduzir resíduos de PCBs e o microrganismo starter pode ser usado na obtenção de alimentos com menor risco toxicológico.

Palavras-chave: degradação; bifenilos policlorados; *Staphylococcus xylosus*; massa cárnea.

ABSTRACT

Master Dissertation

Pos-Graduate Course of Food Science and Technology

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

DEGRADATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS (PCBs) BY MICROORGANISM OF TECHNOLOGICAL INTEREST IN MEAT INDUSTRY

Author: Fernanda Leal Leães

Adviser: Ijoni Hilda Costabeber

Co-Adviser: Leadir Lucy Martins Fries

Place and date of defense: Santa Maria, February 28, 2005.

Due to the risk for human health associated to the presence of polychlorinated biphenyl (PCB) residues in foods, there is an interest in knowing the different factors that could reduce such contamination. Previous research has demonstrated that food processing modifies both qualitative and quantitatively, the organochlorine contamination, specially PCBs, of the raw material. Further, microorganisms of technological interest in food industry could play an important role in the degradation process. The growth of the meat starter *Staphylococcus xylosus* in liquid media containing PCBs (10, 28, 52, 138, 153 and 180), and its ability to degrade PCBs during 168 h of incubation in liquid media and meat mixture was investigated. PCBs did not affect the growth of the starter microorganism in nutritive (brain heart infusion, BHI) or mineral salt medium (MSM) when compared to control (no PCB). The microorganism was able to degrade some of the PCB congeners tested. PCBs 138 and 153 were degraded both in BHI (78% and 68%, respectively; $p < 0.05$) and in MSM (71% and 66%, respectively; $p < 0.05$), with maximal being observed within 24 hours. Highly significant negative exponential relationships were observed between incubation time and PCB 28 and 180 in BHI, as well as to PCBs 52 and 180 in MSM. In the meat mixture highly significant negative exponential relationships were observed between incubation time and the concentration of PCB 10. These results indicate that fermentation by *Staphylococcus xylosus* in meat products can reduce some PCB residues and the meat starter can be used to obtain foods with lower toxicological risk.

Keywords: degradation; polychlorinated biphenyls; *Staphylococcus xylosus*; meat mixture.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	06
LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE ABREVIATURAS.....	08
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Definição, classificação, características físico-químicas e toxicidade dos PCBs.....	17
2.2. Resíduos de PCBs em alimentos.....	20
2.3. Degradação de PCBs por microrganismos.....	22
2.3.1. Ação dos microrganismos frente a compostos halogenados.....	22
2.3.2. Degradação de PCBs por microrganismos de interesse na indústria cárnea.....	24
3. ARTIGO CIENTÍFICO	28
3.1. Versão para publicação - F. L. Leães; A. P. Daniel; G. B. Mello; V. Battisti; S. Bogusz Junior; T. Emanuelli; L. L. M. Fries; I. Costabeber. Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by <i>Staphylococcus xylosus</i> in liquid media and meat mixture	29
3.2. Versão em língua portuguesa - F. L. Leães; A. P. Daniel; G. B. Mello; V. Battisti; S. Bogusz Junior; T. Emanuelli; L. L. M. Fries; I. Costabeber. Degradação de bifenilos policlorados (PCBs) por <i>Staphylococcus xylosus</i> em meios de cultura líquidos e massa cárnea	52
4. DISCUSSÃO.....	76
5. CONCLUSÕES.....	80

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
7. ANEXOS.....	91
7.1. ANEXO A. The Science of the Total Environment Manuscript Format.....	92

1. INTRODUÇÃO

Os bifenilos policlorados (PCBs) são substâncias químicas com diversas aplicações industriais devido as suas propriedades de resistência a altas temperaturas, baixa volatilidade, resistência à oxidação e redução e, também, resistência a ação dos ácidos, álcalis e outros agentes químicos. Tais propriedades proporcionam aos PCBs, assim como os organoclorados, um alto grau de estabilidade e uma grande importância como contaminantes ambientais (ROBARDS, 1990) e, conseqüentemente, de todos os alimentos que formam parte da cadeia alimentar (COSTABEBER, et al. 2000a). Apesar disso, foram utilizados na indústria em geral para elaboração de plásticos, tintas, resinas sintéticas, lubrificantes, capacitores, óleos de transformadores, óleos de imersão para microscópios e como dispersores de pesticidas.

Os PCBs são compostos aromáticos halogenados (PLATONOW et al., 1971), obtidos a partir da cloração direta de um radical bifenilo, em presença do catalisador cloreto de ferro (BAYARRI, 1997a), podendo variar de 1 a 10 o número de átomos de cloro em sua molécula. As possíveis posições que os átomos de cloro podem ocupar na estrutura do bifenilo dão origem a 209 congêneres diferentes (BÜTHER & DENKER, 1995), dos quais pode-se encontrar uma grande quantidade de isômeros (QUENSEN et al., 1990).

A toxicidade dos congêneres de PCBs está relacionada com a sensibilidade do indivíduo, a disposição dos átomos de cloro e o número destes na molécula, diminuindo a toxicidade ao aumentar o conteúdo de cloro em sua molécula (SAWHNEY & HANKIN, 1985). Portanto, as exposições aos PCBs podem ser causas de enfermidades em operários de fábricas de manufatura de PCBs, de indústrias que utilizaram estes compostos para a elaboração de seus produtos ou, ainda, em operários que manipularam produtos que contém PCBs (BROADHURST, 1972).

Nas exposições não ocupacionais, produzem-se quadros de intoxicações agudas através do consumo de alimentos contaminados com misturas comerciais de PCBs, procedentes de fontes que, geralmente, cercam o alimento durante a sua elaboração.

A principal fonte de ingestão dos PCBs pelo homem são os alimentos de origem animal, destacando-se a carne (COSTABEBER et al., 1997), pescado de água doce e os alimentos gordurosos como o leite (ANGULO et al., 1999) e derivados, especialmente, o queijo e a manteiga.

O consumo médio de PCBs em adultos através de alimentos é estimado em 14 µg/dia, ou aproximadamente 100 µg/semana (WHO/EURO, 1987). Assim como os organoclorados, os PCBs são lipofílicos e se armazenam preferencialmente no tecido adiposo (COSTABEBER, 1999; COSTABEBER et al., 2000b) e em menores quantidades no soro sanguíneo, nos órgãos e no leite (ANGULO et al., 1997).

A intoxicação humana através dos alimentos contaminados se caracteriza pelo aparecimento de afecções dérmicas, hipersecreção ocular, pigmentação das unhas e mucosas, fadiga, náuseas e vômitos (GOTO & HIGUCHI, 1969). Os PCBs podem atravessar a barreira placentária produzindo malformações em fetos e abortos (DEKONING & KARMAUS, 2000). Além disso, segundo Colman e Dawson (1996), os PCBs exercem ação de mimetismo estrogênico e/ou antagonismo androgênico, efeito que poderia ser responsável pela feminização dos peixes, como consequência de uma alta contaminação aquática.

Os bifenilos possuem ações teratogênicas e carcinogênicas; sobre sistemas reprodutor, enzimático e endócrino, além de provocarem alterações cutâneas, imunotóxicas e neurotóxicas (COSTABEBER & EMANUELLI, 2003). Ainda, apresentam uma ação sinérgica sobre o aparecimento de tumores hepáticos ocasionados por hexaclorobenzeno (HCB) em ratos (NAGASAKI et al., 1975). Este efeito tem grande relevância devido ao fato de os PCBs parecerem com os pesticidas organoclorados, e apresentarem semelhanças em suas propriedades físicas, além de se acumularem nos mesmos tipos de alimentos (NAGASAKI et al., 1975).

Na natureza os PCBs são de difícil degradação, mas alguns microrganismos podem produzir, lentamente, uma de cloração destes compostos. Em condições aeróbias as bactérias e mofos podem decompor os PCBs diminuindo a sua ação conforme se incrementa o grau de cloração e segundo a localização dos substituintes (BENNETT, 1983). Em contrapartida, em anaerobiose, os compostos mais clorados são degradados em maior quantidade. Deste modo, o emprego de ambas condições poderiam assegurar a destruição de aproximadamente 70% dos PCBs, ainda que se produzam transformações, estas não são totais como

demonstra a detecção de quantidades importantes de PCBs em águas residuais procedentes de sistemas de depurações.

Os PCBs podem ser degradados por bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* e *Rhizopus japonicus* (FAVA, 1996; FISH, 1996). Destacam-se, ainda, *Staphylococcus carnosus* e *Micrococcus varians* como microrganismos degradantes sendo que o primeiro foi o que demonstrou esta atividade com maior intensidade em um meio rico em nutrientes, o que sugere que teria um interesse de escala industrial para a obtenção de produtos alimentícios com menor risco toxicológico (BAYARRI, 1997a). Várias cepas de *Micrococcus* e *Staphylococcus* são usadas como cultivos iniciadores em embutidos cárneos. Apesar de produzirem pequenas quantidades de ácido, estes microrganismos são adicionados nestes derivados porque reduzem nitratos a nitritos e melhoram a coloração do produto final. O *Micrococcus varians* e o *Staphylococcus xylosum* estão sendo amplamente utilizados nos processos de industrialização de embutidos cárneos fermentados (STAHNKE, 1995; VARMAN & SUTHERLAND, 1998).

Numerosas investigações vem sendo realizadas com o objetivo de estudar a ação de microrganismos na biodegradação de compostos halogenados como os praguicidas organoclorados e os PCBs. A maioria destes estudos está relacionada com a ação de microrganismos ambientais que realizam a degradação de contaminantes em solo e sedimentos (CHANG et al., 2001; FEDI et al., 2001; NAWAB et al., 2003; SIERRA et al., 2003). Investigações relacionadas com a biodegradação de praguicidas organoclorados e PCBs por microrganismos de interesse na indústria cárnea são encontradas em número reduzido (MIRNA & CORETTI, 1979; ARIÑO et al., 1993; BAYARRI et al., 1998; ABOU-ARAB, 2002).

O objetivo do presente trabalho foi investigar a ação do microrganismo *Staphylococcus xylosum* sobre as concentrações de congêneres de bifenilos policlorados.

Os objetivos específicos foram:

1. Investigar *in vitro* a degradação de congêneres de PCBs pelo microrganismo *Staphylococcus xylosum* e contribuir para o conhecimento da atividade do microrganismo de interesse tecnológico na indústria cárnea.
2. Estudar *in vitro* o efeito da presença de PCBs sobre o crescimento do *Staphylococcus xylosum*, visando estimar sua capacidade de diminuir as concentrações de tais compostos nos alimentos.

3. Verificar o efeito do desenvolvimento de *Staphylococcus xylosus* sobre as concentrações de PCBs em massa cárnea e relacionar com a obtenção de alimentos com menor risco toxicológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Definição, classificação, características físico-químicas e toxicidade dos PCBs

Os PCBs são um grupo de compostos químicos orgânicos sintéticos, que são obtidos a partir da cloração direta de um radical bifenilo utilizando ferro como catalisador (Figura 1). Sua fórmula empírica é $C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$, onde n toma valores desde 1 até 10.

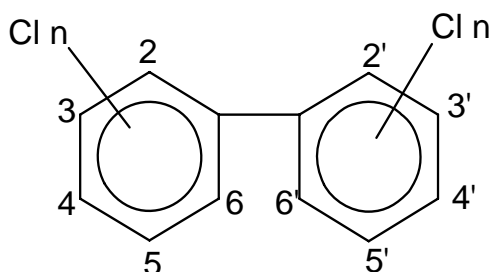


FIGURA 1. Estrutura molecular dos bifenilos policlorados, onde n é o número de átomos de cloro, compreendido entre 1 e 10. Fonte: Penteado e Moreira Vaz (2001).

Conforme pode ser observado na Figura 1 as moléculas dos PCBs podem apresentar diversas substituições possíveis no que concerne a quantidade de átomos de cloro. As dez possíveis posições (*orto*: 2, 6, 2', 6'; *meta*: 3, 5, 3', 5' e *para*: 4, 4') que podem ocupar os átomos de cloro na estrutura do anel bifenilo permitem a obtenção de um número total de 209 congêneres (PENTEADO & MOREIRA VAZ, 2001).

Segundo Quensen et al. (1990) a palavra congênera designa, de maneira geral, os PCBs que diferem no número de átomos de cloro e os isômeros que diferem na distribuição de um mesmo número de átomos de cloro.

Os distintos congêneres de PCBs são identificados por uma numeração sistemática de acordo com o grau de cloração e localização dos substituintes. Assim, as moléculas com um átomo de cloro são denominadas como monoclorobifenilos; as moléculas com dois átomos de cloro, como diclorobifenilos; e assim sucessivamente até as moléculas que tenham dez átomos de cloro, as que são denominadas como

decaclorobifenilos (BALLSCHMITER et al., 1992). Esta sistemática de numeração está representada por alguns exemplos na Tabela 1.

TABELA 1 – Sistema de identificação dos PCBs.

Número de cloros	Usual	IUPAC
2	2,6 diclorobifenil	PCB 10
3	2,4,4' triclorobifenil	PCB 28
4	2,2',5,5' tetraclorobifenil	PCB 52
6	2,2',3,4,4'5' hexaclorobifenil	PCB 138
6	2,2',4,4',5,5' hexaclorobifenil	PCB 153
7	2,2',3,4,4',5,5' heptaclorobifenil	PCB 180

FONTE: WHO/IPCS, (1993).

Diversos estudos evidenciam que dos 209 congêneres possíveis, somente 130 podem estar presentes nas misturas comerciais (WHO/IPCS, 1993). Estas foram produzidas em vários países, com diferentes denominações, tais como: na França com a marca “Phenoclor[®]”; no Japão “Kanechlor[®]”; na Alemanha “Clophen[®]”; na Itália “Fenclor[®]” e nos Estados Unidos “Aroclor[®]”, sendo a Monsanto Company a maior produtora mundial. No Brasil foram comercializadas com o nome de “Ascarel[®]” (ABRAMOWICZ, 1990; BRASIL, 1997). As restrições para seu uso foram implementadas através da Portaria Interministerial 19, de 2 de janeiro de 1981 (BRASIL, 1981).

A denominação comercial das misturas técnicas sempre reflete seu grau de cloração e, geralmente, estas misturas contém 50 ou mais congêneres (ABRAMOWICZ, 1990). Assim, os distintos arocloros são identificados por um dígito de quatro cifras. As primeiras cifras indicam o tipo de molécula e as duas últimas indicam a porcentagem de cloro presente, que pode ser desde 21 até 70% (DONNELLY et al., 1996).

A grande disseminação dos produtos contendo PCBs deve-se principalmente a suas propriedades físico-químicas. Dentre elas destacam-se a sua resistência a altas temperaturas, baixa volatilidade, resistência à oxidação, redução, assim como à ação de ácidos, álcalis e outros agentes químicos. Os PCBs são compostos pouco solúveis em água, solúveis em lipídios e na maioria dos solventes

orgânicos. Podem apresentar-se como líquidos oleosos até sólidos cristalinos e resinas. Seus pontos de ebulição e de fusão aumentam com a quantidade de cloros na molécula, aumentando a sua bioacumulação do mesmo modo (WHO/IPCS, 1993).

A toxicidade de cada congênera de PCBs está correlacionada com a sua conformação espacial. Essa conformação é classificada em planar ou coplanar, sendo definida pelo número e posição dos átomos de cloro na molécula dos PCBs. A conformação planar apresenta átomos de cloro na posição *orto* na molécula do PCB, enquanto que na posição coplanar não existem átomos de cloro nesta posição. A conformação coplanar é considerada a mais tóxica possuindo ação semelhante a da tetraclorodibenzodioxina (TCDD), que é considerada como padrão de referência toxicológica (PENTEADO & MOREIRA VAZ, 2001; ROSS, 2004).

Estudos toxicológicos em cobaias têm demonstrado que a contaminação por PCBs pode alterar principalmente as funções reprodutivas dos organismos, onde foram observados distúrbios na maturação sexual e efeitos teratogênicos (ROSS, 2004).

Carbone et al. (1991) demonstraram que os PCBs podem atravessar a barreira sanguínea e se depositar no cérebro em concentrações comparáveis às observadas no fígado e nos músculos de peixes. Exposições agudas e por longo prazo causam efeitos não específicos em humanos, tais como náuseas, dores de cabeça, depressão, transtornos de memória, sonolência, impotência, nervosismo e fadiga (WHO/EURO, 1987).

Numerosos estudos em ratos revelaram que os animais tratados com PCBs apresentaram, principalmente, carcinomas hepatocelulares (HAAGGRONLUND et al., 1985). Os PCBs apresentam uma ação sinérgica sobre a aparição de tumores hepáticos ocasionados por Hexaclorobenzeno (HCB) em ratos (NAGASAKI, et al. 1975). Este fato tem grande relevância já que os PCBs normalmente estão presentes juntamente com praguicidas organoclorados, pois devido às semelhanças de suas propriedades físicas se acumulam nos mesmos tipos de alimentos (NAGASAKI, et al. 1975).

Atualmente, existem poucas dúvidas a respeito da capacidade carcinogênica dos PCBs em animais, porém, existem poucos trabalhos que confirmem seu efeito em humanos (ANGULO, 1998). No Japão, como consequência de uma intoxicação por azeite de arroz, 36,4% dos falecidos sofreram algum tipo de

neoplasia maligna (WHO/ICPS, 1993). De um grupo de 92 trabalhadores expostos ao Aroclor 1254, 7,6% desenvolveram tumores malignos. Estas porcentagens são significativas na opinião de Allen e Norback (1977). Contudo, outros estudos epidemiológicos sobre populações animais e humanas expostas a PCBs presentes no meio ambiente não tem revelado uma clara evidência de carcinogenicidade destes compostos em circunstâncias naturais de exposição (HAYES, 1987). Isso se deve a dificuldade de se estabelecer relações doses-respostas nos estudos ocupacionais, e a dificuldade de avaliar os efeitos de outros compostos presentes nas misturas de PCBs, não permitindo que se chegue a dados precisos a respeito (LONGNECKER et al., 2000).

2.2. Resíduos de PCBs em alimentos

A exposição do homem, que está no topo da cadeia alimentar, aos PCBs se confirma pela presença destes contaminantes em seus tecidos. Para a população em geral, atualmente os alimentos são a principal fonte de contaminação por PCBs, chegando a contribuir com mais de 90% desta (WHO/IPCS, 1993). O consumo médio de PCBs em adultos através de alimentos é estimado em 14 $\mu\text{g}/\text{dia}$, ou aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{semana}$ (WHO/EURO, 1987).

Os PCBs podem ser freqüentemente detectados em diversos alimentos de origem vegetal e animal, destacando-se especialmente o pescado, a carne, os ovos e a gordura do leite (WHO/IPCS, 1993; PAUMGARTTEN et al., 2000). Devido às conseqüências que estes resíduos podem causar, tanto nos ecossistemas naturais como na saúde humana, o interesse pelo seu estudo nos alimentos e no meio ambiente, é contínuo e crescente (ABAD et al., 2002; COSTABEBER & EMANUELLI, 2003; KIM et al., 2004). A contaminação destes alimentos pode ocorrer durante sua produção ou mesmo durante sua armazenagem, através da transferência de resíduos destes compostos a partir da embalagem. Neste sentido, a legislação brasileira, Portaria 177/99 (BRASIL, 1999), estabelece que os resíduos de bifenilos policlorados nas embalagens e equipamentos celulósicos em contato com alimentos não podem ser iguais ou superiores a 5 mg/kg.

Em trabalho realizado na Itália, Zuccato et al. (1999) verificaram uma ingestão média de PCB total de 3,72 $\mu\text{g}/\text{pessoa}/\text{dia}$. Os congêneres 18, 153 e 138

foram encontrados nos maiores níveis, havendo uma pequena prevalência (28%) dos compostos menos clorados (tri-clorado), com os tetra, penta e hexa-clorados nas mesmas proporções (20-21%) e os altamente clorados (hepta-clorado) em menores concentrações (9%). Neste trabalho, os autores revelaram que na dieta italiana, produtos lácteos, carnes e peixe são a principal fonte de PCBs, enquanto os vegetais contêm os congêneres mais tóxicos. No Canadá, Mes et al. (1991) observaram que a ingestão diária estimada de alguns congêneres de PCBs a partir de alimentos gordurosos, em alguns casos, contribuía com mais da metade dos depósitos desses congêneres no tecido adiposo, o principal local de acúmulo desses compostos. Estes autores, analisando amostras de carne, encontraram PCBs em concentrações variadas, sendo que em bovinos detectaram 6,2 ng g⁻¹ em bife e 3,2 ng g⁻¹ em carne assada; em suínos, foram encontrados 4,2 ng g⁻¹ para carne fresca e 3,8 ng g⁻¹ para carne curada; em cordeiro, foi de 0,6 ng g⁻¹, em fiambre 1 ng g⁻¹ e em salsichas 0,6 ng g⁻¹. Os PCBs mais encontradas na carne bovina e aves domésticas foram as de número 118, 138, 153 e 180, porém, algumas vezes estes congêneres não foram encontrados em alimentos processados, como por exemplo sopa de carne enlatada. Todas as amostras analisadas por Hernandez et al. (1994), continham concentrações de PCBs elevadas, sendo que a carne de ovinos apresentou o valor médio mais alto (1.032 ng g⁻¹ de gordura), com um valor máximo de 5.190 ng g⁻¹ de gordura; a carne de suínos apresentou uma concentração média de 787 ng g⁻¹ de gordura, seguida da carne de bovinos (765 ng g⁻¹ de gordura) e da carne de aves (664 ng g⁻¹ de gordura). Os mesmos tipos de carnes foram analisados por Kannan et al. (1994), que encontraram um valor médio de 92 ng g⁻¹ de gordura. Analisando amostras de ganso canadense, Levengood et al. (1999) observaram que o cozimento do músculo do peito, sem a pele e tecido adiposo, resultou em uma redução na concentração do composto estudado, o Aroclor 1248. Costabeber et al. (2005) encontraram concentrações de 0,43 a 5,18 ng g⁻¹ de gordura para carnes e produtos cárneos, respectivamente, no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil).

Na Comunidade Européia, o limite máximo estabelecido para o somatório dos PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180 em alimentos de origem animal é de 200 ng g⁻¹ de gordura (BESTER et al., 2001). Quanto aos limites máximos de resíduos de PCBs em alimentos no Brasil, a Instrução Normativa 42/99 (BRASIL, 1999) estabelece em 3.000 µg kg⁻¹ de gordura o limite de resíduos de PCBs em alimentos de origem animal.

2.3. Degradação de PCBs por microrganismos

2.3.1. Ação dos microrganismos frente aos compostos halogenados

O processo de biodegradação não é um processo realizado unicamente por microrganismos, porém estes são os agentes mais importantes deste fenômeno na natureza, e em muitos casos, são responsáveis pela degradação de numerosos compostos químicos que não podem ser metabolizados pelos organismos superiores (BAYARRI, 1997a).

Quando uma população microbiana se encontra exposta a uma substância química, se podem produzir diversas reações, entre elas, as seguintes (BAYARRI, 1997a):

- 1) Que se produza um efeito adverso para a população microbiana, isto é, que tal substância atue como agente antimicrobiano.
- 2) Que o composto químico seja degradado imediatamente, devido a ação de enzimas constitutivas das bactérias, ou a uma rápida indução enzimática.
- 3) Que não se produza nenhuma reação, isto é, que o composto não seja tóxico para o microrganismo, ou que não seja degradado pela população microbiana.
- 4) Que seja degradado depois de um tempo de adaptação, de dias, semanas ou até mais tempo, dependendo da natureza química do composto e das circunstâncias do meio ambiente. Neste período de adaptação, se produz a indução das enzimas necessárias para realizar a degradação, e a aquisição de novas capacidades catabólicas mediante transferência genética ou mutação.
- 5) Que seja degradado por um processo de co-metabolismo. Neste processo, o substrato é transformado, mas não é utilizado como fonte de energia para o crescimento microbiano, o qual se produz às custas de outro substrato diferente presente no meio.

Tanto os compostos naturais como os sintéticos mostram uma grande variabilidade estrutural, mas sua utilização pelos microrganismos sempre implica a

mesma estratégia básica, que consiste em transformar o composto em diversos intermediários que possam entrar na rota central do metabolismo. Para compostos aromáticos halogenados, um alto grau de halogenação requer alta energia pelos microrganismos para quebrar a estável ligação carbono-halogênio (BORJA et al., 2005).

Para ser transformado, o composto orgânico deve entrar na célula microbiana através da parede celular e membrana citoplasmática. O composto pode penetrar mediante difusão passiva ou mediante um sistema de transporte ativo. Em alguns casos, a biodegradação é iniciada mediante enzimas exocelulares, que fragmentam a molécula para poder transportá-la para o interior da célula. Uma vez no interior da célula, as reações que o composto pode sofrer vêm determinadas por sua estrutura química. A maioria das reações implicadas no processo de biodegradação podem ser classificadas como oxidativas, redutivas, hidrolíticas ou conjugativas (BAYARRI et al., 1997b).

Os processos catabólicos empregados pelas populações microbianas podem variar em função das circunstâncias ambientais, e em todo momento, está se produzindo uma contínua adaptação dos microrganismos às mesmas. Numerosos compostos químicos, como os praguicidas e bifenilos policlorados, têm sido depositados no meio ambiente, e na maioria dos casos, estes compostos possuem estrutura química mediante a qual os microrganismos nunca haviam estado expostos, sendo esta uma das razões da alta persistência dos compostos, que neste caso se denominam xenobióticos (TRÍSKA, 2004).

A solubilidade dos compostos em água é de grande importância no processo de degradação. Compostos com alta solubilidade aquosa são mais facilmente acessados por microrganismos do que aqueles com baixa solubilidade. Esta pode ser mais uma razão da resistência dos congêneres de PCBs mais clorados à biodegradação, já que estes compostos são insolúveis em água (BORJA et al., 2005).

A concentração do contaminante é também um fator que afeta a biodegradação. Em geral, uma baixa concentração do composto pode ser insuficiente para a indução das enzimas degradativas ou para sustentar o crescimento dos microrganismos. Por outro lado, uma alta concentração pode se tornar tóxica aos organismos (BAYARRI, 1997a). Em baixos níveis de contaminação, a degradação aumenta linearmente com o aumento das concentrações até o grau

em que se torna indiferente a elevação dos níveis do contaminante (SIERRA et al., 2003).

Outros fatores ambientais que afetam a degradação são a temperatura, pH, presença de substâncias tóxicas inibidoras e interação entre microrganismos. Todos estes fatores interagem e tornam o processo de degradação imprevisível (BORJA et al., 2005).

De um modo geral, a degradação de qualquer composto clorado está inversamente relacionado com a quantidade de substituições cloradas na molécula. Os compostos químicos altamente clorados podem ser atacados por bactérias anaeróbias, mediante uma decloração redutiva, através da qual se geram produtos que podem ser mais facilmente atacados por bactérias aeróbias (HANSON & HANSON, 1996). A completa degradação dos compostos aromáticos clorados poderia ser conseguida mediante sucessivas reações, uma primeira decloração anaeróbia dos isômeros mais clorados, seguida de uma decloração aeróbia dos produtos resultantes (DOLFING & BEURSKENS, 1995).

Na decloração redutiva, provocada por bactérias anaeróbias, ocorre a substituição de um átomo de cloro por um átomo de hidrogênio. Em condições aeróbias, a oxidação é realizada por enzimas chamadas oxigenases. As transformações oxidativas também podem ocorrer em ambientes anaeróbios, porém neste caso as reações são catalisadas por hidroxilases (BAYARRI et al., 1997b).

2.3.2. Degradação de PCBs por microrganismos de interesse na indústria cárnea

No processo de elaboração de alguns produtos cárneos como embutidos curados crus, os cultivos iniciadores exercem um papel primordial na obtenção de algumas características organolépticas desejáveis pelo consumidor. Devido a sua importância, estes vêm sendo usados em grande escala na elaboração industrial de certos produtos cárneos. Os cultivos iniciadores são concentrados de microrganismos, perfeitamente identificados, que se conservam congelados ou liofilizados, e que são adicionados na massa cárnea para se obter o benefício de sua atividade metabólica e para dirigir a maturação no sentido desejado.

Várias cepas de *Micrococcus* e *Staphylococcus* são usadas como cultivos iniciadores em embutidos cárneos. Apesar de produzirem pequenas quantidades de

ácido, estes microrganismos são adicionados nestes derivados porque reduzem nitratos a nitritos e melhoram a coloração do produto final. *Micrococcus varians* e, atualmente, *Staphylococcus xylosus* estão sendo amplamente utilizados nos processos de industrialização de embutidos cárneos fermentados. Este último microrganismo é um coco Gram positivo; aeróbio facultativo, crescendo melhor em condições aeróbias; sendo sua faixa de temperatura ótima para crescimento compreendida entre 30 e 40°C (STAHNKE, 1995).

A maioria das investigações está focada a estudos da atividade de degradação de microrganismos ambientais, e são escassas as investigações dirigidas àqueles microrganismos de interesse na indústria de alimentos. Além do efeito benéfico que estes microrganismos exercem sobre a qualidade organoléptica do produto final, a possibilidade de diminuir a toxicidade da matéria prima é um fato de grande interesse e tem sido objeto de investigações, ainda que em escasso número (BAYARRI, 1997a).

A atividade de microrganismos de embutidos e produtos relacionados frente a diversos praguicidas organoclorados foi estudada por Mirna e Coretti (1979). Estes autores realizaram um estudo em caldo nutritivo contaminado com DDT e lindano, incubando a 30°C com um inóculo de micrococos e lactobacilos obtidos de um cultivo iniciador comercial. Em duas semanas, os micrococos foram capazes de degradar entre 20% e 30% do lindano presente no meio, enquanto que os lactobacilos somente reduziram em 10%. Quanto ao DDT, se produziu uma intensa degradação e transformação deste composto em DDD por micrococos, enquanto que os lactobacilos não degradaram este praguicida. Estes autores explicaram a escassa atividade dos lactobacilos devido a uma inibição dos sistemas enzimáticos de degradação por um acentuado decréscimo de pH no meio de cultura.

Peric et al. (1980) publicaram um estudo da que verificou influência de diversas cepas de micrococos utilizados em embutidos curados sobre a degradação de praguicidas organoclorados. O estudo, realizado com 5 cepas do gênero *Micrococcus*, foi realizado em caldo nutritivo na presença de γ -HCH (lindano), de uma mistura de isômeros de HCH, pp'DDT e metoxicloro. Todas as cepas foram capazes de degradar tais praguicidas em 48 horas de incubação a 37°C. Os resultados médios de redução foram de 48% para o γ -HCH, de 43% para o pp'DDT e de 59% para o metoxicloro.

Continuando com os estudos de degradação *in vitro*, Spiric et al. (1981) analisaram diversas cepas de micrococcos que degradaram DDT e lindano em um meio nutritivo. Mediante reações enzimáticas calcularam os parâmetros de tempo e concentração adequados para otimizar o processo. Estes autores propõem o emprego destas cepas na elaboração industrial de embutidos, com a finalidade de reduzir a limites legais os resíduos (contaminantes) naquelas amostras de matéria prima.

Bayarri (1997a) realizou um estudo *in vitro* analisando a capacidade de diferentes microrganismos, utilizados como iniciadores na indústria cárnea, em degradar uma mistura de praguicidas organoclorados (OCPs) e PCB 153. Os microrganismos investigados foram os seguintes: *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaseus*, *Micrococcus varians*, *Lactobacillus plantarum* e *Staphylococcus carnosus*. O ensaio de degradação consistiu em incubar cada microrganismo em um meio de cultura (nutritivo e salino) contaminado com uma solução padrão dos compostos halogenados, a uma temperatura de 30°C por 7 dias. A cepa *M. varians* degradou diversos compostos durante a incubação em um meio salino. Foram observadas reduções de 12% a 17,7% dos compostos HCB, pp'DDE, dieldrin e PCB 153. Do mesmo modo, a cepa *S. carnosus* demonstrou capacidade de degradação em um meio nutritivo, observando reduções significativas de pp'DDE (16,5%) e PCB 153 (22,1%).

O efeito de microrganismos iniciadores *Lactobacillus plantarum* e *Micrococcus varians* na degradação de DDT e lindano foi investigado por Abou-Arab (2002). A redução do DDT no final da incubação (15 dias) foi de 24,1% e 32,5% em meios de cultura nutritivo e salino, respectivamente, sem a presença de nitrito e 37,5% e 46,4% nos mesmos meios na presença de nitrito. Considerando a redução do lindano, foi degradado 27,9% e 40% em meios de cultura nutritivo e salino, respectivamente, sem a presença de nitrito e 38,4% e 48,4% nos mesmos meios na presença de nitrito. O efeito do período de fermentação por um cultivo iniciador sobre DDT e lindano em massa cárnea foi investigado. Os resultados indicaram que durante 72 horas de fermentação a redução foi de 10% e 18% para DDT e lindano, respectivamente.

Embora a maioria destes estudos não tenha avaliado a degradação de PCBs, os resultados encontrados indicam que microrganismos starters são capazes de degradar alguns compostos organoclorados. Esta degradação pode ser importante

para a redução do risco toxicológico associado aos resíduos de PCBs em produtos cárneos.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

3.1. Versão para publicação

Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by Staphylococcus xylosus in liquid media and meat mixture

F. L. Leães^a, A. P. Daniel^a, G. B. Mello^b, V. Battisti^b, S. Bogusz Junior^c, T. Emanuelli^d, L. L. M. Fries^d, I. Costabeber^{b*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

^b Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

^c Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul, Ijuí, RS, Brasil. CEP: 98700-000.

^d Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

*Corresponding author:

Ijoni Costabeber
Departamento de Morfologia
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Maria
Campus de Camobi
Santa Maria, RS, Brasil
CEP: 97105-900
e-mail: ijoni@smail.ufsm.br
Tel.: +55 55 2209375 Fax: +55 55 2208494

Abstract

We investigated the growth of the meat starter Staphylococcus xylosus in liquid media containing polychlorinated biphenyls (PCBs 10, 28, 52, 138, 153 and 180), and its ability to degrade PCBs during 168 h of incubation in liquid media and meat mixture. PCBs did not affect the growth of the starter microorganism in nutritive (brain heart infusion, BHI) or mineral salts medium (MSM) when compared to control (no PCB). Staphylococcus xylosus degraded some of the PCB congeners tested. PCBs 138 and 153 were degraded both in BHI (78% and 68%, respectively; $p < 0.05$) and in MSM (71% and 66%, respectively; $p < 0.05$), with maximum degradation being observed within 24 hours. Highly significant negative exponential relationships were observed between incubation time and concentrations of PCB 28 and 180 in BHI, as well as for PCBs 52 and 180 in MSM. In the meat mixture highly significant negative exponential relationships were observed between incubation time and the concentration of PCB 10. These results indicate that the development of Staphylococcus xylosus in meat products can reduce some PCB residues and that the meat starter microorganism can be used to obtain foods with lower toxicological risk.

Keywords: degradation; polychlorinated biphenyls; Staphylococcus xylosus; meat mixture.

1. Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a class of 209 compounds with the molecular formula $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, where $1 \leq n \leq 10$. They were commercially produced as complex mixtures for various uses, being employed mainly as dielectric fluids in capacitors and transformers (WHO, 1993; Penteado and Moreira Vaz, 2001). Their thermal and chemical stability, resistance to chemical corrosion and general inertness have contributed to their persistence in the environment (Haluska et al., 1995; Wiegel and Wu, 2000; Triska et al., 2004).

PCBs are deposited onto plants and water consumed by animals and fish. Due to their lipophilic properties and minimal degradation, they are biomagnified up the multi step food chain (Zuccato et al., 1999; De Vos et al., 2003; Weisglas-Kuperus, 2004). Hence, the major source of non-occupational exposure to these contaminants is via food consumption, particularly fish, meat and dairy products (Focant et al., 2002; Ahmed, 2003). It is estimated that meat and meat products contribute to 14-19% of the cumulative toxic effects of PCBs when compared the other foodstuffs (Patandin et al., 1999). Some of the effects described after exposure to PCBs include neurotoxicity, immunotoxicity, carcinogenicity as well as endocrine disruption (Ross, 2004).

Several methods for PCBs destruction in environmental matrixes have been suggested (Kubatova et al., 2001). However, because classical remediation techniques (catalytic process, incineration, etc.) are generally expensive, and not always efficient, nowadays the research has been focused on the development of bioremediation processes (Sierra et al., 2003; Andreoni et al., 2004). Therefore, many microbes and enrichment cultures have been obtained that are able to metabolize and utilize PCBs as carbon and/or energy sources under aerobic or anaerobic conditions (Abraham et al., 2002).

Studies on the degradation of PCB residues in meat and meat products are very important because of their increasing rate of consumption worldwide. Nowadays, the use of starter cultures is very common to improve product characteristics. The possibility that these microorganisms could degrade PCB residues is of great interest for the meat industry because it implies in a reduction of the toxicological risks associated to residues of highly stable compounds.

Fermented sausage is a high-fat-content meat product obtained using starter cultures of microorganisms like Micrococcus aurantiacus, Pediococcus cerevisiae (Abou-Arab, 2002) and Staphylococcus xylosus (Stahnke, 1994).

The present study was carried out to investigate the growth of the meat starter Staphylococcus xylosus in liquid media containing PCBs and its ability to degrade PCBs in liquid media and meat mixture.

2. Material and Methods

2.1. Materials

Meat starter culture Bactoferm S-SX (Staphylococcus xylosus) was supplied by Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda. (Valinhos, SP, Brasil). The microorganism was isolated from the commercial meat starter culture. The strains were stored in skim milk vials at -18°C until use. An 18-h-old actively growing culture in broth was used to inoculate the sterile media, to give a final concentration of 10^5 cells mL⁻¹.

Culture media for the in vitro assays were the following: brain heart infusion (BHI, Merck, Darmstadt, Germany); mineral salts medium (MSM) prepared according to Bayarri et al. (1998) and Baird-Parker Agar (Merck, Darmstadt, Germany).

n-Hexane, acetone and petroleum ether were obtained from Mallinckrodt (Kentucky, USA). Anhydrous sodium sulfate and 60/100-mesh pesticide reagent grade Florisil were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Florisil was previously activated at 150°C/12h and partially deactivated by adding 2% Milli-Q water before use.

Standard PCB solutions of 2,6-dichlorobiphenyl, 2,4,4'-tri chlorobiphenyl, 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl, 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl, 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl and 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (IUPAC n° 10, 28, 52, 138, 153 and 180, respectively) were obtained from SUPELCO Inc. (Bellefonte, PA, USA). All other reagents used were of analytical reagent grade.

2.2. Methods

2.2.1. In vitro experiments with starter microorganism.

The in vitro study was performed in two different liquid media: nutritive medium (BHI) and a mineral salts medium (MSM). Tubes containing 9.99 mL of the sterilized liquid media (BHI or MSM) inoculated with Staphylococcus xylosus (10^5 cells mL⁻¹) were spiked with 0.01 mL of acetone or of a standard solution of PCB congeners n° 10, 28, 52, 138, 153 and 180 prepared in acetone, in which each compound was at 10 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Unspiked samples were used as control. Samples were analyzed at the beginning of the incubation (0 h) and after 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours of incubation at 30°C. The bacteria count was recorded to investigate any inhibitory effect of PCBs. The residues of PCBs remaining in the medium were extracted with hexane following the method described by Angulo (1998), with some modifications. The medium (10 mL) was shaken with hexane (25 mL) and sulfuric acid (20 mL) in a separating funnel. The aqueous layer was removed and the organic layer was extracted four times with 5 mL of sulfuric acid. The organic layer was

removed and filtered through anhydrous sodium sulfate, evaporated to dryness in a rotary evaporator, dissolved in 2 mL of n-hexane, and used for PCB determination.

2.2.2. Meat mixture experiments

The influence of the incubation on each PCB congener ($1 \mu\text{g g}^{-1}$ fat) was investigated in a meat mixture [1.2 kg pork meat, 0.4 kg bovine meat, 0.4 kg bacon, 6 g cure salt (sodium nitrite and nitrate), 5 g sodium ascorbate, 50 g sodium chloride, 20 g sucrose, 10 g commercial spices and 0.1% starter culture]. The incubation was carried out at 30°C for 7 days. Samples were analyzed at the beginning of the incubation (0 h) and after 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours to determine PCB residues. Unspiked samples were used as control and the study was performed in triplicate. The fat of meat products was extracted as described by Waliszewski et al. (1997), with some modifications. In brief, homogenized samples (50 g) were ground with a sufficient amount of anhydrous sodium sulfate, transferred to a 50 x 1 cm i.d. chromatographic column and extracted with 120 mL petroleum ether. The extract was transferred to a 50 mL round-bottom flask and the solvent was eliminated in a rotary evaporator. The extract (1 g) was applied to a chromatographic column containing 15 g of florisil and anhydrous sodium sulfate, and eluted with 100 mL n-hexane to extract PCBs. The eluate was filtered through anhydrous sodium sulfate, evaporated to dryness in a rotary evaporator, dissolved in 2 mL n-hexane, and used for PCB determination. All glassware used was previously cleaned by the method of Angulo et al. (1996).

2.2.3. Analysis of degradation products

Chromatographic analyses were performed with a Hewlett Packard model 6890 gas chromatograph equipped with a ^{63}Ni electron capture micro detector (GC/ μECD). An Agilent HP-5 (crosslinked 5% PH ME siloxane) capillary column (30 m long, 0.25 mm internal

diameter and 0.25 μm film thickness) was used. Operating conditions were as follows: injector 250°C, detector 350°C, oven temperature was held at 110°C for 5 min, then increased to 280°C at 14°C/min and hold 2 min. The carrier gas was nitrogen at a column flow rate of 1.6 mL/min. All samples were analyzed in duplicate. To determine the quality of the method, a recovery study was performed on ten replicates of blank meat mixture fat samples and ten replicates of blank liquid culture media (initial contamination level lower than the detection limit) spiked with PCBs. Mean recoveries ranged from 42.3 to 86.1 and 97.3 to 110.0% for liquid culture medium and meat mixture fat, respectively depending on the PCB congener. The limits of detection (ng mL^{-1} of culture medium) for liquid culture medium were 0.1 for PCBs 10, 28 and 153, 0.2 for PCB 52 and 138, and 0.4 for PCB 180. For meat mixture, the limits of detection (ng g^{-1} fat) were 0.2 for PCBs 10, 28 and 52, and 0.5 for PCBs 138, 153 and 180.

2.3. Statistical analysis

Data were analyzed using the Statistica[®] 6.0 software package. Results were analyzed by repeated measures analysis of variance (ANOVA): 2 culture media x 3 treatment x 11 incubation time for starter growth evaluations, and 2 culture media x 2 treatment x 11 incubation time for PCB degradation, except for results of PCB 10 that were evaluated by two-way ANOVA with no repeated measure due to the existence of groups without variance (all PCB levels lower than the limit of quantification). Post hoc analysis was carried out using Duncan's test when appropriate. Differences were considered to be significant when $p \leq 0.05$. The changes in PCB concentration over the incubation time were fitted using non-linear regression (SlideWrite Plus[®] 4.0 software package) to an exponential equation:

$$y = a + b \cdot \exp(-x/c) \quad (1)$$

3. Results

3.1. *Effect of PCBs on growth of meat starter*

Addition of a mix of PCBs 10, 28, 52, 138, 153 and 180 (0.01 ppm of each compound) did not affect growth of Staphylococcus xylosus in nutritive (BHI) or mineral salts medium (MSM) (figure 1). In the nutritive medium counts increased around 3 log during the initial 12 hours, while in the mineral salt medium the increase was around 4 log. This pattern was observed in the three treatments (control, acetone and mix of PCBs) with no significant differences between the treatments.

3.2. *In vitro degradation of PCBs by the meat starter Staphylococcus xylosus*

Figures 2 to 6 summarize the percentage of PCBs remaining in culture media after incubation with Staphylococcus xylosus. These percentages are related to the initial concentration of PCBs (0 h). ANOVA did not reveal significant main effects or interactions for PCB 10. Besides, no significant exponential relationship was observed between incubation time and the concentrations of PCB 10, indicating that this compound was not degraded up to 168 hours of incubation regardless of the incubation media (data not shown). ANOVA revealed a significant main effect of the incubation time and a significant treatment x incubation time interaction for PCBs 138 and 153, indicating that these compounds were degraded both in BHI (78% and 68%, respectively) and in MSM (71% and 66%, respectively) (Figures 4 and 5). Maximum degradation occurred within 24 hours for both compounds. Highly significant exponential relationships were observed between incubation time and the concentrations of PCB 28 ($r = -0.96$, $p < 0.05$) and PCB 180 ($r = -0.89$, $p < 0.05$) in BHI (Figures

2 and 6). In MSM there was a highly significant exponential relationship between incubation time and the concentration of PCB 52 ($r = -0.84$, $p < 0.05$) and 180 ($r = -0.97$, $p < 0.05$), indicating that these compounds were significantly degraded during the incubation (Figures 3 and 6).

3.3. PCB degradation in meat mixture

Figure 7 shows the degradation of PCBs by the meat starter Staphylococcus xylosus in meat mixture. The evolution of the concentrations during the incubation is expressed as percentage of PCB levels at the beginning of incubation. ANOVA did not reveal significant main effects or interactions for any compound evaluated. However, highly significant exponential relationships were observed between incubation time and PCB 10 ($r = -0.88$, $p < 0.05$), indicating that this compound was significantly degraded during incubation. No significant exponential relationship was observed between the incubation time and the concentrations of the other PCB congeners evaluated (28, 52, 138, 153 and 180), indicating that these compounds were not significantly degraded in the meat mixture up to 168 hours of incubation.

4. Discussion

4.1. Effect of PCBs on the growth of meat starter

The mix of PCBs 10, 28, 52, 138, 153 and 180 did not affect the growth of Staphylococcus xylosus. In contrast, Bayarri (1997) observed a reduced growth of Staphylococcus carnosus in two culture media (nutritive and mineral salts medium)

containing a mix of organochlorine compounds and PCB 153. However, each microorganism has a distinct behavior towards the stress caused by contaminants (Abraham, 2002) and no studies were found concerning the influence of PCB on Staphylococcus xylosus growth, which makes difficult the comparisons with our results. Besides, microbial population may adapt itself to the presence of organochlorine compounds by various mechanisms including the development of an appropriate enzymatic system to eliminate the stress factor, i.e. to degrade the contaminants of the medium (Dolfing and Beurskens, 1995). This mechanism could explain the normal growth of Staphylococcus xylosus in the presence of PCBs when compared with the control.

4.2. In vitro degradation of PCBs by the meat starter *Staphylococcus xylosus*

Microorganism metabolism may change depending on the environmental circumstances. Many factors like temperature, pH and carbon content can strongly influence the rate, extent and route of PCB degradation (Wiegel, 2000; Borja et al., 2004). Microorganism might preferentially degrade other organics substances before PCBs. This behavior can not be evaluated in mineral salts media, where the only carbon source are the PCBs (Katayama and Matsumura, 1993; Klasson, 1996).

Fedi et al. (2001), evaluated PCB degradation by fifteen aerobic bacterial strains using biphenyl as the sole carbon and energy source. Similar to our results, in this study some strains degraded up to 75% of PCB 28. On the other hand, after seven days of incubation in a mineral salt medium containing a commercial mixture of PCBs (Aroclor 1242), the new isolated aerobic bacterium Janibacter sp. degraded 100% of PCB 10 and 92% of PCB 52 (Sierra et al., 2003). This report contrasts with our results were PCBs 10 and 28 were not significantly degraded in mineral salt medium.

Concerning to the degradation of PCBs 138, 153 and 180 in both culture media our results are in agreement with Bayarri (1997a), who verified that other microorganisms (Micrococcus varians and Staphylococcus carnosus) degrade compounds with many chlorine atoms, like PCB 153 (six chlorine atoms), in aerobic conditions. However, according to Abraham (2002), microorganisms generally degrade low chlorinated PCBs in aerobic conditions, while highly chlorinated PCBs are commonly degraded in anaerobic conditions.

Various authors have found microbial degradation PCBs in aerobic conditions (Ruiz-Aguilar, 2002; Komancová et al., 2003), but most studies evaluated microorganisms isolated from soil, water or sediments. Few studies investigated the degradation of organochlorine compounds by starter microorganisms utilized in the meat products. Mirna and Coretti (1979) observed that micrococci and lactobacilli obtained from a commercial starter culture degraded lindane (70% and 90%, respectively) after two weeks of incubation in nutritive medium. DDT was intensely degraded and converted into DDD by micrococci, but was not degraded by lactobacilli. Bayarri (1998) observed that some organochlorine compounds were degraded by the meat starter microorganism Micrococcus varians in an *in vitro* study in mineral salts medium. Although these studies have not evaluated PCB degradation, results found were similar to those that we obtained with Staphylococcus xylosus and indicate that starter microorganisms are able to degrade some chlorinated compounds. This degradation could be important in the reduction of the toxicological risk associated residues of PCBs in meat products.

4.3. PCB degradation in meat mixture

According to Ariño (1995) microorganisms used in meat products enzymatically degrade part of the organochlorine compounds, by using these compounds as carbon sources.

This degradation could be favored by many factors allowing the enzyme–substrate contact, like the mince process and the mixture of the ingredients.

Spatial disposition of the halogenated substitutions influences PCB degradation (Bedard et al., 1986; Fetzner and Lingens, 1994). Bopp (1986) found that ortho-substituted PCB congeners are highly resistant to degradation by Pseudomonas strain LB400. In contrast, in the present study, where PCBs 10, 52, 138, 153 and 180 are di-ortho congeners, we observed a reduction in the levels of PCB 10 in a meat mixture. The resistance of PCB 52 to degradation is of concern, since this PCB has been associated to malignant lesions (Lucena et al., 2001). Degradation of non-ortho and mono-ortho substituted congeners are very important, however, congeners with atoms in para e meta positions are more structurally related to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and have dioxin-like effects, i.e. carcinogenic effects (Penteado and Moreira Vaz, 2001). The mono-ortho congener evaluated in the present study (PCB 28) was degraded only in the BHI medium.

Some authors indicate that degradation magnitude is inversely related to the number of chlorine atoms in the compound. Accordingly, the dichloro-substituted congener PCB 10 was the only PCB significantly degraded during meat mixture incubation, while higher chlorinated PCBs were slightly and non-significantly degraded.

Similar to our study, Bayarri (1997) did not observe significant reduction in the levels of PCB 153 during sausage maturation with commercial starter microorganisms containing Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosaceus and Micrococcus varians.

Abou-Arab (2002) investigated the ability of two strains of meat starter microorganisms (Lactobacillus plantarum and Micrococcus varians) to degrade organochlorine pesticides in sausage mixture. After 72 hours it was observed a reduction of 10% in p,p'-DDT levels and 18% in lindane levels. Ariño et al. (1993) found a 30% reduction in the lindane levels in

sausage after 30 days of curing, indicating the possible action of the fermented meat microflora.

Many authors investigated the effect of aerobic and anaerobic microorganisms on PCBs levels in organic matrixes, especially in soil and sediments (Chang et al., 2001; Fedi et al., 2001; Nawab et al. 2003; Sierra et al., 2003). A low number of investigations using meat as organic matrix were performed (Mirna and Coretti, 1979; Ariño et al., 1993; Bayarri et al., 1998; Abou-Arab, 2002), and in these experiments various starter microorganisms were used. However, as far as we know no studies have yet reported the ability of Staphylococcus xylosus to degrade PCBs.

5. Conclusion

In summary, it was shown that Staphylococcus xylosus decreased the concentration of some PCB congeners in liquid media and in meat mixture. It can be inferred that the fermentation process in meat products would reduce the residues of PCBs. It is also possible that PCBs would be further degraded during the whole shelf life of fermented sausage. PCB degradation in fermented meat products could be of benefit to the consumer health, however, further studies are required to identify the mechanism of PCB degradation by Staphylococcus xylosus and the yielded compounds.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa). I. Costabeber was the recipient of PROFIX Fellowship.

References

- Abou-Arab, A. A. K. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. *Food. Chem. Toxicol.* 2002, 40: 33-41.
- Abraham, W. R., Nogales, B., Golyshin, P. N., Pieper, D. H., Timmis, K. N. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002; 5: 246–253.
- Ahmed, F. E. Analysis of polychlorinated biphenyls in food products. *Trends. Anal. Chem.* 2003; 22 (3): 170-185.
- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M. A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Colombo, M., Gianfreda, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 2004; 57: 401–412.
- Angulo, R., 1998. Residuos persistentes organoclorados en leche humana. Tesis Doctoral, Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España. 312 p.
- Angulo, R., Costabeber, I., Gallego, M. C., Serrano, S., Jodral, M. Clean-up distillation: critical points in the organochlorine residue analysis. In 1ST European Pesticide Residue Workshop, Alkamaar, Netherlands, 1996, p. 59.
- Ariño, A., Herrera, A., Conchello, M. P., Lazaro, R., Perez, C. Hexachlorocyclohexane residues in meat products after processing. *J. Food. Comp. Anal.* 1993; 6: 55-61.
- Ariño, A., Lázaro, R., Conchello, P., Bayarri, S. and Herrera, A. The effect of processing on incurred residues of DDE in meat products. *Food. Add. Contam.* 1995, 12 (4): 559-566.
- Bayarri, S., 1997. Degradación de residuos de contaminantes clorados en productos cárnicos por el procesado y la acción de microorganismos responsables de maduración. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. 364 p.

- Bayarri, S., Herrera, A. Conchello, M.P., Agustin, A., Ariño, A., Lázaro, R. and Yagüe, C. Influence of meat processing and meat starter microorganisms on the degradation of organochlorine contaminants. *J. Agric. Food. Chem.* 1998; 46: 3187-3193.
- Bedard, D.L., Unterman, R., Bopp, L.H., Brennan, M.J., Haberl, M.L. and Johnson, C. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade PCBs. *App. Environ. Microbiol.* 1986; 51: 761-768.
- Bopp, L.H. Degradation of highly chlorinated PCBs by Pseudomonas strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* 1986; 1: 13-29.
- Borja, J., Taleon, D.M., Auresenia, J., Gallardo, S. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process. Biochem.* 2005. Article in press.
- Chang, B.V., Liu, W.G. and Yuan, S.Y. Microbial dechlorination of three PCB congeners in river sediment. *Chemosphere* 2001; 45: 849-856.
- De Vos, S., Maervoet, J., Schepens, P., De Schrijver, R. Polychlorinated biphenyls in broiler diets: their digestibility and incorporation in body tissues. *Chemosphere* 2003; 51: 7-11.
- Dolfing, J. and Beurskens, E.M. The microbiologic and environmental significance of reductive dehalogenation. *Adv. Microb. Ecol.* 1995; 14: 143-205.
- Fedi, S., Carnevali, M., Fava, F., Andracchio, A., Zappoli, S. and Zannoni, D. Polychlorinated biphenyl degradation activities and hybridization analyses of fifteen aerobic strains isolated from a PCB-contaminated site. *Res. Microbiol.* 2001; 152: 283-292.
- Fetzner, S. and Lingens, F. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics and biotechnological applications. *Microbiol. Reviews* 1994; 58 (4): 641-685.
- Focant, J.F., Eppe, G., Pirard, C., Massart, A. C., André, J. E., De Pauw, E. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs in Belgian foodstuffs – Assessment of dietary intake. *Chemosphere* 2002; 48: 167-179.

- Haluska, L., Baranciková, G., Baláz, S., Dercová, K., Vrana, B., Paz-Weisshaar, M., Furciová, E., Blielek, P. Degradation of PCB in different soils by inoculated Alcaligenes xylosoxidans. Sci.Total Environ. 1995; 175: 275-285.
- Hess, P., de Boer, J., Cofino, W. P., Leonards, P. E. G. and Wells, D. E. Critical review of the analysis of non-planar and mono-ortho-chlorobiphenyls. Review. J. Chromatography A. 1995; 703: 417-465.
- Katayama, A. and Matsumura, F. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by Trichoderma harzianum. Environ. Toxicol. Chem.1993; 12: 1059-1065.
- Klasson, K.T., Barton, J.W., Evans, B.S. and Reeves, M.E. Reductive microbial dechlorination of indigenous polychlorinated biphenyls in soil using a sediment-free inoculum. Biotechnol. Progress 1996; 12 (3): 310-315.
- Komancová, M., Jurcová, I., Kochánková, L., Burkhard, J. Metabolic pathways of polychlorinated biphenyls degradation by Pseudomonas sp. 2. Chemosphere 2003; 50: 537-543.
- Kubatova, A., Erbanová, P. Eichlerová, I., Homolka, L., Nerud, F., Sasek, V. PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus Pleurotus ostreatus in contaminated soils. Chemosphere 2001; 43: 207-215.
- Lucena, R. A., Allam, M. F., Costabeber, I. H., Villarejo, M. L. J., Navajas, R. F-C. Breast cancer risk factors: PCB congeners. Eur. J. Cancer Prev. 2001; 10 (1): 117-119.
- Mirna, A. and Coretti, K. Influence of processing on the degradation of pesticides in meats products. Meat Sci. 1979; 3: 97-108.
- Nawab, A., Aleem, A. Malik, A. Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to γ -HCH degradation by Pseudomonas strains. Biores. Technol. 2003; 88: 41-46.

- Patandin, S., Dagnelie, P. C., Mulder, P. G. H., De Coul, E. O., Van der Veen, J. E., Weisglas-Kuperus. Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: A comparison between breast-feeding, toddler, and longterm exposure. *Environ. Health Perspec* 1999; 107 (10): 496-497.
- Penteado, J. C. P., Moreira Vaz, J. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). *Química Nova* 2001; 24 (3): 390-398.
- Ross, G. The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotox. Environ. Safety* 2004; 59: 275-291.
- Ruiz-Aguilar, G.M.L., Fernández-Sánchez, J.M., Rodríguez-Vásquez, R. Poggi-Varaldo, H. Degradation by White-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Adv. Environ. Res.* 2002; 6: 559-568.
- Sierra, I., Valera, J. L., Marina, M. L., Laborda, F. Study of the biodegradation process of polychlorinated biphenyls in liquid medium and soil by a new isolated aerobic bacterium (*Janibacter* sp.). *Chemosphere* 2003; 53: 609-618.
- Stahnke, L. H. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels - Part I. Chemical and Bacteriological Data. *Meat Sci.* 1995; 41 (2): 191-1995.
- Tríska, J., Kuncová, G., Macková, M., Nováková, H., Paasivirta, J., Mirja Lahtiperä, M., Vrchotová, N. Isolation and identification of intermediates from biodegradation of low chlorinated biphenyls (Delor-103). *Chemosphere* 2004; 54: 725-733.
- Waliszewski, S. M., Pardio, V. T., Waliszewski, K. N., Chantiri, J. N., Aguirre, A. A., Infanzón, R. M., Rivera, J. Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico. *Sci. Total Environ.* 1997; 208: 127-132.

- Weiglas-Kuperus, N., Vreugdenhil, H. J. I., Mulder, P. G. H. Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch school children. *Toxicol. Lett.* 2004; 149: 281-285.
- Wiegel, J. & Wu, Q., 2000. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000; 32: 1-15.
- WHO (World Health Organization), 1993. Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls, second ed. WHO, Geneva.
- Zuccato, E., Calvarese, S., Mariani, G., Mangiapan, S., Grasso, P., Guzzi, A., Fanelli, R. Level, sources and toxicity of polychlorinated biphenyls in the Italian diet. *Chemosphere* 1999; 38 (12): 2753-2765.

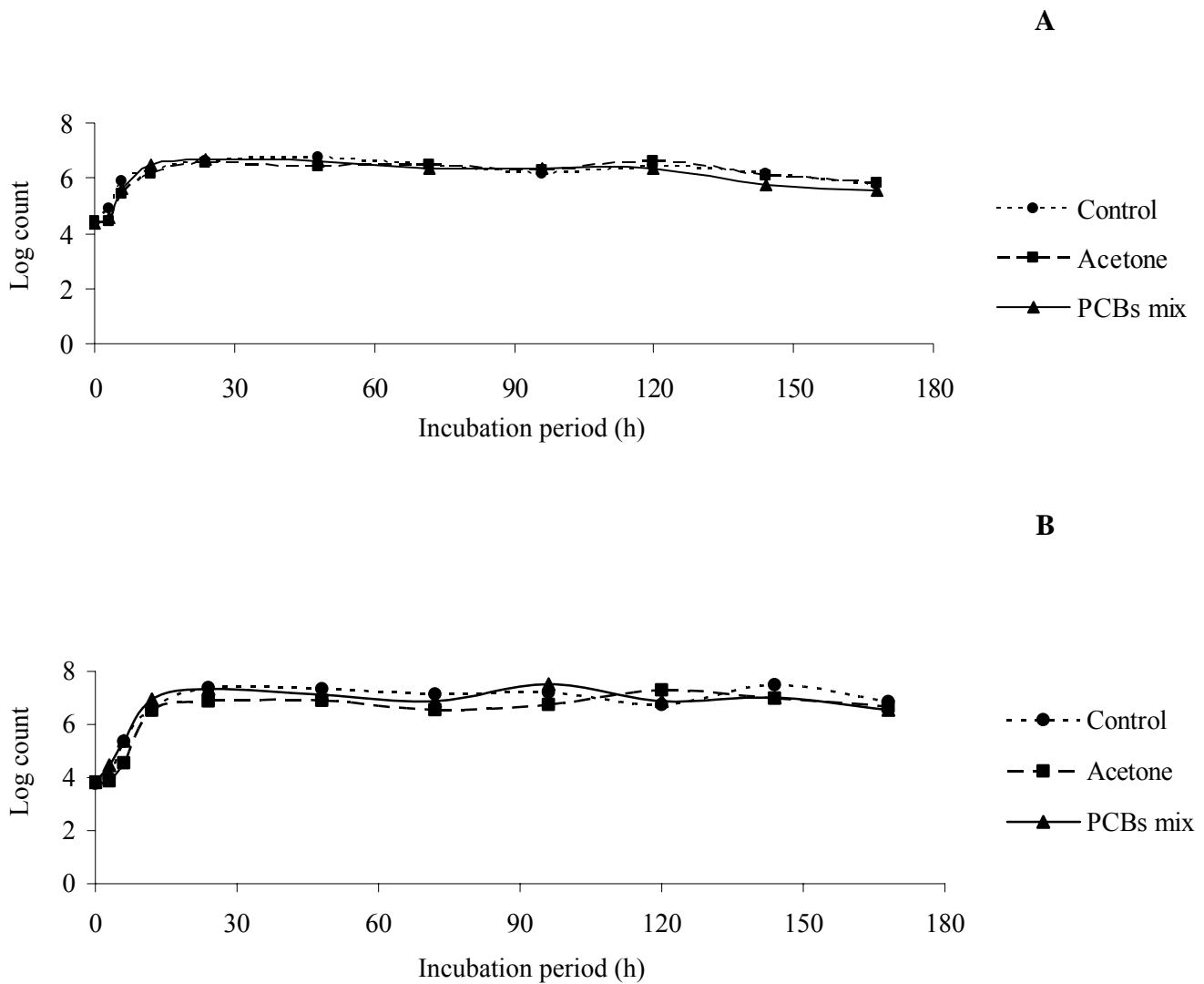


Fig. 1: Growth rate of *Staphylococcus xylosum* in (A) nutritive medium (BHI), or (B) mineral salt medium (MSM) (B) during 168h of incubation at 37°C. Medium were unspiked (control) or spiked with 0.01 ppm PCBs mix (congeners 10, 28, 52, 138, 153 and 180) or acetone (vehicle of PCBs mix). Results are the mean of 3 independent experiments.

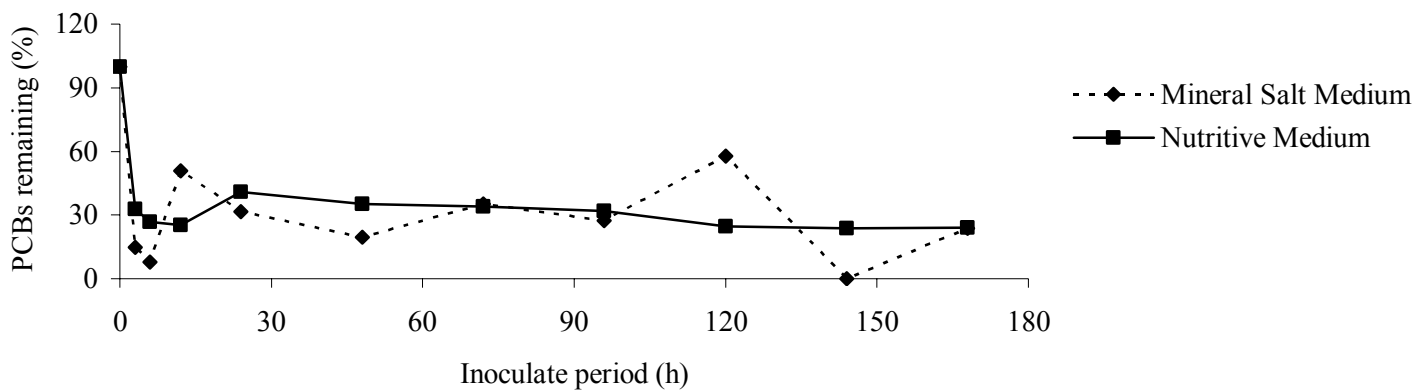


Fig. 2. Degradation of PCB 28 by the meat starter *Staphylococcus xylosus* in culture media during incubation at 30°C. Liquid culture medium was spiked with 0.01 ppm PCB 28. The PCB concentrations found in the unspiked culture media (control) were always lower than 10% and are omitted for clarity purposes. Results are expressed as percentage (mean of 3 independent experiments) of PCB concentration at the beginning of the incubation (0 h).

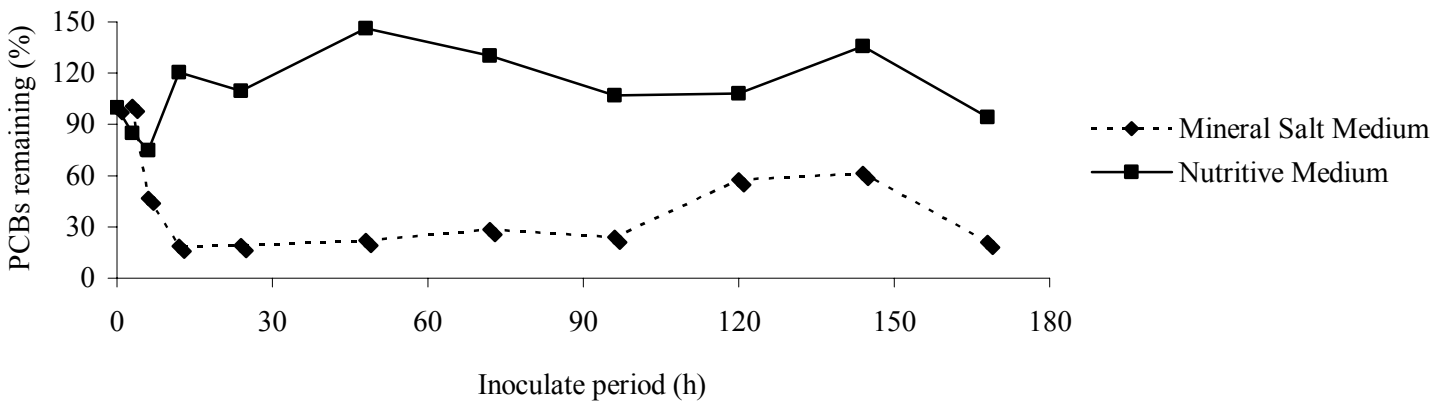


Fig. 3. Degradation of PCB 52 by the meat starter *Staphylococcus xylosus* in culture media during incubation at 30°C. Liquid culture medium was spiked with 0.01 ppm PCB 52. The PCB concentrations found in the unspiked culture media (control) were always lower than 10% and are omitted for clarity purposes. Results are expressed as percentage (mean of 3 independent experiments) of PCB concentration at the beginning of the incubation (0 h).

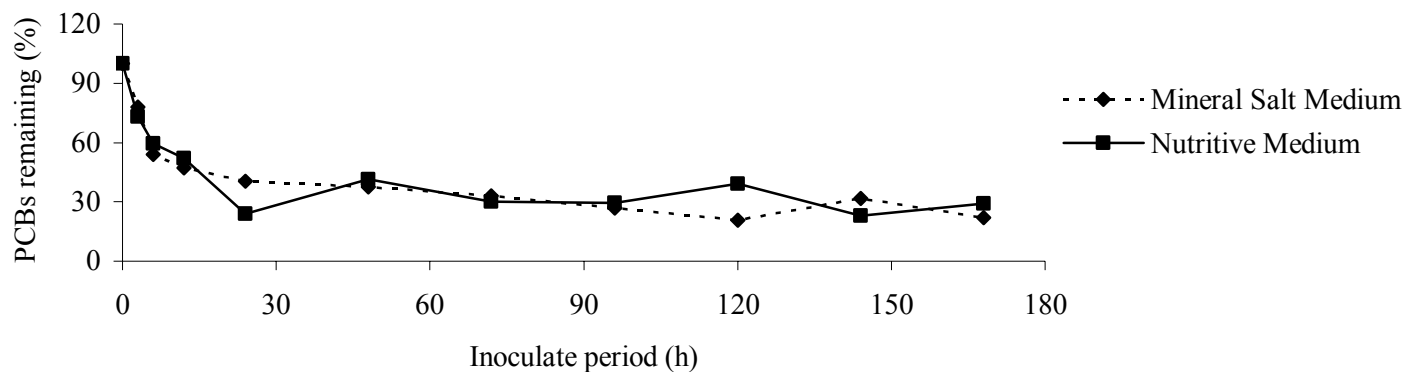


Fig. 4. Degradation of PCB 138 by the meat starter *Staphylococcus xylosus* in culture media during incubation at 30°C. Liquid culture medium was spiked with 0.01 ppm PCB 138. The PCB concentrations found in the unspiked culture media (control) were always lower than 10% and are omitted for clarity purposes. Results are expressed as percentage (mean of 3 independent experiments) of PCB concentration at the beginning of the incubation (0 h). Difference between the initial and final levels was statistically significant (Duncan's test, $p < 0.05$).

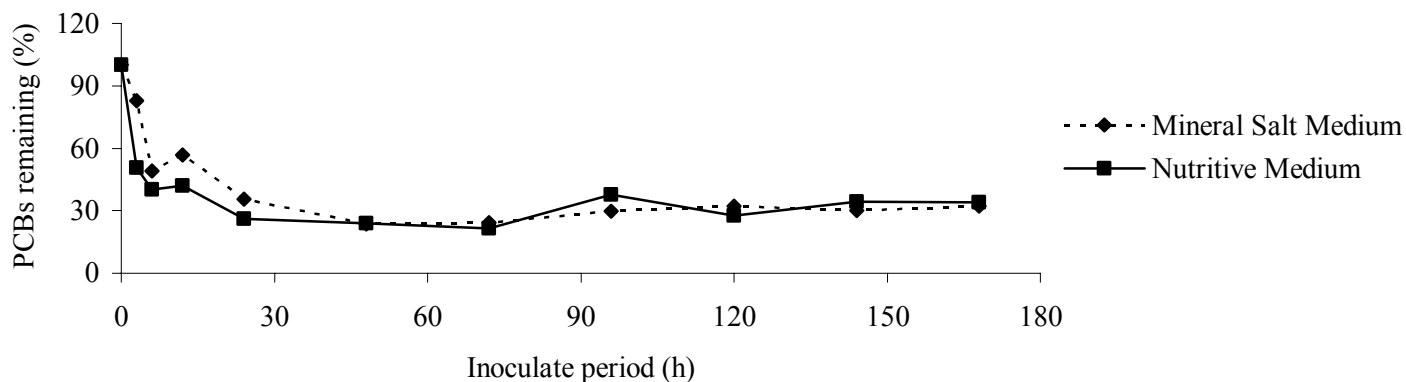


Fig. 5. Degradation of PCB 153 by the meat starter *Staphylococcus xylosus* in culture media during incubation at 30°C. Liquid culture medium was spiked with 0.01 ppm PCB 153. The PCB concentrations found in the unspiked culture media (control) were always lower than 10% and are omitted for clarity purposes. Results are expressed as percentage (mean of 3 independent experiments) of PCB concentration at the beginning of the incubation (0 h). Difference between the initial and final levels was statistically significant (Duncan's test, $p < 0.05$).

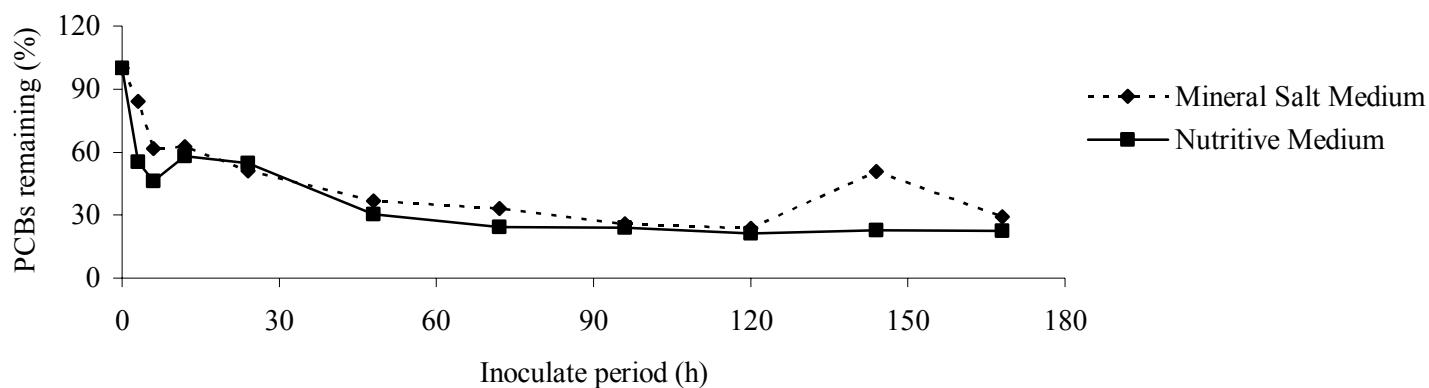


Fig. 6. Degradation of PCB 180 by the meat starter *Staphylococcus xylosus* in culture media during incubation at 30°C. Liquid culture medium was spiked with 0.01 ppm PCB 180. The PCB concentrations found in the unspiked culture media (control) were always lower than 10% and are omitted for clarity purposes. Results are expressed as percentage (mean of 3 independent experiments) of PCB concentration at the beginning of the incubation (0 h).

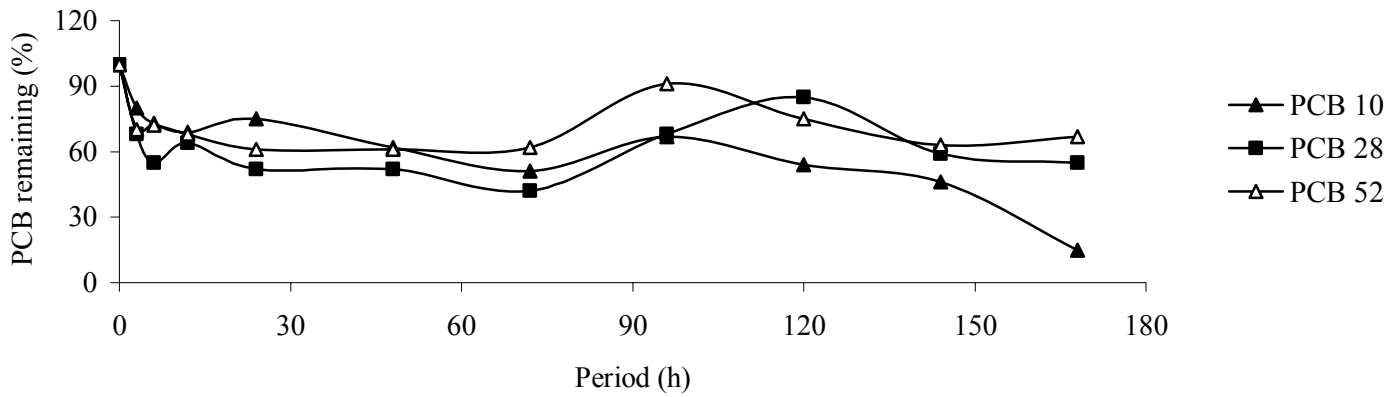
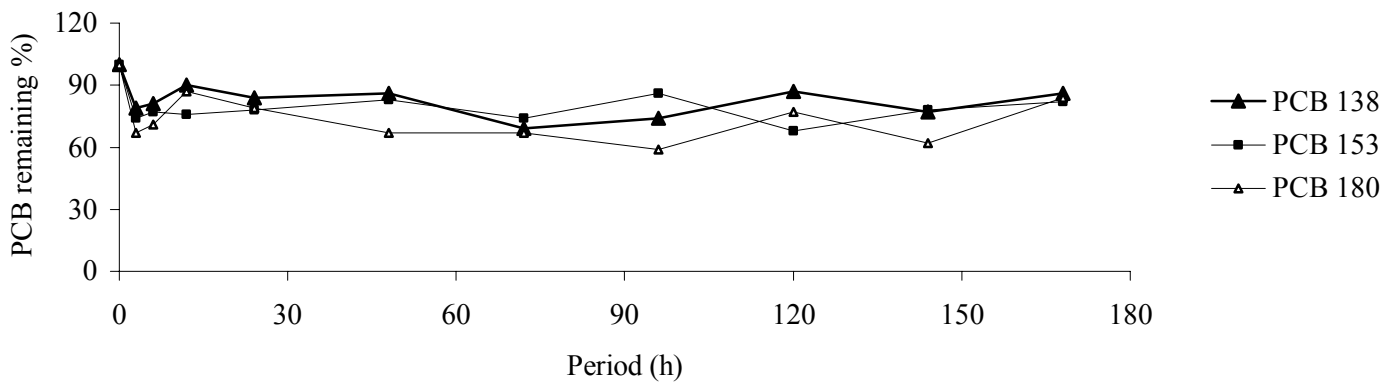
A**B**

Fig. 7. Degradation of PCBs 10, 28, 52 (A), 138, 153 and 180 (B) in the meat mixture during incubation with *Staphylococcus xylosus*. Meat mixture was spiked with $1 \mu\text{g g}^{-1}$ fat of each PCB congener and then stored at 30°C . Results (mean of 3 independent experiments) are expressed as percentage of PCB concentration at the beginning of the incubation (0 h).

3.2. Versão em língua portuguesa

Degradação de bifenilos policlorados (PCBs) por Staphylococcus xylosus em meios de cultura líquidos e massa cárnea

F. L. Leães^a, A. P. Daniel^a, G. B. Mello^b, V. Battisti^b, S. Bogusz Junior^c, T. Emanuelli^d, L. L. M. Fries^d, I. Costabeber^{b*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

^b Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

^c Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul, Ijuí, RS, Brasil. CEP: 98700-000.

^d Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

*Endereço para correspondência:

Ijoni Costabeber
Departamento de Morfologia
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Maria
Campus de Camobi
Santa Maria, RS, Brasil
CEP: 97105-900
e-mail: ijoni@smail.ufsm.br
Tel.: 55 2209375 Fax: 55 2208494

Resumo

Investigou-se o crescimento do microrganismo starter Staphylococcus xylosus em meio de cultura líquido contendo PCBs (10, 28, 52, 138, 153 e 180), e sua capacidade degradativa em meio líquido e massa cárnea durante 168 horas de incubação. A presença de PCBs não afetou o crescimento do microrganismo em meio de cultura nutritivo (BHI) ou meio de cultura salino (MS) quando comparados com o controle (sem a presença de PCBs). O microrganismo demonstrou capacidade de degradar alguns dos congêneres de PCBs testados. Uma relação exponencial significativa foi observada entre o período de incubação e os níveis dos PCBs 28 e 180 em BHI, assim como entre os níveis dos PCBs 52 e 180 em meio salino. Os PCBs 138 e 153 foram degradados em meio nutritivo (78% e 68%, respectivamente; $p < 0,05$) e em meio salino (71% e 66%, respectivamente; $p < 0,05$). A máxima degradação para estes dois congêneres de PCBs em meio de cultura líquido foi observada após 24 horas de incubação. Uma relação exponencial significativa foi observada entre o período de incubação e o PCB 10 em massa cárnea durante 168 horas de incubação. Os níveis de resíduos de PCBs podem ser reduzidos em produtos cárneos através da fermentação provocada por Staphylococcus xylosus. Portanto, o uso deste microrganismo na indústria cárnea poderá permitir a elaboração de alimentos com menor risco toxicológico.

Palavras-chaves: degradação; bifenilos policlorados; Staphylococcus xylosus; massa cárnea.

2. Introdução

Os bifenilos policlorados (PCBs) são uma classe de 209 compostos com a fórmula molecular $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, onde $1 \leq n \leq 10$. Os PCBs foram produzidos comercialmente como misturas técnicas com vários usos, sendo empregados principalmente como fluídos dielétricos em capacitores e transformadores (WHO/ICPS, 1993; Penteado e Moreira Vaz, 2001). As características de estabilidade térmica e química, resistência à corrosão química e neutralidade têm contribuído para sua persistência no meio ambiente (Haluska et al., 1995; Wiegel e Wu, 2000; Tríska et al., 2004).

Os PCBs são depositados em plantas e águas consumidas por animais e peixes. Devido às suas propriedades lipolíticas e mínima degradação, eles são biomagnificados no topo da cadeia alimentar (Zuccato et al., 1999; De Vos et al., 2003; Weisglas-Kuperus, 2004). Conseqüentemente, a maior fonte de exposição não-ocupacional a estes compostos é o consumo de alimentos, particularmente peixe, carne e produtos lácteos (Focant et al., 2002; Ahmed, 2003). Estima-se que a carne e os produtos cárneos contribuem com 14 a 19% do efeito cumulativo tóxico dos PCBs, quando comparados com outros gêneros alimentícios (Patandin et al., 1999). Dentre os efeitos descritos após a exposição aos PCBs incluem-se neurotoxicidade, imunotoxicidade, carcinogenicidade, assim como distúrbios endócrinos (Ross, 2004).

Vários métodos para a destruição de PCBs em matrizes ambientais têm sido propostos (Kubatova et al., 2001). Porém, as técnicas clássicas de remediação (processos catalíticos, incineração, etc.) são geralmente caras, e nem sempre eficientes. Atualmente, as pesquisas têm sido focadas no desenvolvimento de processos de biorremediação (Sierra et al., 2003; Andreoni et al., 2004). Desta forma, muitos microrganismos e culturas enriquecidas têm

mostrado a habilidade para metabolizar e utilizar os PCBs como fonte de carbono e/ou energia em condições aeróbicas e anaeróbicas (Abraham et al., 2002).

Estudos de degradação de resíduos de PCBs em carnes e produtos cárneos são muito importantes devido ao aumento de consumo destes alimentos em todo o mundo. Atualmente, o uso de culturas starters é muito comum no desenvolvimento de características específicas em alimentos, como alguns produtos cárneos. A possibilidade de que estes microrganismos possam degradar resíduos de PCBs é de grande interesse para a indústria cárnea, já que podem ser utilizados na redução dos riscos toxicológicos associados aos resíduos de compostos altamente estáveis.

O salame é um produto cárneo, com elevada quantidade de gordura, obtido através do uso de culturas starter de microrganismos como Micrococcus aurantiacus, Pediococcus cerevisiae (Abou-Arab, 2002) e Staphylococcus xylosus (Stahnke, 1994).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de investigar o crescimento do microrganismo starter Staphylococcus xylosus em meios de cultura líquidos contendo PCBs e de verificar a habilidade deste microrganismo em degradar PCBs em meios de cultura líquidos e massa cárnea.

2. Material e Métodos

2.1. Material

A cultura starter Bactoferm S-SX (Staphylococcus xylosus) foi adquirida de Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda. (Valinhos, SP, Brasil). O microrganismo foi isolado da cultura starter comercial. As cepas armazenadas a -18°C em leite desnatado foram repicadas em caldo BHI (MERCK) (37°C/18 horas). Após realizou-se a diluição dos microrganismos em água

peptonada a fim de alcançar uma concentração de 10^5 cels mL⁻¹ em cada um dos meios em estudo.

Os meios de cultura para o ensaio in vitro foram os seguintes: BHI (Brain Heart Infusion) (Merck, Darmstadt, Germany); meio salino (MS) preparado de acordo com Bayarri et al. (1998) e Agar Baird-Parker (Merck, Darmstadt, Germany).

n-Hexano, acetona e éter de petróleo foram obtidos da Mallinckrodt (Kentucky, USA), todos Grau Resíduo (GR). Sulfato de sódio anidro e florisil (60/100-mesh) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). O florisil foi previamente ativado a 150°C/12h e parcialmente desativado pela adição de 2% de água Milli-Q antes do uso.

As soluções padrões dos congêneres de PCBs 2,6-diclorobifenil, 2,4,4'-triclorobifenil, 2,2',5,5'-tetraclorobifenil, 2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil, 2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenil e 2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil (IUPAC nº 10, 28, 52, 138, 153 e 180, respectivamente) foram obtidos da SUPELCO Inc. (Bellefonte, PA, USA), todas com pureza superior a 98%.

2.2. Métodos

2.2.1. Experimento in vitro com o microrganismo starter

O estudo in vitro foi realizado em dois diferentes meios de cultura líquidos: meio nutritivo (BHI) e meio salino (MS). Tubos contendo 9,99 mL de meio líquido esterilizado (BHI ou MS) inoculados com Staphylococcus xylosus (10^5 cels mL⁻¹) foram contaminados com 0,01 mL de acetona ou com uma diluição de congêneres dos PCBs nº 10, 28, 52, 138, 153 e 180 preparada em acetona, a partir de uma solução padrão a 10 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Amostras não contaminadas foram usadas como controle. As amostras foram analisadas desde o início da incubação (0 h) e após 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas de incubação a 30°C. A contagem das colônias de microrganismos foi realizada para investigar algum efeito

inibitório dos PCBs. Os resíduos de PCBs que permaneceram no meio foram extraídos com hexano conforme o método descrito por Angulo (1998), com algumas modificações. O meio de cultura (10 mL) foi agitado com hexano (25 mL) e ácido sulfúrico (20 mL) em funil de separação. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica tratada quatro vezes com 5 mL de ácido sulfúrico. Após a realização da hidrólise ácida a fase orgânica foi filtrada, utilizando-se sulfato de sódio anidro, e evaporada até a secagem em evaporador rotativo. Os compostos foram reconstituídos em 2 mL de n-hexano para a sua determinação.

2.2.2. Experimento com massa cárnea

A degradação dos congêneres de PCBs ($1 \mu\text{g g}^{-1}$ de gordura) pelo microrganismo Staphylococcus xylosus foi investigada em massa cárnea preparada conforme formulação de salame [1,2 kg de carne suína, 0,4 kg de carne bovina, 0,4 kg de bacon, 6 g de sal de cura (nitrito e nitrato de sódio), 5 g de ascorbato de sódio, 50 g de cloreto de sódio, 20 g de sacarose, 10 g de tempero comercial e 0,1% de cultura starter]. A incubação foi realizada a 30°C durante 7 dias. Foram analisadas amostras do início da incubação (0 h) e após 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas para determinar os resíduos de PCBs. Amostras não contaminadas foram usadas como controle. A gordura da massa cárnea foi extraída conforme descrito por Waliszewski et al. (1997), com algumas modificações. Em resumo, cada amostra homogeneizada (50 g) foi misturada com quantidade suficiente de sulfato de sódio, transferida para coluna cromatográfica (50 x 1 cm) e a gordura extraída com 120 mL de éter de petróleo. O extrato foi transferido para balão de 50 mL e o solvente eliminado em evaporador rotativo. A gordura (1 g) foi transferida para uma coluna cromatográfica contendo 15 g de florisil e sulfato de sódio anidro, e eluída com 100 mL de n-hexano para extrair os PCBs. O eluído foi filtrado em funil com sulfato de sódio anidro, evaporado até a secagem,

dissolvido em 2 mL de n-hexano, e usado para a determinação dos PCBs. A limpeza de toda vidraria utilizada foi realizada conforme a técnica de Angulo et al. (1996).

2.2.3. Análise da degradação dos PCBs

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo gasoso Hewlett Packard modelo 6890 equipado com detector de captura de elétrons de ^{63}Ni (GC/ μECD). Foi utilizada uma coluna capilar Agilent HP-5 (crosslinked 5% PH ME siloxane) (30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura da fase estacionária). As condições de operação foram as seguintes: temperatura do injetor 250°C, temperatura do detector 350°C; e as programações para a rampa de temperatura foram as seguintes: 110°C (durante 5 min) e gradiente de 14°C/min até 280°C. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste em um fluxo de 1,6 mL/min. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Para determinar a qualidade do método, o estudo da recuperação foi realizado utilizando-se dez replicatas de brancos da gordura da massa cárnea e dez replicatas de brancos dos meios de cultura líquidos contaminados com PCBs (contaminação inicial inferior ao limite de detecção). As recuperações variaram de 42,3% a 86,1% e 97,3% a 110,0% para os meios de cultura líquidos e a gordura da massa cárnea, respectivamente, dependendo do congênere de PCB. Os limites de detecção (ng mL^{-1} de meio de cultura) para meio de cultura líquido foram de 0,1 para os PCBs 10, 28 e 153; 0,2 para os PCBs 52 e 138; e 0,4 para o PCB 180. Para a massa cárnea, os limites de detecção (ng g^{-1} de gordura) foram de 0,2 para os PCBs 10, 28 e 52; e 0,5 para os PCBs 138, 153 e 180.

2.3. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software Statistica[®] 6.0. Os resultados foram tratados através de análise de variância com medida repetida (ANOVA): 2 meios de cultura x 3 tratamentos x 11 tempos de incubação para a avaliação do crescimento do microrganismo, e 2 meios de cultura x 2 tratamentos x 11 tempos de incubação para a degradação dos PCBs, exceto para os resultados do PCB 10 que foram avaliados por ANOVA de duas vias com medida não repetida devido a existência de grupos sem variância (todos os níveis de PCBs abaixo do limite de quantificação). Análises *Post hoc* foram realizadas usando teste de Duncan quando apropriado. Diferenças são consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. As variações nas concentrações de PCBs durante o período de incubação foram ajustadas usando regressão não linear (software SlideWrite Plus[®] 4.0) seguindo a equação exponencial:

$$y = a + b \cdot \exp (-x/c) \quad (1)$$

3. Resultados

3.1. Efeito dos PCBs no crescimento do microrganismo starter

A adição da mistura de PCBs 10, 28, 52, 138, 153 e 180 (0,01 ppm de cada composto) não afetou o crescimento do Staphylococcus xylosus em meio de cultura nutritivo (BHI) ou meio de cultura salino (MS) (figura 1). No meio de cultura nutritivo o número de colônias aumentou aproximadamente 3 unidades logarítmicas durante as 12 horas iniciais, enquanto que no meio de cultura salino o aumento foi de aproximadamente 4 unidades logarítmicas. Este comportamento foi observado para os três tratamentos (controle, acetona e mistura de PCBs) com diferenças não significativas entre os mesmos.

3.2. Degradação in vitro dos PCBs pelo microrganismo starter Staphylococcus xylosus

As figuras de 2 a 6 resumem as porcentagens de PCBs que permanecem no meio de cultura depois da incubação com Staphylococcus xylosus. Estas foram calculadas em relação às concentrações iniciais de PCBs (0 h). ANOVA não revelou efeitos ou interações significantes para o PCB 10. Além disso, relações exponenciais não significativas foram observadas entre o tempo de incubação e as concentrações do PCB 10, indicando que o composto não foi degradado depois de 168 horas de incubação em ambos os meios de cultura. ANOVA revelou um significativo efeito do tempo de incubação e foi observada uma significativa interação do tratamento x tempo de incubação para os PCBs 138 e 153, indicando que estes compostos foram degradados nos meios BHI (78% e 68%, respectivamente) e em meio salino (71% e 66%, respectivamente) (Figuras 4 e 5). A degradação máxima ocorreu em 24 horas para ambos os compostos. Uma relação exponencial significativa foi observada entre o período de incubação e as concentrações do PCB 28 ($r = -0,96$; $p < 0,05$) e PCB 180 ($r = -0,89$; $p < 0,05$) em BHI (Figuras 2 e 6). Em meio salino, foi observada uma relação significativa entre o período de incubação e as concentrações dos PCBs 52 ($r = -0,84$; $p < 0,05$) e 180 ($r = -0,97$; $p < 0,05$), indicando que estes compostos foram degradados significativamente durante a incubação (Figuras 3 e 6).

3.3. Degradação dos PCBs em massa cárnea

A figura 7 mostra o efeito do desenvolvimento do microrganismo starter Staphylococcus xylosus sobre os níveis de PCBs na massa cárnea. A evolução das concentrações durante o período de incubação é expressa como porcentagem de níveis de PCBs em relação à concentração no início da incubação. ANOVA não revelou efeitos ou interações significantes

para nenhum composto avaliado. Porém, uma relação exponencial significativa foi observada entre o período de incubação e o PCB 10 ($r = -0,88$; $p < 0,05$), indicando que este composto foi degradado significativamente durante a incubação. Não foi observada relação exponencial significativa entre o período de incubação e os outros congêneres de PCBs avaliados (28, 52, 138, 153 e 180), indicando que estes compostos não foram degradados significativamente na massa cárnea durante as 168 horas de incubação.

4. Discussão

4.1. Efeito dos PCBs no crescimento do microrganismo starter

A solução padrão com os PCBs 10, 28, 52, 138, 153 e 180 não afetou o crescimento do Staphylococcus xylosus. Em contraste, Bayarri (1997) observou uma redução no crescimento de Staphylococcus carnosus em dois meios de cultura líquidos (nutritivo e salino) contendo uma mistura de compostos organoclorados e PCB 153. Entretanto, cada microrganismo comporta-se de maneira diferente frente ao stress causado por contaminantes (Abraham, 2002) e não foram encontrados estudos avaliando a influência dos PCBs no crescimento do Staphylococcus xylosus, tornando difícil a comparação de nossos resultados. Além disso, a população microbiana pode adaptar-se a presença de compostos organoclorados através de vários mecanismos, incluindo o desenvolvimento de um sistema enzimático apropriado para eliminar o fator de stress, isto é, capaz de degradar os contaminantes do meio (Dolfing e Beurskens, 1995). Este mecanismo pode explicar o crescimento normal do Staphylococcus xylosus na presença de PCBs quando comparado com o controle.

4.2. Degradação in vitro dos PCBs pelo microrganismo starter *Staphylococcus xylosus*

O metabolismo dos microrganismos pode variar dependendo das circunstâncias ambientais. Muitos fatores como temperatura, pH e conteúdo de carbono podem influenciar fortemente o grau, extensão e rota de degradação dos PCBs (Wiegel e Wu, 2000; Borja et al., 2005). Microrganismos podem degradar preferencialmente outras substâncias orgânicas antes dos PCBs. Este comportamento não pode ser avaliado em meio de cultura salino, onde a única fonte de carbono são os PCBs (Katayama e Matsumura, 1993; Klasson, 1996).

Fedi et al. (2001), avaliaram a degradação de PCBs por quinze cepas de bactérias aeróbicas usando o bifenilo como única fonte de carbono e energia. Similar aos nossos resultados, neste estudo algumas cepas reduziram em mais de 75% a concentração do PCB 28. Por outro lado, após sete dias de incubação em um meio de cultura salino contendo uma mistura comercial de PCBs (Aroclor 1242), a bactéria aeróbica *Janibacter* sp. degradou 100% do PCB 10 e 92% do PCB 52 (Sierra et al., 2003). Este relato contrasta com nossos resultados nos quais os PCBs 10 e 28 não foram degradados de forma significativa em meio de cultura salino pelo *Staphylococcus xylosus*.

Com relação à degradação dos PCBs 138, 153 e 180 em ambos os meios de cultura, nossos resultados estão de acordo com Bayarri (1997), que verificou que outros microrganismos (*Micrococcus varians* e *Staphylococcus carnosus*) degradaram compostos com vários átomos de cloro, como o PCB 153 (seis átomos de cloro), em condições aeróbicas. Porém, Segundo Abraham (2002), microrganismos geralmente degradam PCBs com baixo grau de cloração em condições aeróbicas, enquanto que PCBs altamente clorados são comumente degradados por microrganismos em condições anaeróbicas.

Vários autores verificaram a degradação microbiana de PCBs em condições aeróbicas (Ruiz-Aguilar, 2002; Komancová et al., 2003), porém a maior parte dos estudos avaliou microrganismos isolados do solo, água ou sedimentos. Poucos estudos investigaram a degradação de compostos organoclorados por microrganismos starters utilizados em produtos cárneos. Mirna e Coretti (1979) observaram que micrococcos e lactobacilos obtidos de uma cultura starter comercial degradou lindano (70% e 90%, respectivamente), após duas semanas de incubação em meio nutritivo. No mesmo estudo, foram observadas a degradação de DDT e sua conversão a DDD por micrococcos, porém não foi observada degradação por lactobacilos. Bayarri et al. (1998) observaram que alguns compostos organoclorados foram degradados pelo microrganismo starter Micrococcus varians em um estudo in vitro em meio de cultura salino. Embora estes estudos não tenham avaliado a degradação de PCBs, os resultados encontrados são similares aos que obtivemos com Staphylococcus xylosus e indicam que microrganismos starters são capazes de degradar alguns compostos organoclorados. Esta degradação pode ser importante para a redução do risco toxicológico associado aos resíduos de PCBs em produtos cárneos.

4.3. Degradação dos PCBs em massa cárnea

De acordo com Ariño et al. (1995) microrganismos utilizados em produtos cárneos degradam enzimaticamente parte dos compostos organoclorados, usando estes compostos como fonte de carbono. Esta degradação pode ser favorecida por muitos fatores como o contato enzima-substrato favorecido pelos processos de corte e mistura dos ingredientes.

A disposição espacial dos substituintes halogenados influencia a degradação dos PCBs (Bedard et al., 1986; Fetzner e Lingens, 1994). Bopp (1986) encontrou que congêneres de PCBs orto substituídos são altamente resistentes a degradação por Pseudomonas cepa LB400.

Em contraste, no presente estudo, no qual os PCBs 10, 52, 138, 153 e 180 são congêneres di-orto substituídos, foi observada redução somente nos níveis do PCB 10 na massa cárnea. Salienta-se que a resistência do PCB 52 à degradação é importante já que este PCB está associado a lesões malignas (Lucena et al., 2001). A degradação de congêneres não-orto e mono-orto substituídos é muito importante, porém os compostos para e meta substituídos estão mais relacionados estruturalmente a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina e possuem efeitos parecidos com a dioxina, isto é, efeitos carcinogênicos (Penteado e Moreira Vaz, 2001). O congêneres mono-orto substituído (PCB 28) avaliado no presente estudo foi degradado somente no meio de cultura nutritivo (BHI).

Alguns autores indicam que a magnitude de degradação está inversamente relacionada ao número de átomos de cloro no composto. Conseqüentemente, o PCB 10 (dicloro substituído) foi o único congêneres degradado de maneira significativa durante a incubação da massa cárnea, enquanto que os PCBs altamente clorados foram pouco degradados e de maneira não significativa. Similar ao nosso estudo, Bayarri (1997) não observou redução significativa nos níveis do PCB 153 durante a maturação de salame preparado com uma cultura comercial contendo Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosaceus e Micrococcus varians.

Abou-Arab (2002) investigou a habilidade de dois microrganismos starter (Lactobacillus plantarum e Micrococcus varians) em degradar praguicidas organoclorados em massa cárnea. Após 72 horas foi observada uma redução de 10% nos níveis de p,p'-DDT e 18% nos níveis de lindano. Ariño et al. (1993) encontraram 30% de redução dos níveis de lindano em salame após 30 dias de cura, indicando uma possível ação da microflora fermentadora da carne.

Muitos autores investigaram os efeitos de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos sobre os níveis de PCBs em matrizes orgânicas, especialmente solo e sedimentos (Chang et al., 2001; Fedi et al., 2001; Nawab et al. 2003; Sierra et al., 2003). Um pequeno número de

investigações usando carne como matriz orgânica foi realizado (Mirna e Coretti, 1979; Ariño et al., 1993; Bayarri et al., 1998; Abou-Arab, 2002), e nestes experimentos vários microrganismos starter foram utilizados. Porém, ainda não foram encontrados estudos que relatem a capacidade do Staphylococcus xylosus de degradar PCBs.

5. Conclusão

Em resumo, verificou-se que o microrganismo Staphylococcus xylosus diminuiu as concentrações de alguns congêneres de PCBs em meios de cultura líquidos e em massa cárnea. Isto pode indicar que a fermentação em produtos cárneos reduz os resíduos de PCBs. É possível também que os PCBs possam ser degradados durante toda a vida de prateleira do produto fermentado. A degradação de PCBs em produtos cárneos fermentados pode trazer benefícios para a saúde do consumidor, porém, outros estudos são necessários para identificar os compostos formados e os mecanismos de degradação dos PCBs por Staphylococcus xylosus.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa). I. Costabeber recebeu bolsa PROFIX.

Referências

Abou-Arab, A. A. K. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. Food. Chem. Toxicol. 2002, 40: 33-41.

- Abraham, W. R., Nogales, B., Golyshin, P. N., Pieper, D. H., Timmis, K. N. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002; 5: 246–253.
- Ahmed, F. E. Analysis of polychlorinated biphenyls in food products. *Trends. Anal. Chem.* 2003; 22 (3): 170-185.
- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M. A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Colombo, M., Gianfreda, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 2004; 57: 401–412.
- Angulo, R., 1998. Residuos persistentes organoclorados en leche humana. Tesis Doctoral, Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España. 312 p.
- Angulo, R., Costabeber, I., Gallego, M. C., Serrano, S., Jodral, M. Clean-up distillation: critical points in the organochlorine residue analysis. In 1ST European Pesticide Residue Workshop, Alkamaar, Netherlands, 1996, p. 59.
- Ariño, A., Herrera, A., Conchello, M. P., Lazaro, R., Perez, C. Hexachlorocyclohexane residues in meat products after processing. *J. Food. Comp. Anal.* 1993; 6: 55-61.
- Ariño, A., Lázaro, R., Conchello, P., Bayarri, S. and Herrera, A. The effect of processing on incurred residues of DDE in meat products. *Food. Add. Contam.* 1995, 12 (4): 559-566.
- Bayarri, S., 1997. Degradación de residuos de contaminantes clorados en productos cárnicos por el procesado y la acción de microorganismos responsables de maduración. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. 364 p.
- Bayarri, S., Herrera, A. Conchello, M.P., Agustin, A., Ariño, A., Lázaro, R. and Yagüe, C. Influence of meat processing and meat starter microorganisms on the degradation of organochlorine contaminants. *J. Agric. Food. Chem.* 1998; 46: 3187-3193.

- Bedard, D.L., Unterman, R., Bopp, L.H., Brennan, M.J., Haberl, M.L. and Johnson, C. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade PCBs. *App. Environ. Microbiol.* 1986; 51: 761-768.
- Bopp, L.H. Degradation of highly chlorinated PCBs by Pseudomonas strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* 1986; 1: 13-29.
- Borja, J., Taleon, D.M., Auresenia, J., Gallardo, S. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process. Biochem.* 2005. Article in press.
- Chang, B.V., Liu, W.G. and Yuan, S.Y. Microbial dechlorination of three PCB congeners in river sediment. *Chemosphere* 2001; 45: 849-856.
- De Vos, S., Maervoet, J., Schepens, P., De Schrijver, R. Polychlorinated biphenyls in broiler diets: their digestibility and incorporation in body tissues. *Chemosphere* 2003; 51: 7-11.
- Dolfing, J. and Beurskens, E.M. The microbiologic and environmental significance of reductive dehalogenation. *Adv. Microb. Ecol.* 1995; 14: 143-205.
- Fedi, S., Carnevali, M., Fava, F., Andracchio, A., Zappoli, S. and Zannoni, D. Polychlorinated biphenyl degradation activities and hybridization analyses of fifteen aerobic strains isolated from a PCB-contaminated site. *Res. Microbiol.* 2001; 152: 283-292.
- Fetzner, S. and Lingens, F. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics and biotechnological applications. *Microbiol. Reviews* 1994; 58 (4): 641-685.
- Focant, J.F., Eppe, G., Pirard, C., Massart, A. C., André, J. E., De Pauw, E. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs in Belgian foodstuffs – Assessment of dietary intake. *Chemosphere* 2002; 48: 167-179.
- Haluska, L., Baranciková, G., Baláz, S, Dercová, K., Vrana, B., Paz-Weisshaar, M., Furciová, E., Blielek, P. Degradation of PCB in different soils by inoculated Alcaligenes xylosoxidans. *Sci.Total Environ.* 1995; 175: 275-285.

- Hess, P., de Boer, J., Cofino, W. P., Leonards, P. E. G. and Wells, D. E. Critical review of the analysis of non-planar and mono-ortho-chlorobiphenyls. Review. J. Chromatography A. 1995; 703: 417-465.
- Katayama, A. and Matsumura, F. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by Trichoderma harzianum. Environ. Toxicol. Chem. 1993; 12: 1059-1065.
- Klasson, K.T., Barton, J.W., Evans, B.S. and Reeves, M.E. Reductive microbial dechlorination of indigenous polychlorinated biphenyls in soil using a sediment-free inoculum. Biotechnol. Progress 1996; 12 (3): 310-315.
- Komancová, M., Jurcová, I., Kochánková, L., Burkhard, J. Metabolic pathways of polychlorinated biphenyls degradation by Pseudomonas sp. 2. Chemosphere 2003; 50: 537-543.
- Kubatova, A., Erbanová, P., Eichlerová, I., Homolka, L., Nerud, F., Sasek, V. PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus Pleurotus ostreatus in contaminated soils. Chemosphere 2001; 43: 207-215.
- Lucena, R. A., Allam, M. F., Costabeber, I. H., Villarejo, M. L. J., Navajas, R. F-C. Breast cancer risk factors: PCB congeners. Eur. J. Cancer Prev. 2001; 10 (1): 117-119.
- Mirna, A. and Coretti, K. Influence of processing on the degradation of pesticides in meats products. Meat Sci. 1979; 3: 97-108.
- Nawab, A., Aleem, A. Malik, A. Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to γ -HCH degradation by Pseudomonas strains. Biores. Technol. 2003; 88: 41-46.
- Patandin, S., Dagnelie, P. C., Mulder, P. G. H., De Coul, E. O., Van der Veen, J. E., Weisglas-Kuperus. Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: A comparison between breast-feeding, toddler, and longterm exposure. Environ. Health Perspec 1999; 107 (10): 496-497.

- Penteado, J. C. P., Moreira Vaz, J. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). *Química Nova* 2001; 24 (3): 390-398.
- Ross, G. The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotox. Environ. Safety* 2004; 59: 275-291.
- Ruiz-Aguilar, G.M.L., Fernández-Sánchez, J.M., Rodríguez-Vásquez, R. Poggi-Varaldo, H. Degradation by White-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Adv. Environ. Res.* 2002; 6: 559-568.
- Sierra, I., Valera, J. L., Marina, M. L., Laborda, F. Study of the biodegradation process of polychlorinated biphenyls in liquid medium and soil by a new isolated aerobic bacterium (*Janibacter* sp.). *Chemosphere* 2003; 53: 609-618.
- Stahnke, L. H. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels - Part I. Chemical and Bacteriological Data. *Meat Sci.* 1995; 41 (2): 191-1995.
- Tríska, J., Kuncová, G., Macková, M., Nováková, H., Paasivirta, J., Mirja Lahtiperä, M., Vrchotová, N. Isolation and identification of intermediates from biodegradation of low chlorinated biphenyls (Delor-103). *Chemosphere* 2004; 54: 725-733.
- Waliszewski, S. M., Pardio, V. T., Waliszewski, K. N., Chantiri, J. N., Aguirre, A. A., Infanzón, R. M., Rivera, J. Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico. *Sci. Total Environ.* 1997; 208: 127-132.
- Weiglas-Kuperus, N., Vreugdenhil, H. J. I., Mulder, P. G. H. Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch school children. *Toxicol. Lett.* 2004; 149: 281-285.
- Wiegel, J. & Wu, Q., 2000. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000; 32: 1-15.

WHO (World Health Organization), 1993. Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls, second ed. WHO, Geneva.

Zuccato, E., Calvarese, S., Mariani, G., Mangiapan, S., Grasso, P., Guzzi, A., Fanelli, R. Level, sources and toxicity of polychlorinated biphenyls in the Italian diet. *Chemosphere* 1999; 38 (12): 2753-2765.

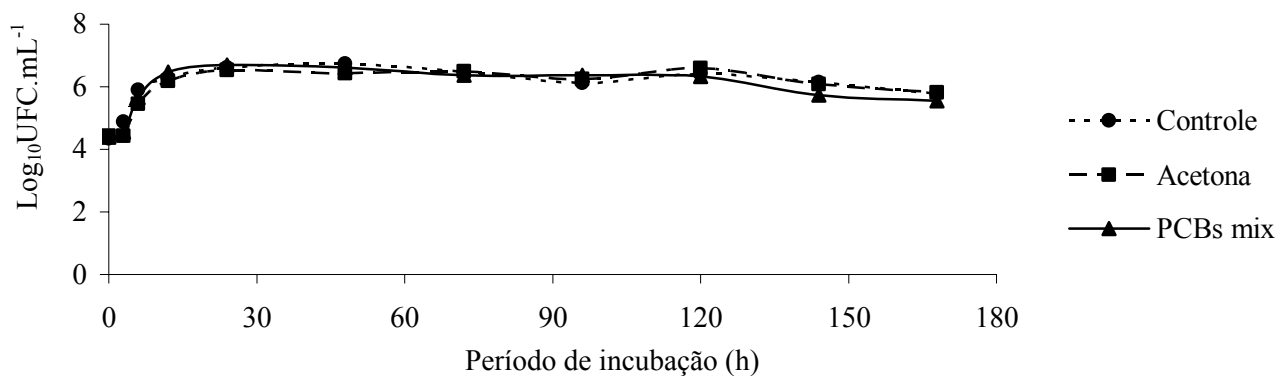
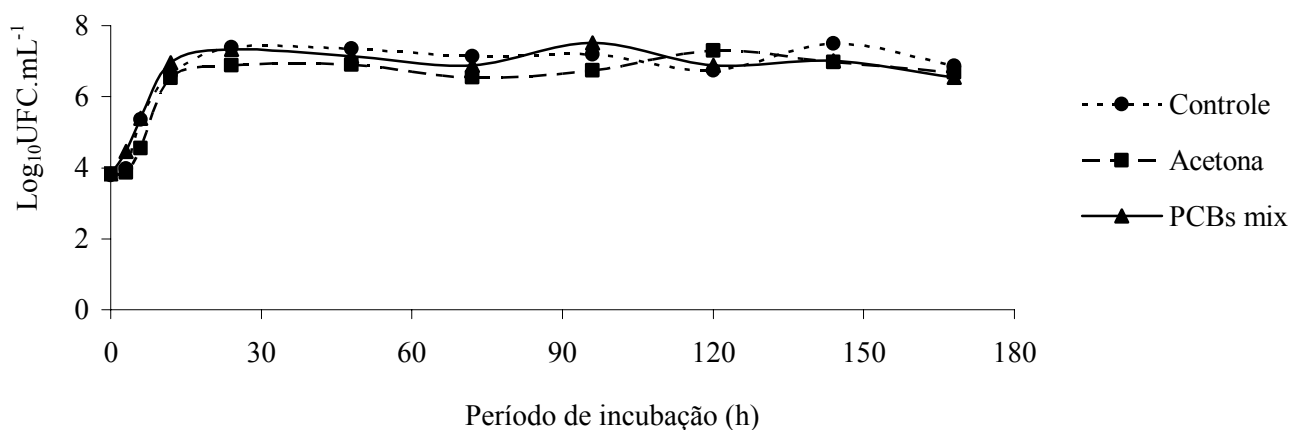
A**B**

Fig. 1: Crescimento de *Staphylococcus xylosum* em meio nutritivo (BHI; A), ou meio salino (MS, B) durante 168h de incubação a 37°C. Os meios não foram contaminados (controle) ou foram contaminados com 0,01 ppm de uma mistura de PCBs (congêneres 10, 28, 52, 138, 153 e 180) ou acetona (veículo da mistura de PCBs). Os resultados são médias de três experimentos independentes.

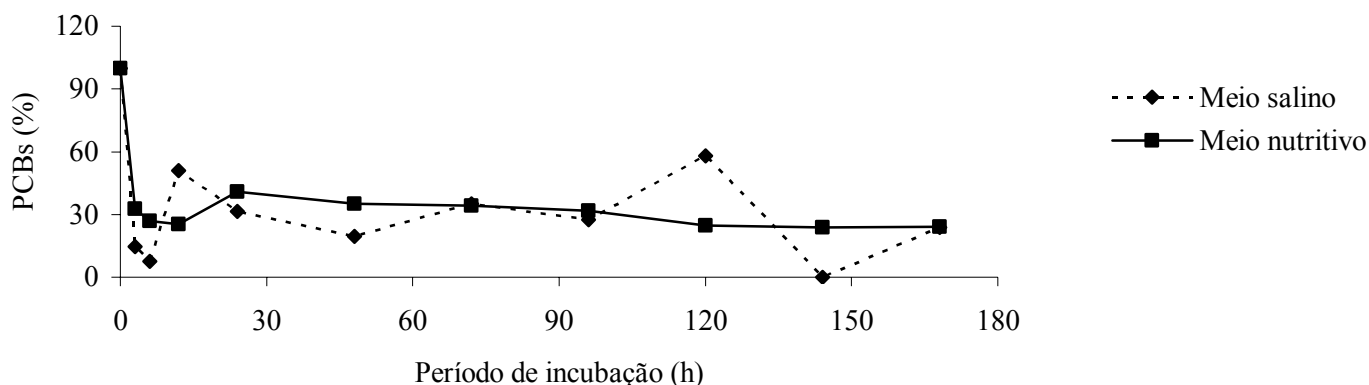


Fig. 2. Degradação do PCB 28 pelo microrganismo starter *Staphylococcus xylosus* em meio de cultura durante a incubação a 30°C. Os meios de cultura líquidos foram contaminados com 0,01 ppm de PCB 28. As concentrações do PCB encontradas nos meios de cultura sem contaminação (controle) estavam sempre abaixo de 10% e foram omitidas com o propósito de tornar mais clara a visualização da degradação. Os resultados são expressos como porcentagem da concentração inicial do PCB (0 h).

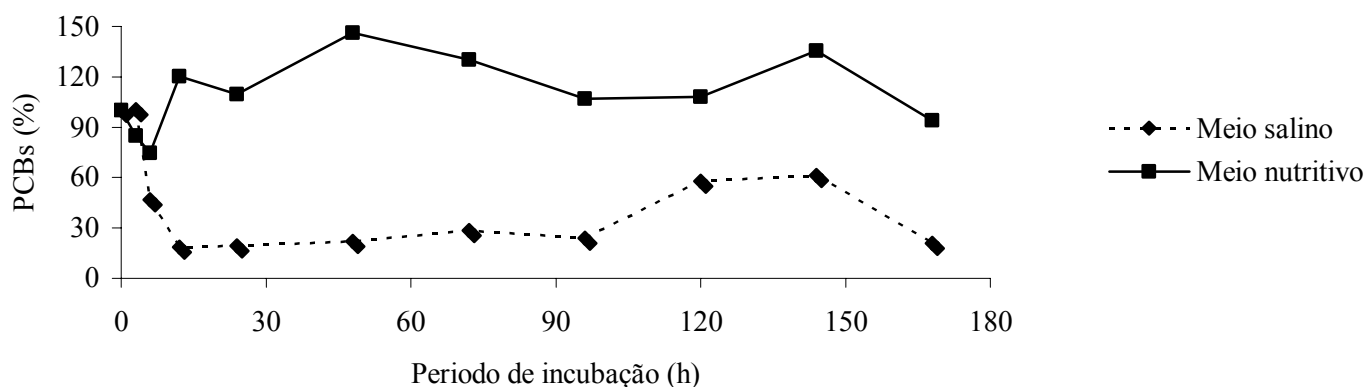


Fig. 3. Degradação do PCB 52 pelo microrganismo starter *Staphylococcus xylosus* em meio de cultura durante a incubação a 30°C. Os meios de cultura líquidos foram contaminados com 0,01 ppm de PCB 52. As concentrações do PCB encontradas nos meios de cultura sem contaminação (controle) estavam sempre abaixo de 10% e foram omitidas com o propósito de tornar mais clara a visualização da degradação. Os resultados são expressos como porcentagem da concentração inicial do PCB (0 h).

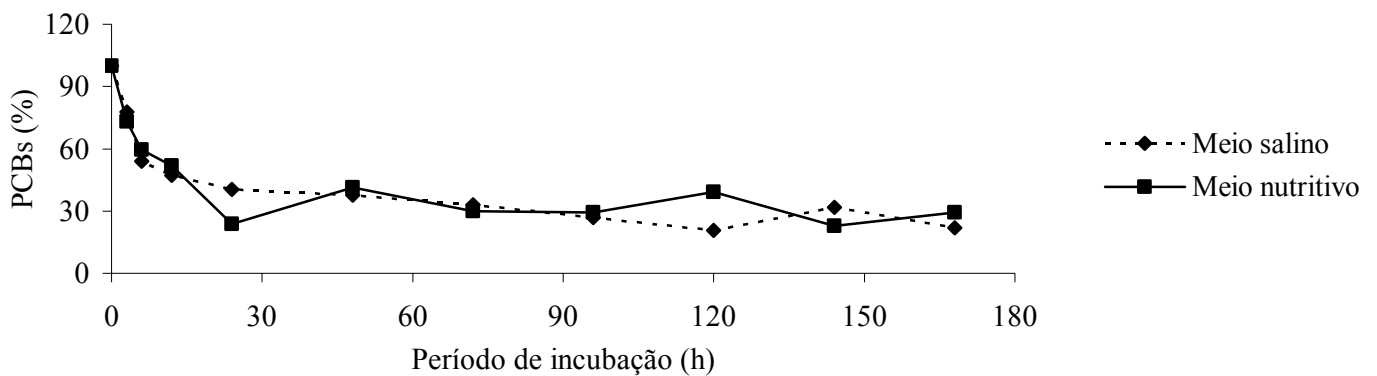


Fig. 4. Degradação do PCB 138 pelo microrganismo starter *Staphylococcus xylosus* em meio de cultura durante a incubação a 30°C. Os meios de cultura líquidos foram contaminados com 0,01 ppm de PCB 138. As concentrações do PCB encontradas nos meios de cultura sem contaminação (controle) estavam sempre abaixo de 10% e foram omitidas com o propósito de tornar mais clara a visualização da degradação. Os resultados são expressos como porcentagem da concentração inicial do PCB (0 h). As diferenças entre as concentrações iniciais e finais foram estatisticamente significativas (teste de Duncan, $p < 0,05$).

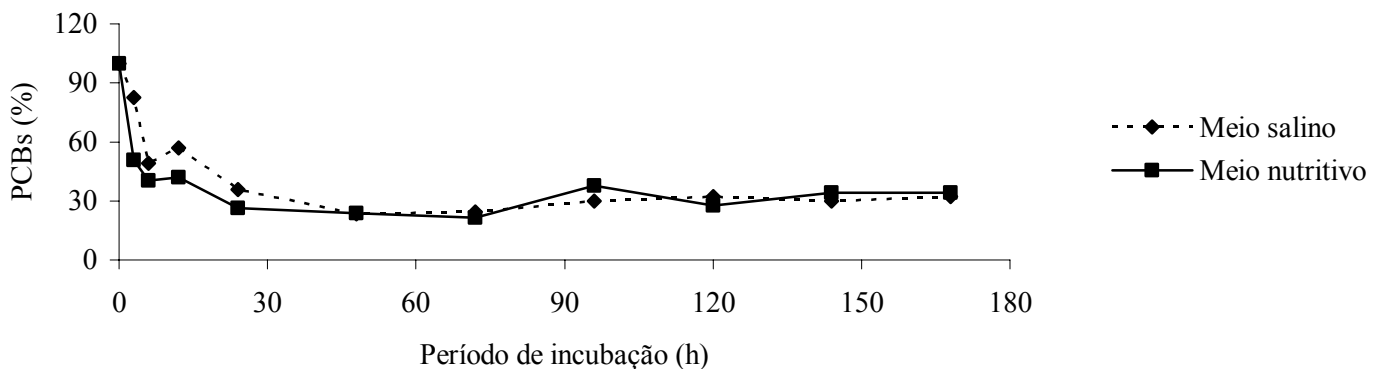


Fig. 5. Degradação do PCB 153 pelo microrganismo starter *Staphylococcus xylosus* em meio de cultura durante a incubação a 30°C. Os meios de cultura líquidos foram contaminados com 0,01 ppm de PCB 153. As concentrações do PCB encontradas nos meios de cultura sem contaminação (controle) estavam sempre abaixo de 10% e foram omitidas com o propósito de tornar mais clara a visualização da degradação. Os resultados são expressos como porcentagem da concentração inicial do PCB (0 h). As diferenças entre as concentrações iniciais e finais foram estatisticamente significativas (teste de Duncan, $p < 0,05$).

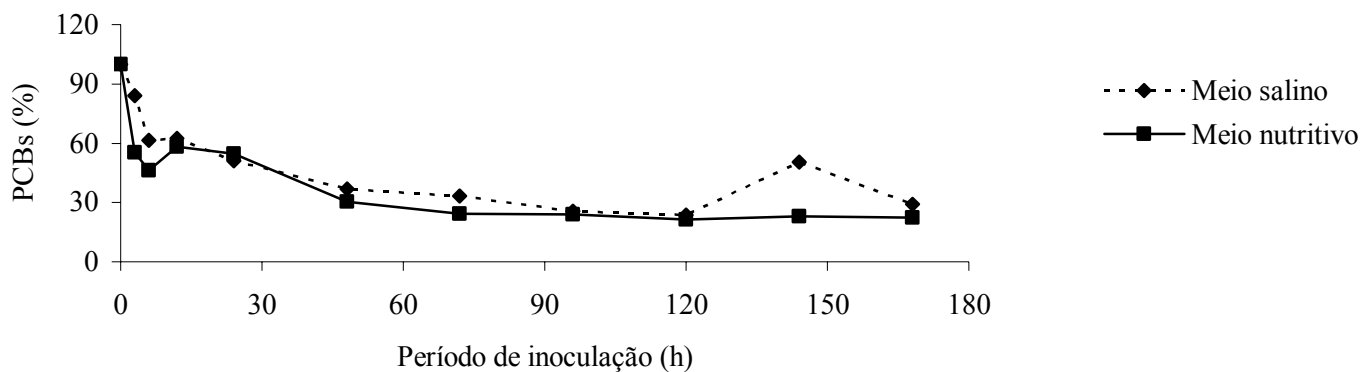


Fig. 6. Degradação do PCB 180 pelo microrganismo starter *Staphylococcus xylosus* em meio de cultura durante a incubação a 30°C. Os meios de cultura líquidos foram contaminados com 0,01 ppm de PCB 180. As concentrações do PCB encontradas nos meios de cultura sem contaminação (controle) estavam sempre abaixo de 10% e foram omitidas com o propósito de tornar mais clara a visualização da degradação. Os resultados são expressos como porcentagem da concentração inicial do PCB (0 h).

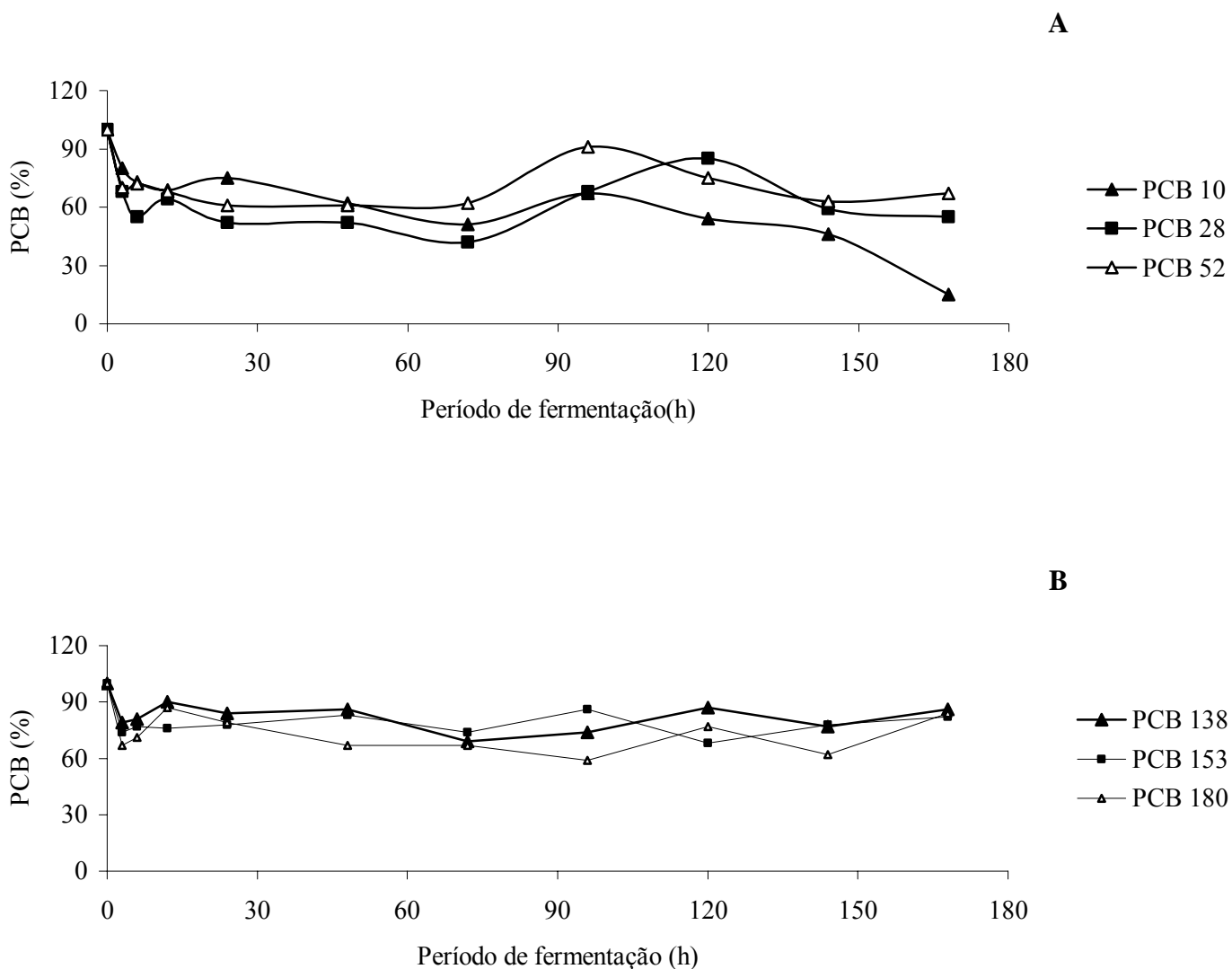


Fig. 7. Degradação dos PCBs 10, 28, 52 (A), 138, 153 e 180 (B) na massa cárnea durante a incubação com *Staphylococcus xylosus*. A massa cárnea foi contaminada com $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de gordura de cada congêneres de PCB e incubada a 30°C . Os resultados (média de 3 experimentos independentes) são expressos como porcentagem da concentração inicial de PCBs (0 h).

4. DISCUSSÃO

As culturas starters desempenham um papel primordial no processo de elaboração de alguns produtos cárneos, possibilitando o desenvolvimento de características organolépticas desejáveis pelo consumidor. Além disso, os microrganismos utilizados na indústria cárnea são responsáveis pela degradação de alguns contaminantes organoclorados devido a sua ação metabólica, usando estes compostos como fonte de carbono (BAYARRI et al., 1998). Dentre estas substâncias químicas tóxicas, os bifenilos policlorados (PCBs) destacam-se por serem uma classe de compostos organoclorados comumente encontrados em alimentos de origem animal (BAYARRI, 1997a).

No presente trabalho investigou-se o crescimento do cultivo iniciador *Staphylococcus xylosus* em meios de cultura na presença de bifenilos policlorados e verificou-se a atividade degradativa desse microrganismo sobre os níveis dos PCBs *in vitro* (meios de cultura) e em massa cárnea.

A influência da presença de PCBs no crescimento de *Staphylococcus xylosus* foi verificada em meios de cultura salino e nutritivo. Em ambos os meios não foram observadas diferenças significativas entre as contagens de colônias do microrganismo quando comparadas aos controles. Em meio de cultura nutritivo, verificou-se um aumento de aproximadamente três unidades logarítmicas no número de colônias nas primeiras 12 horas de incubação e um leve decréscimo no final do período. Já em meio de cultura salino, o aumento no número de colônias foi de aproximadamente quatro unidades logarítmicas nas primeiras 12 horas de incubação, permanecendo a mesma contagem até o fim do experimento (hora 168). Este comportamento do microrganismo *Staphylococcus xylosus* pode ser explicado pelo fato da população microbiana adaptar-se a presença de compostos organoclorados de várias formas, como, por exemplo, desenvolvendo um sistema enzimático apropriado para degradar o contaminante do meio (DOLFING & BEURSKENS, 1995). Porém, cada microrganismo possui um comportamento distinto frente ao stress causado por contaminantes (ABRAHAM, 2002). Desta forma, estudos utilizando-se *Staphylococcus carnosus* demonstraram um menor crescimento do microrganismo em meios de cultura salino e nutritivo contaminados

com compostos organoclorados e PCB 153 quando comparados com os controles (meios de cultura nutritivo e salino sem contaminação) (BAYARRI, 1997a).

Na verificação da degradação em meios de cultura (*in vitro*), observou-se uma relação exponencial significativa entre o período de incubação e os PCBs 52 e 180 em meio de cultura salino, no qual a degradação foi de aproximadamente 80% para os referidos congêneres. Sierra et al. (2003) verificaram uma degradação de 92% para o PCB 52 em meio de cultura salino incubado com *Janibacter* sp., concordando com o resultado obtido em nosso experimento. Em meio de cultura nutritivo foi verificada uma relação exponencial significativa entre o período de incubação e os PCBs 28 e 180, os quais foram degradados em 75% e 71%, respectivamente. Com relação ao PCB 28, resultado semelhante foi observado por Fedi et al. (2001) que verificaram uma degradação superior a 75% em estudo utilizando quinze cepas de diferentes bactérias aeróbicas. Segundo Klassom (1996) os microrganismos utilizam os PCBs como fonte de carbono somente após utilizarem as outras substâncias orgânicas presentes em um meio de cultura nutritivo. Porém, este fato não ocorre em um meio de cultura salino, onde a única fonte de carbono são os PCBs. Essa afirmação pode indicar que os PCBs são degradados mais rapidamente em um meio salino, porém, isso não foi observado em nossos experimentos. Os PCBs 138 e 153 foram degradados significativamente em ambos os meios em percentagens de 78% e 68%, respectivamente, para o meio nutritivo e 71% e 66%, respectivamente, para o meio salino. Este decréscimo nas concentrações dos compostos foi observado durante todo o período de incubação e as análises estatísticas demonstraram um $p < 0,05$ no final do experimento (hora 168). Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Bayarri (1997a) que observou a habilidade de microrganismos aeróbicos em degradar compostos com vários átomos de cloro, como o PCB 153 que possui seis átomos de cloro em sua molécula. Porém, contrário a esses resultados, Abraham (2002) afirma que os PCBs com alto grau de cloração geralmente são degradados por microrganismos em condições anaeróbicas e em condições aeróbicas são degradados os PCBs com baixo grau de cloração. O cultivo iniciador *Staphylococcus xylosus* não demonstrou capacidade em degradar de forma significativa os PCBs 10 e 52 no meio de cultura nutritivo e os PCBs 10 e 28 no meio de cultura salino. Esses resultados divergem dos encontrados por Sierra et al. (2003) que, utilizando uma nova bactéria aeróbica (*Janibacter* sp.) isolada em meio salino contendo uma mistura comercial de PCBs

(Aroclor 1242), demonstraram reduções de 100% e 94% nas concentrações dos PCBs 10 e 28, respectivamente. De acordo com Borja et al. (2005) o comportamento dos microrganismos pode variar dependendo das circunstâncias ambientais e das condições do meio, sendo que fatores como temperatura, pH e conteúdo de carbono podem influenciar na degradação dos PCBs.

No experimento com massa cárnea, observou-se uma relação exponencial significativa ($r = -0,88$; $p < 0,05$) entre o tempo de incubação e o PCB 10, durante o período de incubação, indicando uma diminuição de 85% nos níveis desse congêner. ANOVA não revelou interações ou efeitos significativos e relações exponenciais significativas não foram verificadas para os outros congêneres de PCBs analisados (28, 52, 138, 153 e 180). Porém, observou-se uma tendência à degradação para os congêneres números 28 e 52, e uma leve diminuição nas concentrações dos demais PCBs durante o período de incubação. A pequena degradação da maioria dos congêneres de PCBs testados pode ser explicada pelo fato de que o substrato utilizado (massa cárnea) pode ser uma excelente fonte de energia. Desta forma, o microrganismo pode ter preferência por outras substâncias orgânicas presentes no meio, utilizando-as antes dos PCBs (KATAYAMA & MATSUMURA, 1993). Um período de incubação mais prolongado poderia permitir a utilização do contaminante como fonte de carbono pelo *Staphylococcus xylosus*. É necessário considerar, também, que o microrganismo deve estar em contato com o composto para degradá-lo ou as enzimas exocelulares devem ter a possibilidade de alcançar a molécula para começar o processo catalítico. Assim, existe uma grande diferença entre um meio homogeneizável, como o caldo nutritivo, e outro sólido, como o alimento, e neste caso a massa cárnea, onde as barreiras ao movimento e a difusão do microrganismo e do composto químico são mais fortes (BAYARRI, 1997a).

Além disso, no produto cárneo fermentado o microrganismo se encontra em condições diferentes daquelas conseguidas no meio de cultura nutritivo líquido. Uma delas seria o pH alcançado neste alimento, que é muito menor e poderia inibir os sistemas enzimáticos microbianos, como indicam Mirna e Correti (1979) e Ariño et al. (1993).

Dos congêneres utilizados nos experimentos, os PCBs 10, 52, 138, 153 e 180 possuem átomos de cloro em posição *orto* na molécula e, segundo Bopp (1986), os compostos que apresentam esta característica são altamente resistentes à

degradação. Porém, em desacordo com a afirmação anterior, verificou-se a degradação destes congêneres tanto *in vitro* (PCBs 138, 153 e 180) quanto na massa cárnea (PCB 10). Além disso, dentre os congêneres degradados, os PCBs 138, 153 e 180 apresentam um elevado número de átomos de cloro em suas moléculas (seis, seis e sete átomos de cloro, respectivamente) o que não está de acordo com o que sugerem alguns autores segundo os quais a magnitude da degradação está inversamente relacionada com o número de átomos de cloro no composto, além de ser influenciada pela disposição espacial da substituição por halogênios na molécula (BEDARD et al., 1986; FETZNER & LINGENS, 1994).

Salienta-se que a resistência do PCB 52 à degradação é importante já que, em trabalhos anteriores, membros da nossa equipe verificaram que este PCB foi encontrado em altas concentrações (124,71 ng g⁻¹ de gordura) em produtos cárneos no Estado do Rio Grande do Sul (COSTABEBER et al., 2005). Este mesmo congêneres também está associado a lesões malignas (LUCENA et al., 2001).

Vários estudos verificaram a ação de microrganismos aeróbios e anaeróbios nos níveis de PCBs, especialmente em solo e sedimentos (NAWAB et al., 2003; SIERRA et al. 2003; CHANG et al., 2001; FEDI et al., 2001). Porém, são encontrados poucos experimentos utilizando a carne como matriz orgânica e microrganismos empregados na indústria cárnea como possíveis agentes de degradação (ABOU-ARAB, 2002; BAYARRI et al., 1998; MIRNA & CORETTI, 1979). Além disso, estudos que relatem a degradação de bifenilos policlorados por *Staphylococcus xylosus* não foram encontrados não permitindo uma melhor comparação dos resultados obtidos. Porém, acredita-se que a degradação provocada por esse microrganismo é muito importante na redução do risco toxicológico em produtos cárneos fermentados.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- A presença dos congêneres de PCBs em meios de cultura salino e nutritivo não foi capaz de afetar o crescimento normal do microrganismo *Staphylococcus xylosus*.
- O microrganismo starter *Staphylococcus xylosus* demonstrou capacidade de degradar alguns congêneres de PCBs (52, 138, 152 e 180) testados em meio de cultura salino.
- Em meio de cultura nutritivo (BHI) o microrganismo foi capaz de degradar os congêneres números 28, 138, 153 e 180.
- Na investigação em massa cárnea o microrganismo *Staphylococcus xylosus* degradou significativamente somente o PCB 10 ($r = -0,88$; $p < 0,05$).
- A degradação de PCBs em produtos cárneos fermentados pode trazer benefícios para a saúde do consumidor. No entanto novos estudos são necessários para confirmar a ação do *Staphylococcus xylosus* na degradação destes compostos em produtos cárneos. É necessário, também, identificar o mecanismo de degradação dos PCBs pelo microrganismo e os compostos formados durante o processo de degradação. Além disso, outros microrganismos e outras condições de fermentação podem ser utilizados em experimentos semelhantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, E.; LLERENA, J.J.; SAULÓ, J.; RIVERA, J. Study on PCDDs/PCDFs and co-PCBs contend in food simples from Catalonia (Spain). **Chemosphere**, v. 46, n. 9-10, p. 1435-1441, 2002.

ABOU-ARAB, A. A. K. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. **Food and Chemical Toxicology**, V. 40, p. 33-41, 2002.

ABRAHAM, W. R.; NOGALES, B.; GOLYSHIN, P. N.; PIEPER, D. H.; TIMMIS, K. N. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 246–253, 2002.

ABRAMOWICZ, D. A. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 241-249, 1990.

AHMED, F. E. Analysis of polychlorinated biphenyls in food products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n.3, p. 170-185, 2003.

ALLEN, J. R.; NORBACK, D. H. Pathobiological response of primates to polychlorinated biphenyls exposure. **Proceedings National Conference on Polychlorinated Biphenyls. Office of Toxic substances**, p. 43-49. Chicago, USA, November p.19-21, 1977.

ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M. A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL'AMICO, E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. **Chemosphere**, v. 57, p. 401–412, 2004.

ANGULO,R.; COSTABEBER, I.; GALLEGO, M. C.; SERRANO, S.; JODRAL, M. Clean-up distillation: critical points in the organochlorine residue analysis. In: **1ST European Pesticide Residue Workshop**. Alkamaar, Netherlands, p. 59, 1996.

ANGULO, R.; COSTABEBER, I.; SERRANO, S.; JODRAL, M. Identification and quantitative determination of eleven PCBs congeners on biological samples. **8th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography. 26th Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques of the Spanish Royal Society of Chemistry**, p. 89, Almería, Spain, Octubre 26-29, 1997.

ANGULO, R. **Residuos persistentes organoclorados en leche humana**. 1998. 312 p. Tese (Doutorado em Bromatologia e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade de Córdoba, Espanha.1998.

ANGULO, R.; COSTABEBER, I.; JODRAL, M. Residuos organoclorados en leche adicionada con *L. acidophilus*. **Alimentaria**, V. 300, p. 51-51, 1999.

ARIÑO, A.; HERRERA, A.; CONCHELLO, M. P.; LAZARO, R.; PEREZ, C. Hexachlorocyclohexane residues in meat products after processing. **Journal of Food Composition Analysis**, v. 6, p. 55-61, 1993

ARIÑO, A.; LÁZARO, R.; CONCHELLO, P.; BAYARRI, S.; HERRERA, A. The effect of processing on incurred residues of DDE in meat products. **Journal of Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 4, p. 559-566, 1995.

BALLSCHMITER, K.; BACHER, R.; MENNEL, A.; FISCHER, R.; RIEHLE, U.; SWEREV, M. The determination of chlorinated biphenyls, chlorinated dibenzodioxins and chlorinated dibenzofurans by GC-MS. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 15, p. 260-270, 1992.

BAYARRI, S. **Degradación de residuos de contaminantes clorados en productos cárnicos por el procesado y la acción de microorganismos responsables de maduración**. 1997. 364 p. Tese (Doutorado em Veterinária) – Universidade de Zaragoza, Espanha. 1997a.

BAYARRI, S.; CONCHELLO, M. P.; ARIÑO, A. A.; LÁZARO, R.; HERRERA, A. Evaluation of an analytical method for an in-vitro study of degradation of organochlorine compounds by “meat starter” microorganisms. **Pesticide Science**, v. 50, p. 120-126, 1997b.

BAYARRI, S.; HERRERA, A.; CONCHELLO, M.P.; AGUSTIN, A.; ARIÑO, A.; LÁZARO, R.; YAGÜE, C. Influence of meat processing and meat starter microorganisms on the degradation of organochlorine contaminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3187-3193, 1998.

BEDARD, D.L.; UNTERMAN, R.; BOPP, L.H.; BRENNAN, M.J.; HABERL, M.L.; JOHNSON, C. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade PCBs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 761-768, 1986.

BENNETT, B.G. Exposure of man to environmental PCBs an exposure commitment assessment. **The Science of the Total Environment**, v. 29, p. 101-111, 1983.

BESTER K.; DE VOLS P.; LE GUERN L.; HARBECK S.; HENDRICKX F.; KRAMER G.N.; LISINGER T.; MERTENS I.; SCHIMMEL H.; SEJEROE-OLSEN B.; PAUWELS J.; DE POORTER G.; RIMKUS G.G.; SCHLABACH M. Preparation and certification of a reference material on PCBs in pig fat and its application in quality control in monitoring laboratories during de Belgian "PCB-crisis". **Chemosphere**, v.44, n.4, p. 529-537, 2001.

BOPP, L.H. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 1, p. 13-29, 1986.

BORJA, J.; TALEON, D.M.; AURESENIA, J.; GALLARDO, S. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. **Process Biochemistry**. Artigo aceito, 2005.

BRASIL. Portaria Interministerial 19, de 2 de janeiro de 1981.

BRASIL – ABNT. Líquidos Isolantes Elétricos – Determinação do Teor de Bifenilas Policloradas **NBR 13882/97**, São Paulo, 1997.

BRASIL. Portaria ANVISA 177, de 4 de março de 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Número 42 de 20 de dezembro de 1999.

BROADHURST, M.G. Use and replaceability of polychlorinated biphenyls. **Environmental Health Perspectives**, v. 2, p. 81-102, 1972.

BÜTHE, A.; DENKER, E. Qualitative and Quantitative Determination of PCB Congeners By Using A HT-5 Column and an Efficient Quadrupole MS. **Chemosphere**, v. 30, p. 753-77, 1995.

CARBONE, L. G.; ALO, D, K.; SCARLETT, J. M.; GUTENMANN, W. H.; LISCK, D. J. Tissue deposition of polychlorinated biphenyls in cats fed Atlantic ocean bluefish. **Cornell Veterinarian**, v. 81, p. 259-265, 1991.

CHANG, B.V.; LIU, W.G.; YUAN, S.Y. Microbial dechlorination of three PCB congeners in river sediment. **Chemosphere**, v. 45, p. 849-856, 2001.

COLMAN, A.; DAWSON, J. Un estudio realizado en el Reino Unido revela que las hormonas naturales en los afluentes de aguas residuales afectan a los peces. Boletín **Moduladores Endocrinos. Grupo de dirección de Moduladores Endocrinos (CEFIC)**, 1996.

COSTABEBER, I.; ANGULO, R.; SERRANO, S.; JODRAL, M. Organochlorine residues in chicken and sheep fat. **8th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography. 26th Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques of the Spanish Royal Society of Chemistry**, p. 88. Almería, España, Octubre 26-29, 1997.

COSTABEBER, I. **Resíduos organoclorados persistentes en grasa mamaria y su relación con los hábitos alimentarios: repercusiones sanitarias**. 1999. 315 p. Tese (Doutorado em Ciencia e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade de Córdoba, Espanha, 1999.

COSTABEBER, I.; ANGULO, R.; JODRAL, M. La dieta como factor que influye sobre el contenido de organoclorados en tejido adiposo. XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Livro de resumos-XVII CBCTA**. v.3, p. 1.026, 2000a.

COSTABEBER, I.; JODRAL, M.; ANGULO, R. Detecção de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em amostras biológicas. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 10, p. 1-12, 2000b.

COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. Aspectos toxicológicos de los bifenilos policlorados: una recopilación. **Boletim SBCTA**, v. 37, p. 1-10. 2003.

COSTABEBER, I.; SANTOS, J. S.; XAVIER, A. A. O.; WEBER, J.; LEÃES, F. L.; BOGUSZ JUNIOR, S.; EMANUELLI, T. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in meat and meat products from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food and Chemical Toxicology**. Artigo enviado, 2005.

DE VOS, S., MAERVOET, J., SCHEPENS, P., DE SCHRIJVER, R. Polychlorinated byfenyls in broiler diets: their digestibility and incorporation in body tissues. **Chemosphere**, v. 51, p. 7-11, 2003.

DEKONING, E. P.; KARMAUS, W. PCB exposure in uterus and via breast milk. A review. **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**, v. 10, p. 285-293, 2000.

DOLFING, J.; BEURSKENS, E.M. The microbial logic and environmental significance of reductive dehalogenation. **Advances in Microbial Ecology**, v. 14, p. 143-205, 1995.

DONELLY, J. R.; GRANGE, A. H.; HERRON, N. R.; NICHOL, G. R.; JETER, J. L.; WHITE, R. J.; BRUMLEY, W. C.; VAN EMON, J. Modular methodology for determination of polychlorinated biphenyls in soil as Arochlors and individual congener. **Journal of AOAC International**, v. 79, p. 953-961, 1996.

FAVA, F. The presence of Glass-beads or Triton X-100 in medium enhances the aerobic dechlorination of Aroclor-1221 in pseudomonas SP Cpel culture. **Chemosphere**, v. 32, p.1469-1475, 1996.

FEDI, S.; CARNEVALI, M.; FAVA, F.; ANDRACCHIO, A.; ZAPPOLI, S.; ZANNONI, D. Polychlorinated biphenyl degradation activities and hybridization analyses of fifteen aerobic strains isolated from a PCB-contaminated site. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 283-292, 2001.

FETZNER, S.; LINGENS, F. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics and biotechnological applications. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 641-685, 1994.

FISH, S. Organophosphorus chlorinesterase inhibitors and Fetal development. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.96, p. 1145-1148, 1996.

FOCANT, J.F.; EPPE, G.; PIRARD, C.; MASSART, A. C.; ANDRÉ, J. E.; DE PAUW, E. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs in Belgian foodstuffs – Assessment of dietary intake. **Chemosphere**, v. 48, p. 167-179, 2002.

GOTO, M.; HIGUCHI, K. The symptomatology of Yusho (chlorobiphenyls poisoning) in dermatology. **Fuoka Acta Medica**, v. 128, p. 993-996, 1969.

HAAGGRONLUND, M.; KATO, Y.; FRANSSONTEEN, R.; SCHEU, G.; WARNGARD, L. Promotion of Enzyme-Altered foci in female Rat livers by 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 174, p. 85-90, 1985.

HALUSKA, L.; BARANCIKOVÁ, G.; BALÁZ, S.; DERCOVÁ, K.; VRANA, B.; PAZ-WEISSHAAR, M.; FURCIOVÁ, E.; BIIELEK, P. Degradation of PCB in different soils

by inoculated *Alcaligenes xylosoxidans*. **The Science of the Total Environment**, v. 175, p. 275-285, 1995.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methnotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 60, n.2, p. 439-471, 1996.

HAYES, M. A. Carcinogenic and mutagenic effects of PCBs. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 20, p. 56-60, 1987.

HERNANDEZ, L.M.; FERNANDEZ, M.A.; JIMENEZ, B.; GONZALEZ, M^AJ.; GARCIA, J.F. Organochlorine pollutants in meats and cow's milk from Madrid (Spain). **Bull. Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, p. 246-253, 1994.

HESS, P.; DE BOER, J.; COFINO, W. P.; LEONARDS, P. E. G.; WELLS, D. E. Critical review of the analysis of non-planar and mono-ortho-chlorobiphenyls. Review. **Journal of Chromatography A**, v. 703, p. 417-465, 1995.

KANNAN, N.; SCHULZ-BULL, D.E.; PETRICK, G.; DUINKER, J.C.; MATCHT-HAUSMANN, M.; WASSERMAN, O. Toxic Chorobiphenyls in Adipose Tissue and Whole Blood of and Occupationally/Acidentally Exposed Man and the General Population. **Archives of Environmental Health**, v. 49, n. 5, p. 375-383, 1994.

KATAYAMA, A.; MATSUMURA, F. Degradation of organochlorine pesticides, particulary endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, p. 1059-1065, 1993.

KIM, M.; KIM, S.; YUN, S.; LEE, M.; CHO, B.; PARK, J.; SON, S.; KIM, O. Comparison of seven indicator PCBs and three coplanar PCBs in beef, pork and chicken fat. **Chemosphere**, v. 54, n.10, p. 1533-1538, 2004.

KLASSON, K.T.; BARTON, J.W.; EVANS, B.S.; REEVES, M.E. Reductive microbial dechloration of indigenous polychlorinated biphenyls in soil using a sediment-free inoculum. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 3, p. 310-315, 1996.

KOMANCOVÁ, M.; JURCOVÁ, I.; KOCHÁNKOVÁ, L.; BURKHARD, J. Metabolic pathways of polychlorinated biphenyls degradation by *Pseudomonas* sp. 2. **Chemosphere**, v. 50, p. 537-543, 2003.

KUBATOVA, A.; ERBANOVA, P.; EICHLEROVA, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F.; SASEK, V. PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soils. **Chemosphere**, v. 43, p. 207-215, 2001.

LEVENGGOOD, J.M.; ROSS, S.C.; STAHL, M.L.; BEASLEY, V.R. Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in Canada geese (*Branta canadensis*) from Chicago, Illinois. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 41, n. 2, p. 71-75, 1999.

LONGNECKER, M. P.; RYAN, J. J.; GLADEN, B. C.; SCHECTER, A. J. Correlations among human plasma levels of dioxin-like compounds and polychlorinated biphenyls (PCBs) and implications for epidemiological studies. **Archives of Environmental**, v. 55, p. 195-200, 2000.

LOPEZ-LEITON, T. J. L.; PINEIRO, M. E. A.; YUSTY, M. A. L.; DAVINA, J. L. C. Levels of seven PCBs used as markers of dioxin in commercial pork meat in Spain. **Journal of AOAC International**, v. 84, p. 1799-1801, 2001.

Lucena 2001

MES, J.; NEWSOME, W.H.; CONACHER, H.B.S. Levels of specific polychlorinated biphenyls congeners in fatty foods from five Canadian cities between 1986 and 1988. **Food Additives and Contaminants**, v. 8, p. 351-361, 1991.

MIRNA, A.; CORETTI, K. Influence of processing on the degradation of pesticides in meats products. **Meat Science**, v. 3, p. 97-108, 1979.

NAGASAKI, H.; KAWABATA, H.; MIYATA, Y.; INOUE, K.; AOE, H.; ITO, N. Effects of various factors on induction of liver tumours in animals due the alpha-isomer of benzenehexachloride. **Gann**, v.66, n.2, p.185-191, 1975.

NAWAB, A.; ALEEM, A.; MALIK, A. Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to γ -HCH degradation by *Pseudomonas* strains. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 41-46, 2003.

PATANDIN, S.; DAGNELIE, P. C.; MULDER, P. G. H.; DE COUL, E. O.; VAN DER VEEN, J. E.; WEISGLAS-KUPERUS. Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: A comparison between breast-feeding, toddler, and longterm exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n.10, p. 496-497, 1999.

PAUMGARTTEN, F.J.R.; CRUZ, C.M.; CHAHOUD, I.; PALAVINSKAS, R.; MATHAR, W. PCDDs, PCDFs. PCBs and other organochlorine compounds in human milk from Rio de Janeiro. **Environmental Research**, v.83, n.3, p. 293-297, 2000.

PENTEADO, J. C. P.; MOREIRA VAZ, J. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 390-398, 2001.

PERIC, M.; RASETA, J.; VISACKI, M. S.; SPIRIC, A. Degradation of organochlorine pesticides as influenced by micrococci isolated from fermented sausages. **Technologija Mesa**, v. 2, n. 5, p. 132-133, 1980.

PLATONOW, N.S.; SACHENBRECKER, P.W.; FUNNELL, H.S. Residues of polichlorinated biphenyls in catte. **Canadian Veterinary Journal**, v.12, p. 115-118, 1971.

QUENSEN III, J.F.; BOYD, S.A.; TIEDJE, J.M. Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2360-2369, 1990.

ROBARDS, K. The determination of polychlorinated biphenyl residues: a reviews with special reference to foods. **Food Additives and Contaminants**, v. 7, p. 143-174, 1990.

ROSS, G. The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 59, p. 275-291, 2004.

RUIZ-AGUILAR, G.M.L.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, J.M.; RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ, R.; POGGI-VARALDO, H. Degradation by White-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. **Advances in Environmental Research**, v. 6, p. 559-568, 2002.

SAWHNEY, B.L.; HANKIN, L. Polichlorinated biphenyls in foods: a review. **Journal of Food Protection**, v. 48, p. 442-448, 1985.

SCHLUMMER, M.; MOSER, G.A.; MCLACHLAN, M. Digestive tract absorption of PCDD/Fs, PCBs and HCB in humans: mass balance and mechanistic considerations. **Toxicology Applicant Farmacology**, v. 152, n. 1, p. 128-137, 1998.

SIERRA, I.; VALERA, J. L.; MARINA, M. L.; LABORDA, F. Study of the biodegradation process of polychlorinated biphenyls in liquid medium and soil by a

new isolated aerobic bacterium (Janibacter sp.). **Chemosphere**, v. 53, p. 609-618, 2003.

SPIRIC, A.; VISACKI, V.; RASETA, J.; PERIC, M.; RAJKOVIC, N. Kinetics of decomposition of DDT in meat products under the action of selected micrococci. **Technologija Mesa**, v. 22, n. 12, p. 344-345, 1981.

STAHNKE, L. H. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels - Part I. Chemical and Bacteriological Data. **Meat Science**, v. 41, n. 2, p. 191-1995, 1995.

TRÍSKA, J.; KUNCOVÁ, G.; MACKOVÁ, M.; NOVÁKOVÁ, H.; PAASIVIRTA, J.; MIRJA LAHTIPERÄ, M.; VRCHOTOVÁ, N. Isolation and identification of intermediates from biodegradation of low chlorinated biphenyls (Delor-103). **Chemosphere**, v. 54, p. 725-733, 2004.

VARMAM, A. H.; SUTHERLAND, J. **Carne y productos cárnicos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza : Acríbia. Serie Alimentos, vol. 3. 1998.

WALISZEWSKI, S. M.; PARDIO, V. T.; WALISZEWSKI, K. N.; CHANTIRI, J. N.; AGUIRRE, A. A.; INFANZÓN, R. M.; RIVERA, J. Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico. **The Science of the Total Environment**, v. 208, p. 127-132, 1997.

WEIGLAS-KUPERUS, N.; VREUGDENHIL, H. J. I.; MULDER, P. G. H. Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch school children. **Toxicology Letters**, v. 149, p. 281-285, 2004.

WIEGEL, J.; WU, Q. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. 2000. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, p. 1-15, 2000.

WHO/EURO. **PCBs, PCDDs, and PCDFs: Prevention and control of accidental and environmental exposures. Environmental Health Serie 23**. Copenhagen, World Health Organization, Regional Office for Europe. 1987.

WHO/ICPS (World Health Organization). **Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls**, second ed. WHO, Geneva, 1993.

ZUCCATO, E.; CALVARESE, S.; MARIANI, G.; MANGIAPAN, S.; GRASSO, P.; GUZZI, A.; FANELLI, R. Level, sources and toxicity of polychlorinated biphenyls in the Italian diet. **Chemosphere**, v. 38, n.12, p. 2753-2765, 1999.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO A. The Science of the Total Environment Manuscript Format

Guide for Authors

Scope

The Journal is primarily an international medium for the publication of research into those changes and effects in the environment caused by human activities. Specifically, it is concerned with the changes in the natural level and distribution of chemical elements and compounds which may affect the well-being of the living world, and ultimately threaten the survival of human beings themselves. Emphasis is given to applied environmental chemistry and environmental health, defined very broadly. The subjects covered include but are not limited to: (a) application of techniques and methods of chemistry and biochemistry to environmental problems; (b) all aspects of the contamination or pollution of air, water, soil and the human food chain; (c) human and ecosystem health effects, when abnormalities in the level and distribution of chemical elements and compounds are prominent; (d) interdisciplinary studies of the environment; (e) natural and human-induced environmental changes at the global, regional and local levels; (f) the assessment, management and communication of environmental and health risks.

Special issues are considered which may (a) be devoted to topics that are at the cutting edge of science and its application, (b) be focused on emerging or pressing issues of scientific or public concern with global or regional significance, and (c) consist of a collection of papers on a particular subject which reflect current thinking and awareness. These issues can contain review papers, original research articles or a combination of the two. A special issue should provide a reasonable assessment of what is new, what is current, what needs to be known or what should be done on a particular topic. Detailed guidelines about the preparation of such issues can be obtained from the Publisher or the Editors.

Types of contributions

Full papers reporting original work.

Short Communications. A means for communicating urgent matter or the reporting of preliminary findings with a minimum of publication delay.

Technical Notes. Very brief descriptions of new, or modifications of existing techniques which mark major advances and are of practical value.

Letters to the Editor. A means of allowing written discussion of papers published in the journal. Letters are accepted on the basis of originality and timeliness.

Reviews. Critical evaluation of existing data, defined topics or emerging fields of investigation sometimes with some considerations of historical development of topics. Those wishing to prepare a review should first consult the Editors or Associate Editors concerning acceptability of topic and length.

Scientific Commentary. Opinionated commentary on an important scientific issue or event designed to stimulate further discussion in a broader scientific forum.

Proceedings of symposia and/or conferences will be considered for publication as a special issue. One of the Editors should be contacted early in the conference planning process for guidelines on special issues of the journal.

Book Reviews will be included in the Journal on a range of relevant books which are not more than two years old. Book reviews are handled by the Journal Editors. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to one of the Editors.

Submission of papers

From now on, all manuscripts should be submitted electronically through Elsevier Editorial System (EES) which can be accessed at <http://ees.elsevier.com/stoten>.

If you are not able to submit your paper to STOTEN electronically please contact our Editorial Office at stoten@umich.edu for further instructions.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Upon acceptance of the article by the journal, the

author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Authors are requested to suggest three reviewers upon submission. Please include email addresses.

All questions arising *after acceptance* of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to: Science of the Total Environment, Editorial Department, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland. Tel. +353 61 709158, Fax +353 61 709114.

Manuscripts

Manuscripts should be written in English and it is the responsibility of each author to provide grammatically correct manuscript for review. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. Papers may be rejected if they are poorly written in English.

Authors in Japan kindly note: Upon request Elsevier Japan will provide a list of people who can check and improve the English of an article (before submission). Please contact our Tokyo office: Elsevier Japan K.K., 1-9-15 Higashi Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; tel.: +81-3-5561-5032; fax: +81-3-5561-5045; e-mail: jp.info@elsevier.com.

Manuscripts should be submitted in double spaced form and with wide margins for main text as well as for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Underline words that should be in italics, and do not underline any other words. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Manuscripts in general should be organised in the following order:

- Title (should be clear, descriptive and not too long)
- Name(s) of author(s)
- Complete postal address(es) of affiliations
- Full telephone number, fax number **and e-mail address** of the corresponding author
- Present address(es) of author(s) if applicable
- Complete correspondence address to which the proofs should be sent
- Abstract: The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words
- Key words (indexing terms) normally 3-6 items
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques, quality assurance/quality control program, etc.
- Results
- Discussion
- Conclusion (if different from the abstract)
- Acknowledgements and any additional information, research grants, etc.
- References
- Tables
- Figure captions

SI units should be used.

Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and layout of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a

table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should have a brief and self-explanatory title.
5. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
6. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
7. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should accompany the submitted manuscript but should not be included within the text.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
5. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
6. Explanations should be given in the typewritten legend. Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
7. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity. Sharp and glossy copies are required. Reproductions of photographs already printed cannot be accepted.
8. *Colour:* If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.
Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

For further instructions on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1993) has shown that ... " "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1994, pp. 12-16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al." This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. Reference citations in the text should be arranged chronologically. This list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references (consult a recent issue of the journal if necessary):

a. *For periodicals*

Dufrenne J, Soentoro P, Tatini S, Day T, Notermans S. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food protection. *Int J Food Microbiol* 1994; 23: 99-100.

b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*

Notermans S, Donnelly PK. Microbiological challenge testing for ensuring safety of food products. In: Jakobsen M, editor. IUMS-ICFMH Fifteenth Int. Symp. Novel Approaches towards Food Safety Assurance, 31 August-3 September 1993, Bingen/Rhine, Germany, 1994; 24: 41-52.

c. *For books*

Jesenská Z. Micromycetes in Foodstuffs and Feedstuffs. *Progress in Industrial Microbiology*, 28. Elsevier, Amsterdam, 1993, 256 pp.

d. *For multi-author books*

Caddick MX. Nitrogen metabolite repression. In: Martinelli SD, Kinghorn JP, editors. *Aspergillus: 50 Years on Progress in Industrial Microbiology*, 29. Elsevier, Amsterdam, 1994, pp. 323-353.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the International List of Periodical Title Word Abbreviations.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Reference citation by the number system is not acceptable.

Formulae

1. Leave ample space around the formulae.

2. Subscripts and superscripts should be clear.

3. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

4. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

5. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

6. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

7. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001.

8. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺ and CO₃²⁻, not as Ca⁺⁺ or CO₃⁻⁻.

9. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ¹⁸O.

10. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P₂O₅).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.

2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

2. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

3. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on*

Biochemical Nomenclature should be followed.

4. SI units should be used throughout.

Copyright

An author, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an illustration or table from a book or journal article, should make sure that he is not infringing a copyright.

Although in general an author may quote from other published works, he should obtain permission from the holder of the copyright if he wishes to make substantial extracts or to reproduce tables, plates, or other illustrations. If the copyright-holder is not the author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the author should also be sought.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

A suitable acknowledgment of any borrowed material must always be made.

Proofs

One set of proofs will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

1. Twenty-five offprints will be supplied free of charge.
2. One hundred free offprints will be supplied to the first or corresponding author of a review article.
3. Additional offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.
4. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra offprints.

Science of the Total Environment carries no page charges.