

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Alicyclobacillus acidoterrestris* A  
PARTIR DE SUCOS DE MARACUJÁ E ABACAXI PASTEURIZADOS,  
E DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE SEUS  
ESPOROS.

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Ivana Cristina Spolidório Mc Knight** aprovada pela Comissão Julgadora em 21 de maio de 2003.

Campinas, 21 de maio de 2003.

  
Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer  
Presidente da Banca

**Ivana Cristina Spolidório Mc Knight**  
Engenheira Agrônoma

**Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer**  
Orientadora

Tese apresentada à Comissão de Pós –  
Graduação da Faculdade de Engenharia  
de Alimentos da Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências de Alimentos.

CAMPINAS

2003

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	UNICAMP M218i
V	EX
TOMBO BCI	54993
PROC.	16.124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/08/03
Nº CPD	

CM00187115-1

BIB W 295924

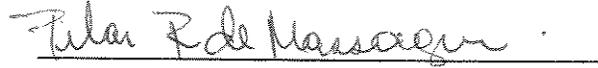
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

M218i Mc Knight, Ivana Cristina Spolidório  
Isolamento e identificação de *Alicyclobacillus acidoterrestris*  
a partir de sucos de maracujá e abacaxi pasteurizados, e  
determinação da resistência térmica de seus esporos / Ivana  
Cristina Spolidório Mc Knight. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Alicyclobacillus acidoterrestris*. 2. Suco de Frutas.  
3. Deterioração. I. Massaguer, Pilar Rodriguez de. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia  
de Alimentos. III. Título.

## BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Pilar Rodríguez de Massaguer  
DCA/FEA-UNICAMP  
Orientadora

---

Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes  
DTA/FEA-UNICAMP



---

Profa. Dra. Gislene Garcia Franco do Nascimento  
FACIS-UNIMEP

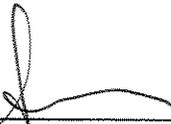
---

Prof. Dr. Gilson Paulo Manfio  
CPQBA-UNICAMP



---

Prof. Dr. José Luiz Pereira  
DCA/FEA-UNICAMP



---

Prof. Dr. Arnaldo Yoshitero Kuaye  
DTA/FEA-UNICAMP



---

Dra. Silvia Yuko Eguchi  
IPEL Biocidas

200326295

**À Dra. MIRTHA NELLY UBOLDI EIROA, pela orientação, dedicação e  
amizade, com saudades,**

**DEDICO**

**Á meu esposo NEWTINHO, e aos meus filhos MARCELO E VITOR, pelo  
incentivo, compreensão e amor,**

**Aos meus pais, IDIVAN e MARILENE, e ao meu irmão IDIVAN LUIS**

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

Á Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer, pela sabedoria na orientação, confiança e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira, por gentilmente ter dado a oportunidade da utilização do Laboratório de Toxinas Microbianas, para a condução da primeira etapa deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Augusto Tulman Neto, pelo exemplo, pelos ensinamentos e palavras de incentivo.

A Profa. Dra. Siu Mui Tsai, por ter possibilitado a realização dos ensaios de RAPD, no Laboratório de Biologia Molecular e Celular, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura- CENA, USP.

Á Universidade Estadual de Campinas, através da Faculdade de Engenharia de Alimentos e do Departamento de Ciências de Alimentos, pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

Á Rosa A. Tosello e Norma T. N. Myia, pelo carinho e apoio em todos os momentos necessários.

Aos membros a banca examinadora, pelas sugestões.

Á todos que confiaram e torceram por mim.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMO .....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3.1. Microbiologia dos sucos de frutas.....	04
3.2. Histórico dos <i>Alicyclobacillus</i> .....	07
3.3. Características dos <i>Alicyclobacillus</i> .....	10
3.3.1. <i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> .....	12
3.3.2. <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> .....	13
3.3.3. <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	14
3.3.3.1 Patogenicidade do <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	15
3.4. Ocorrência dos <i>Alicyclobacillus</i> em produtos ácidos .....	16
3.4.1. Características da deterioração .....	19
3.5. Métodos de detecção, isolamento e identificação de <i>Alicyclobacillus</i> .....	22
3.5.1. Detecção e isolamento .....	22
3.5.2. Identificação de <i>Alicyclobacillus</i> .....	31
3.5.2.1 Identificação bioquímica dos <i>Alicyclobacillus</i> .....	31
3.5.2.2 Identificação genotípica dos <i>Alicyclobacillus</i> .....	33
3.5.2.2.1 Análise genética com marcadores RADP .....	33

3.6.	Resistência térmica dos <i>Alicyclobacillus</i> sp .....	39
3.6.1.	Esporo bacteriano.....	39
3.6.2.	Ensaio de ativação.....	41
3.6.3.	Estudo da resistência térmica dos <i>Alicyclobacillus</i> sp .....	43
3.7.	Medidas de controle dos <i>Alicyclobacillus</i> sp .....	49
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	54
4.1.	MATERIAIS.....	54
4.2.	MÉTODOS.....	57
4.2.2.	Constatação da pureza da cultura padrão <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM 2498. ....	57
4.2.3.	Preparo de sucos de abacaxi ( <i>Ananas comosus</i> (L) Merrill var. havaiano ) e maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> Sims var. amarelo-azedo) em condições estéreis.....	58
4.2.4.	Preparo da suspensão de esporos.....	58
4.2.5.	Quantificação dos esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM 2498 presentes na suspensão. ....	60
4.2.6.	Determinação das condições ótimas tempo e temperatura para ativação dos esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM 2498.....	60
4.2.7.	Determinação do tempo de incubação ótimo para isolamento de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM 2498 a partir de amostras de suco de maracujá e abacaxi experimentalmente contaminadas. ....	61
4.2.8.	Isolamento de <i>Alicyclobacillus</i> sp a partir de sucos comerciais pasteurizados de abacaxi e maracujá. ....	62
4.2.9.	Preservação das cepas isoladas .....	64
4.2.10.	Caracterização das cepas isoladas. ....	65
4.2.10.1.	Identificação bioquímica das cepas isoladas.....	65
4.2.10.1.1.	Identificação bioquímica das cepas isoladas pela utilização	

do sistema API CH 50. ....	66
4.2.10.2. Identificação genotípica das cepas isoladas utilizando a Técnica do RAPD. ....	67
4.2.10.2.1. Extração do DNA genômico total das cepas isoladas dos sucos. ....	67
4.2.10.2.2. Quantificação do DNA cromossômico. ....	69
4.2.10.2.3. Reação de RAPD. ....	70
4.2.10.2.4. Análise dos perfis dos produtos de RAPD. ....	72
4.2.11. Determinação da Resistência Térmica dos esporos das cepas isoladas do suco de maracujá e identificadas como <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> . ....	72
4.2.11.1. Determinação do Atraso Térmico para Cálculo dos Parâmetros de Resistência Térmica pelo Método do Tubo TDT. ....	72
4.2.11.2. Determinação da Resistência Térmica dos Esporos em Suco de Maracujá. ....	73
5. RESULTADOS. ....	75
5.1. Quantificação dos esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM 2498 viáveis presentes na suspensão : ....	75
5.2. Determinação das condições ótimas de tempo e temperatura para ativação dos esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM 2498. ....	75
5.3. Determinação do tempo de enriquecimento ótimo para amostras de suco de maracujá e de abacaxi contaminados experimentalmente com esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM 2498. ....	78
5.4. Isolamento de <i>Alicyclobacillus</i> a partir de amostras de sucos comerciais pasteurizados de abacaxi e maracujá. ....	81
5.5. Identificação bioquímica das cepas isoladas do suco de maracujá pelo sistema API CH 50. ....	86

5.6.	Determinação da Similaridade Genética pela Reação de RAPD.....	87
5.7.	Determinação do Atraso Térmico em Suco de Maracujá pH 3,5 para Cálculo dos Parâmetros de Resistência Térmica dos esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> , pelo Método do Tubo TDT.....	93
5.8.	Resistência térmica de esporos identificados como <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> e da cepa padrão DSM 2498 em suco de maracujá pH 3,5. ....	93
6.	CONCLUSÕES.....	109
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
8.	ANEXO 1 .....	123
9.	ANEXO 2 .....	126

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Características dos <i>Alicyclobacillus</i> sp. ....	11
Tabela 2: Características químiotaxonômica dos <i>Alicyclobacillus</i> .....	12
Tabela 3: Caracterização bioquímica de linhagens tipo de <i>A. acidocaldarius</i> (ATCC 27009), <i>A. cycloheptanicus</i> ATCC 49028) e <i>A. acidoterrestris</i> (ATCC 49025), segundo o esquema de Gordon et al. (1973).*	32
Tabela 4: Cepas isoladas do suco de maracujá e cepas padrão utilizadas na Técnica do RAPD. ....	68
Tabela 5: “Primers” utilizados nas reações de RAPD, segundo Yamazaki et al. (1997b).....	71
Tabela 6: Ocorrência de esporos de bactérias esporogênicas termoacidófilas em amostras de suco de maracujá comercial pasteurizado, extraído em diferentes épocas do ano. ....	82
Tabela 7: Grupos e subgrupos de cepas isoladas de suco de maracujá e cepas padrão com base no dendograma da Figura 8... ..	91
Tabela 8: Determinação do atraso térmico para diferentes temperaturas, utilizando suco de maracujá pH 3,5 pelo método do tubo TDT, com auxílio de termopar flexível tipo T cobre-constantan.....	93
Tabela 9: Resistência Térmica dos esporos de <i>A. acidoterrestris</i> DSM 2498 em suco de maracujá p H 3,5. ....	94
Tabela 10: Resistência térmica da Cepa 4 em suco de maracujá pH 3,5 .....	96
Tabela 11: Resistência térmica da Cepa 6 em suco de maracujá pH 3,5 .....	97
Tabela 12: Resistência térmica da Cepa 7 em suco de maracujá pH 3,5 .....	98
Tabela 13: Coeficiente Z (°C) da cepa padrão DSM 2498 das 3 cepas isoladas do suco de maracujá pH 3,5 .....	103

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Fluxograma do processamento de suco de abacaxi e maracujá. ....	63
Figura 2: Contagem de esporos de <i>A. acidoterrestris</i> DSM 2498 em suco de abacaxi pH 3,9 após choque térmico, em ágar BAM com incubação a 50°C por 7 dias. ....	76
Figura 3: Contagem de esporos de <i>A. acidoterrestris</i> DSM 2498 em suco de maracujá pH 3,7 após choque térmico, em ágar BAM com incubação a 50°C por 7 dias. ....	77
Figura 4: Contagem de esporos de <i>A. acidoterrestris</i> DSM 2498 após ativação a 70°C/20 min em suco de maracujá pasteurizado durante a incubação a 50°C por 120 h, em ágar BAM ( pH 4,5).....	79
Figura 5: Contagem de esporos de <i>A. acidoterrestris</i> após ativação a 70° C / 20 min em suco de abacaxi pasteurizado e incubado a 50°C por 120h, em ágar BAM (pH 4,5). ....	81
Figura 6: Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA genômico de 21 cepas com o “Primer 1”. As amostras estão ordenadas da esquerda para a direita conforme estabelecidos na Tabela 4. B. corresponde ao branco da reação e M ao marcados de 500 pares de bases (DNA.Ladder GIBCO – BRL). ....	89
Figura 7: Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA genômico de 21 cepas com o “Primer 1”. As amostras estão ordenadas da esquerda para a direita conforme estabelecidos na Tabela 4. B. corresponde ao branco da reação e M ao marcados de 500 pares de bases (DNA.Ladder GIBCO – BRL). ....	90
Figura 8: Dendrograma obtido pelo agrupamento dos dados de amplificação do DNA de 21 cepas, pelos “Primers” 1 e 2. A identificação completa das cepas encontra-se na Tabela 4. ....	92

Figura 9: Curva de sobrevivência das cepas identificadas como <i>A. acidoterrestris</i> e da cepa padrão DSM 2498 em suco de maracujá pH 3,5 e temperatura 87°C.....	98
Figura 10: Curva de sobrevivência das cepas identificadas como <i>A. acidoterrestris</i> e da cepa padrão DSM 2498 em suco de maracujá pH 3,5 e temperatura 90°C.....	99
Figura 11: Curva de sobrevivência das cepas identificadas como <i>A. acidoterrestris</i> e da cepa padrão DSM 2498 em suco de maracujá pH 3,5 e temperatura 95°C.....	100
Figura 12: Curva de Morte térmica , média de valor D médio das cepas identificadas como <i>A. acidoterrestris</i> e da cepa padrão DSM 2498 em suco de maracujá pH 3,5.....	102

## RESUMO

*Alicyclobacillus acidoterrestris*, uma bactéria termoacidófila esporogênica, recentemente tem sido relacionada com problemas de deterioração em sucos de frutas pasteurizados. Devido a alta resistência térmica de seus esporos, sobrevivem aos tratamentos de pasteurização. A deterioração é descrita pela produção de odor desagradável, semelhante a desinfetante, não ocorre produção de gás e raramente há formação de sedimentos no suco. O objetivo deste trabalho foi o de estabelecer uma metodologia de isolamento para *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de maracujá e suco de abacaxi, identificar as cepas isoladas e determinar a resistência térmica destes isolados nos sucos. Suspensões de esporos da cultura padrão *A. acidoterrestris* DSM 2498 foram submetidas a tratamentos térmicos 60°C/60min, 60°C/30min, 70°C/20min, 80°C/5, 10 e 30 min e ebulição por 5 min, para determinar a melhor condição de ativação dos esporos em suco de maracujá e abacaxi, separadamente. O melhor tratamento para a ativação nos dois sucos estudados foi o de 70°C/20 min. Foi determinado o tempo de enriquecimento para o isolamento de esporos de *A. acidoterrestris* a partir de amostras de suco de maracujá e abacaxi experimentalmente contaminadas com a cepa padrão DSM 2498. O melhor tempo de enriquecimento varia com o suco, para o de maracujá foi de 48 hs e para o de abacaxi, 24hs. Um total de 57 amostras de suco de maracujá e 50 amostras de suco de abacaxi integrais e pasteurizados foram examinados para detectar a presença desta bactéria. Para a detecção as amostras inicialmente foram inoculadas em tubos com caldo BAM (*Bacillus acidocaldarius* medium) e foram ativadas conforme indicado acima. A quantificação dos esporos foi feita pela técnica do Número Mais Provável (NMP), em caldo BAM (pH 4,5). Do conteúdo de cada tubo foi retirada uma alçada e inoculada em ágar BAM, com incubação a 50°C/7dias. Não foram obtidos isolamentos a partir do suco de abacaxi. No suco de maracujá foram constatadas 16 (28%) de amostras positivas para a presença de *A. acidoterrestris*. A contaminação variou entre 1,1 e > 2,3

NMP/100ml de suco, ocorrendo a maior incidência nos meses de junho e julho, época seca do ano, indicando que o grau de contaminação está relacionado com a sazonalidade. Dezesesseis colônias típicas foram submetidas à caracterização bioquímica pelo sistema API CH 50, que não foi satisfatório para a identificação desta bactéria em suco de maracujá, e a caracterização genotípica pelo método do RAPD, que sugeriu uma elevada similaridade genética (maior que 95%) entre a maioria dos isolados do suco de maracujá e a cepa padrão *A. acidoterrestris* DSM 2498. Foi determinada a resistência térmica de 3 isolados e também da cepa padrão em suco de maracujá, pelo método TDT (Tempo de Destruição Térmica), em tubos selados. Os valores D para a cepa padrão e para a cepa 4 que demonstrou maior resistência térmica foram de 19,9 e 28,9 min para 87°C; 4,8 e 8,0 min para 90°C e 1,4 e 2,0 min para 95°C, e os valores z obtidos foram 7,3 e 7,1°C, respectivamente. Foi demonstrado que a pasteurização comercial aplicada ao suco de maracujá não foi suficiente para destruir os esporos de *A. acidoterrestris*. Um processo de 102,1°C/ 36 s seria adequado para reduzir 3 ciclos logarítmicos da cepa mais termoresistente isolada neste estudo, sem afetar os atributos sensoriais do suco.

## SUMMARY

*Alicyclobacillus acidoterrestris*, a thermoacidophilic sporogenic bacteria, has recently presented deterioration problems in pasteurized juices. Due to the elevated thermal resistance of its spores, they survive the pasteurization process. The deterioration is described as an unpleasant odor production, similar to that of a disinfectant. There is no gas production, but occasionally sediments form within the juice. The aim of this research was to establish an isolation method for *Alicyclobacillus acidoterrestris* in passion fruit and pineapple juices, to identify the strains isolated and evaluate their heat resistance in the juices. Spore suspensions of the typical strain *A. acidoterrestris* DSM 2498 were submitted to heat treatments of, 60°C/60min, 60°C/30min, 70°C/20min, 80°C/5, 10 and 30 min, and boiled 5 min, to determine the best activation conditions for the spores within the passion fruit juice and pineapple juice separately. The best activation treatment found for both juices was 70°C/20min. The enrichment time to isolate the spores of *A. acidoterrestris*, was determined from passion fruit juice and pineapple juice samples experimentally contaminated with typical strain DSM 2498. The best enrichment time for passion fruit juice was 48hs, and for pineapple juice 24hs. A total of 57 samples of passion fruit juice, and 50 samples of pineapple juice, integral and pasteurized were examined in order to detect the presence of the quoted bacteria. For detection, the samples were initially inoculated in tubes with BAM (*Bacillus acidocaldarius* medium) broth, and were activated at 70°C/20min followed by enrichment at 50°C/48hs for the passion fruit juice, and 50°C/24hs for the pineapple juice. Spore quantification was done by the Most Probable Number (NMP) Technique. From each tube, a loopful was removed and inoculated into BAM agar, followed by incubation for 7 days/50°C. No isolation from pineapple was observed. From the passion fruit juice 16(28%) positive samples for the presence of *A. acidoterrestris* were obtained. The contamination varied between 1.1 and > 2.3 NMP/100ml of juice, the major incidence occurring in June/July, the dry season of the year, indicating that the level of contamination is related to season. Sixteen

typical colonies were submitted to biochemical characterization by the API CH 50 system. This method was not satisfactory for identification and genotypical characterization by RAPD was applied. The results suggested an elevated genetic similarity (over 95%) between most of the isolates from passion fruit juice and typical strain *A. acidoterrestris* DSM 2498. The heat resistance of 3 isolates and the typical strain in passion fruit juice, was determined by the TDT sealed tube method. The D values for the typical strain and for the most heat resistant isolated strain were 19.9 and 28.9 min at 87°C, 4.8 and 8.0 min at 90°C and 1.4 and 2.0 min at 95°C ones, and the z values obtained were 7.3 and 7.1°C, respectively. It was demonstrated that the commercially applied pasteurization of passion fruit juices was not sufficient to destroy the *A. acidoterrestris* spores. A 102,1°C/36sec process would be adequate to reduce 3 logarithmic cycles of the most thermally resistant strain isolated in this study, without affecting the sensory attributes of the juice.

## 1. INTRODUÇÃO

O conceito tradicional de deterioração de produtos ácidos que possuem um valor de pH inferior a 4,0 é que a acidez inibe o desenvolvimento da maioria das bactérias (Herson & Hulland, 1980). Em geral, considera-se que a maior parte dos esporos bacterianos não germinam nem se desenvolvem em alimentos com pH inferior a 4,0. Apenas algumas bactérias produtoras de esporos são capazes de deteriorarem alimentos ácidos, como *Bacillus coagulans* e *Clostridium butyricum*, capazes de se desenvolverem até pH 3,5, *Bacillus macerans* e *Bacillus polymyxa*, que se desenvolvem em pH 4,0-4,5. Em pH inferior a 4,0, a deterioração é restrita em geral a organismos não esporogênicos, como bactérias lácticas, bolores e leveduras (Brown, 1996). Assim, durante longo tempo, os sucos de frutas devido ao seu pH em geral muito ácido (<4,0), tem sido considerados apenas passíveis de deterioração por bolores, leveduras, bactérias lácticas e ocasionalmente por bactérias acéticas e *Zymomonas*. Todos estes microrganismos, exceto algumas espécies de bolores, apresentam baixa resistência térmica, sendo portanto facilmente inativados pelos tratamentos térmicos comumente aplicados a este tipo de produto.

Porém, este conceito de deterioração de produtos ácidos, sofreu modificações, quando Cerny *et al.*, (1984) relataram a ocorrência de um surto de deterioração de suco de maçã, pasteurizado e embalado assepticamente, onde o organismo responsável era uma bactéria produtora de esporos, acidófila, capaz de sobreviver ao tratamento usual de pasteurização (temperatura de 85-95°C). As amostras deterioradas apresentavam odor desagradável, descrito como de desinfetante, podendo ou não apresentar sedimentação ou turvação no produto.

Em 1992 um novo gênero, *Alicyclobacillus*, englobando as espécies *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alycyclobacillus acidocaldarius* e *Alycyclobacillus cycloheptanicus* foi proposto para abrigar estes organismos que estão sendo

incriminados em processos de deterioração de produtos ácidos (Wisotzkey *et al.*,1992).

Sucos como os de abacaxi e de maracujá podem ser teoricamente passíveis de deterioração por bactérias do gênero *Alicyclobacillus*, visto que esta bactéria por ter sido isolada do solo é provavelmente um contaminante freqüente dos vegetais e frutas. Estas frutas devido a apresentarem cascas rugosas dificultam a lavagem e limpeza, podendo assim veicular mais facilmente uma contaminação por esporos. Estes sucos possuem pH ao redor de 4,0, ótimo para o desenvolvimento da bactéria, e as condições de processamento não inativam os esporos termorresistentes, eventualmente presentes, de acordo com o conhecimento que se tem até o momento.

Devido ao fato de deterioração de sucos de frutas por esporos de bactérias acidófilas, ser um problema recente, e considerando a falta quase total de pesquisas na área e a importância econômica que reveste o assunto, sendo o Brasil um grande produtor e processador de sucos de frutas, este estudo foi conduzido com a finalidade de estabelecer uma metodologia para o isolamento e identificação de *Alicyclobacillus* a partir de sucos pasteurizados de abacaxi e maracujá.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho foi conduzido com os seguintes objetivos:

- 1 - Estabelecer uma metodologia para o isolamento e identificação de *Alicyclobacillus* a partir de sucos pasteurizados de abacaxi e maracujá.
- 2 - Identificar as cepas isoladas dos sucos, segundo padrão molecular através da técnica do RAPD (Amplificação Randômica de DNA Polimórfico).
- 3 - Determinar a Resistência Térmica dos esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* isolados do suco de maracujá.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Microbiologia dos sucos de frutas

O desenvolvimento de microrganismos em alimentos é governado por uma série de fatores, tais como atividade de água, temperatura, potencial de óxido-redução, nutrientes disponíveis e pH. Destes, o pH é o que exerce maior efeito seletivo sobre a microflora apta a se desenvolver.

Quanto ao aspecto prático, a principal linha de demarcação em relação ao pH dos alimentos situa-se no valor de 4,5. Sabe-se que abaixo desse pH, dificilmente ocorre o desenvolvimento do *Clostridium botulinum*, uma das mais resistentes bactérias patogênicas encontrada em alimentos. Nessas condições, produtos com pH acima de 4,5 são sempre conservados por tratamentos térmicos rigorosos, o que não ocorre naqueles com pH inferior a 4,5, como os sucos de frutas, que são submetidos a processos térmicos mais brandos, como a pasteurização (Leitão, 1986).

Historicamente, a grande maioria dos sucos de frutas processados, eram concentrados a 65° Brix aproximadamente e estocados a temperaturas abaixo de 0 °C (Eiroa, 1984). O baixo pH, a baixa temperatura, a tensão reduzida de oxigênio e a atividade de água bastante reduzida devido ao processo de concentração do suco, dava a este produto um alto grau de estabilidade microbiológica.

Segundo Parish (1991) a comercialização de sucos concentrados tem sofrido um declínio frente aos sucos integrais refrigerados, “pronto para beber” (do inglês *ready-to-serve*), pois se tornou mais prático para o consumidor, isto porque as características de sabor destes sucos integrais são mais atrativas por não terem sofrido o processo de concentração, apresentando o sabor mais próximo ao da fruta natural, além dos consumidores associarem com produto mais saudável que os dos sucos reconstituídos. No entanto, estes sucos podem ser mais sensíveis a deteriorações microbianas durante o armazenamento.

A estabilidade microbiológica de 100% dos sucos de frutas armazenados a temperatura ambiente é mantida pela combinação do processo térmico ao qual é submetido e pelo seu baixo pH. A natureza ácida dos sucos de frutas previnem o crescimento de muitas espécies de bactérias e seleciona a ocorrência de leveduras, bolores e alguns grupos de bactérias acidúricas.

A pasteurização aplicada aos sucos de frutas, geralmente na faixa de 85-95°C, é um dos fatores que previnem o crescimento de microrganismos deteriorogênicos e elimina grande maioria dos patogênicos. Contudo, os sucos de frutas são substratos adequados para o desenvolvimento de microrganismos capazes de sobreviver a tratamentos térmicos e de crescer em pH baixo, especialmente as bactérias (Eiroa, 1984).

Tratamentos térmicos tem sido reduzidos ou até eliminados na produção de alguns sucos de frutas para oferecer ao consumidor produtos com sabor mais agradável (Parish, 1991). Estes sucos são muito mais susceptíveis a deterioração microbiana do que os sucos pasteurizados sob condições normais de tempo e temperatura, onde o binômio empregado está na faixa de 85-95°C por alguns segundos, o que acredita-se ser o suficiente para manter o produto

microbiologicamente estável (Leitão, 1986). Os sucos que não sofrem a pasteurização, têm como fatores de segurança microbiológica o pH baixo, a baixa temperatura de estocagem, ao redor de 0°C e uma sanificação eficiente durante as etapas de processamento dos sucos (Eiroa, 1984).

Estudando o comportamento térmico de microrganismos que se desenvolvem em sucos de frutas Parish (1991), concluiu que os processos térmicos a serem aplicados em sucos devem ser bem definidos para provocar a inativação dos seus deteriorantes.

O crescimento de microrganismos em sucos ácidos geralmente é caracterizado pela produção de odores e sabores indesejáveis. Estes microrganismos promovem a deterioração do produto através da degradação de seus componentes provocando a alteração de textura, coloração e pH do suco.

Atualmente, um novo gênero, *Alicyclobacillus*, englobando as espécies *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* e *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, está sendo considerado um importante indicador microbiológico da qualidade de sucos, principalmente a espécie *A. acidoterrestris*, que tem sido frequentemente isolada de sucos de frutas com pH inferior a 4,5 (Cerny *et al.* 1984; Splittstoesser *et al.*, 1994; McIntyre *et al.*, 1995; Prevedi *et al.*, 1995; Yamazaki *et al.*, 1996). Seus esporos são termoacidófilos, capazes de sobreviverem ao tratamento usual de pasteurização (temperatura de 85 a 95°C). Os sucos deteriorados pelo *A. acidoterrestris*, apresentam odor desagradável, descrito como desinfetante, podendo ou não apresentar sedimentação ou turvação do produto. A contaminação dos sucos por este organismo ocorre entre outros fatores, devido a não aplicação das Boas Práticas de Fabricação, onde as frutas podem ser inadequadamente lavadas e as condições de higiene na planta processadora

permitir que os esporos do *Alicyclobacillus* continue presente e multiplicando-se em todo o processo (Borlinghaus & Engel, 1997a).

### 3.2. Histórico do gênero *Alicyclobacillus*

Dados sobre bactérias acidófilas e formadoras de esporos existem desde 1967, quando foram primeiramente estudadas por Uchino & Doi (1967), que obtiveram diferentes isolados a partir de fontes termais, no Japão. Estes isolados cresciam a temperaturas ao redor de 45-71°C e numa faixa de pH de 2,3 a 5,0. Baseado em características morfológicas e culturais, estes organismos foram originalmente classificados como *Bacillus coagulans*.

Darland & Brock (1971), isolaram um organismo similar, de fontes termais dos Estados Unidos, cujo crescimento ocorria em pH 2,0 a 6,0 e temperatura variando entre 45 a 70°C. Baseado na composição de pares de bases do seu DNA, este organismo não foi classificado como *Bacillus coagulans*, mas sim considerados como uma nova espécie dentro do gênero *Bacillus*. Os autores foram os primeiros a considerarem o organismo como pertencente a uma nova espécie, denominada *Bacillus acidocaldarius*. Este organismo apresentava peculiaridades, como a presença de lipídeos característicos (ácidos graxos  $\omega$ -alicíclicos) como principal componente da parede celular (De Rosa *et al.*, 1974). Handley (1977) demonstrou que esporos de *B. acidocaldarius*, isolados de fontes termais, em Napoli, Itália, desenvolviam-se satisfatoriamente numa faixa de pH de 3,0 a 5,0 mas nunca a pH 7,0.

Hippechen *et al.* (1981), fizeram importantes descobertas, quando observaram a ocorrência de um organismo acidófilo produtor de esporos, semelhante ao *B. acidocaldarius*, porém em um habitat diferente ao qual este

estava relacionado. Esta nova bactéria foi isolada de solo que não era um ambiente nem ácido e nem quente. Estes isolados assemelhavam-se ao *B. acidocaldarius*, porque possuíam os mesmos componentes da parede celular (ácidos graxos  $\omega$ -alicíclicos). A partir destas informações, foi evidenciado que a ocorrência deste tipo de microrganismo poderia ser muito mais ampla do que até então acreditava-se.

Deinhard *et al.*, (1987a), demonstraram que os isolados de Hlppchen *et al.*, (1981), diferiam do *B. acidocaldarius* descrito por Darland & Brock (1971) e propuseram o nome de *Bacillus acidoterrestris* para descrever esta nova espécie. A existência desta espécie justifica-se devido a algumas características diferentes entre o *B. acidocaldarius* e o *B. acidoterrestris*, como a baixa homologia de hibridização DNA-DNA, entre as 2 espécies, e também que o conteúdo de C+G do DNA do *B. acidoterrestris* é aproximadamente 7% menor que do *B. acidocaldarius* (Deinhard *et al.*, 1987a). Os habitats originais destas espécies também são diferentes: o *B. acidocaldarius* foi isolado de diversas fontes termais, e o habitat é sem exceção, quente e bastante ácido, como por exemplo, os "gêiseres" do Parque Nacional de Yellowstone-USA, com temperatura variando entre 44 a 72°C e pH numa faixa de 2,5 a 3,3 (Darland & Brock, 1971). As cepas de *B. acidoterrestris* tem sido isoladas geralmente de solos de fazendas, florestas e jardins (Deinhard *et al.*, 1987a). Estes habitats não são considerados quentes, podendo ocasionalmente alcançar temperaturas apropriadas para o crescimento da bactéria.

Análises fenotípicas e moleculares revelavam a heterogeneidade de diversos grupos da classificação do gênero *Bacillus*, sugerindo que este poderia ser dividido em três ou mais gêneros diferentes (Wisotzkey *et al.*, 1990). Além disso, a diversidade do gênero *Bacillus* é também salientada pela grande diferença na % de G + C, do DNA, das linhagens pertencentes às diferentes

espécies, as quais variavam de 32 a 64% (Wisotzkey *et al.*, 1992). Na prática, espécies pertencentes a um mesmo gênero não devem diferir em mais do que 10 a 15% em sua composição de bases de DNA (Pinhatti, 1999).

Baseado em resultados de análise comparativa de seqüências do RNA ribossomal 16S e perfis da composição de ácido graxo, Wisotzkey *et al.* (1992) demonstraram que *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* e *B. cycloheptanicus* são suficientemente diferentes de outras espécies de *Bacillus*, justificando a reclassificação em um novo gênero, denominado *Alicyclobacillus*.

Rainey *et al.* (1994) estudaram 16 espécies de bacilos termofílicos com base na análise das seqüências de rDNA, sugerem que as espécies *B. tusciae* e *B. schlegelli* podem pertencer ao gênero *Alicyclobacillus*, pois possuem alto conteúdo de G+C em seu DNA ( 57 e 68%, respectivamente), contudo sugerem estudos taxonômicos mais abrangentes para que estas espécies possam ser reclassificadas.

Brown (1996), fazendo um estudo comparativo entre duas espécies de *Alicyclobacillus*, o *A. acidocaldarius* e o *A. acidoterrestris*, relatou que a temperatura de crescimento do *A. acidocaldarius* é mais alta que a requerida pelo *A. acidoterrestris*.

Estudos realizados por Hiraishi *et al.* (1997), onde três organismos termoacidófilos isolados de diferentes fontes termais do Japão, foram caracterizadas por métodos moleculares. Alguns dos métodos utilizados foram, amplificação do PCR, análise das seqüência de rDNA 16S e hibridização DNA-DNA. Os resultados obtidos na análise filogenética baseada na seqüência do rDNA 16S mostram que os isolados formam um grupo geneticamente coerente a nível de espécie, e formam um cluster maior com outros membros do gênero

*Alicyclobacillus* (*A. acidoterrestris* e *A. acidocaldarius*). Com base nestes resultados, os autores sugerem que estes isolados termoacidófilos podem ser classificados como uma nova espécie de *Alicyclobacillus*. Estes resultados sugerem também que esta nova genoespécie de *Alicyclobacillus* é amplamente distribuída em ambientes termais no Japão.

### 3.3. Características do gênero *Alicyclobacillus*

As características do gênero *Alicyclobacillus* são baseadas nas observações de Wisotzkey *et al.*(1992). O termo *alíciclo* refere-se ao ácido graxo circular ( $\omega$ -alícíclico) presente como principal lipídeo da sua membrana celular. São organismos acidofílicos obrigatórios, apresentam-se em forma de bastonetes de 0,3 a 0,8 $\mu$ m de largura por 2,0 a 4,5 $\mu$ m de comprimento. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, Gram positivos ou Gram variáveis. Seus endosporos são formados em condições ambientais e nutricionais adversas, ocorrendo um por célula. A esporulação é tolerante a presença de oxigênio. O seu crescimento ocorre obrigatoriamente em condições acidofílicas, sempre na faixa de pH de 2,0 a 6,0. A temperatura de crescimento varia de 40 a 70°C (Tabela 1).

Os ácidos graxos presentes na matriz lipídica da célula contém predominantemente cadeias  $\omega$ -alícíclicas com 6 a 7 carbonos. A principal quinona isoprenóide é uma menaquinona com 7 unidades isoprênicas (MK-7). Hopanóides podem estar presentes, assim como sulfanolipídios (Tabela 2).

O conteúdo de G+C do DNA varia de 51,6 a 60,3 mol% (Tabela 2) determinado pelo método de denaturação térmica. A linhagem de referência é *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009<sup>T</sup> (= DSM 446<sup>T</sup> = CCT 2490<sup>T</sup>).

**Tabela 1:** Características dos *Alicyclobacillus* sp.

	<i>A. acidocalcarius</i>	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. cycloheptanicus</i>
Fonte	Darland & Brock, 1971	Deinhard <i>et al.</i> , 1987a	Deinhard <i>et al.</i> , 1987b
Habitat	Solos de ambientes ácidos e quentes	Solos	Solo
Faixa de temp.	45-70° C	<35-55°C	40-53°C
Temperatura ótima	60-65° C	42-53°C	48°C
Faixa de pH	2,0 – 2,6	2,2 – 5,8	3,0 – 5,5
pH ótimo	3,0 – 4,0	3,5 – 4,0	3,5 – 4,5
Radicais dos Ácidos graxos	$\omega$ -Cyclohexil	$\omega$ -Cyclohexil	$\omega$ -Cycloheptil
Crescimento aeróbio	+	+	+
Fatores de crescimento	-	-	+ *met., isoleu., pantot., e vit. B <sub>12</sub>
Gram	Variável	+	+
Morfologia da célula	Bastonetes, esporos ovais, terminais. O esporângio não é entumescido	Bastonetes, esporos ovais, terminais e subterminais. O esporângio não é entumescido	Bastonetes, esporos, ovais, subterminais. O esporângio é levemente entumescido
Morfologia de colônia	Circular, irregular, não pigmentada	Circular, regular, branca-vermelhada	Circular, regular, branca-opaca

\*met= metionina; \*isoleu= isoleucina; \*pent= ácido pantetonóico

**Tabela 2:** Características quimiotaxonômica do gênero *Alicyclobacillus*

Análise quimiotaxonômica	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. cycloheptanicus</i>	<i>A. acidocalcarius</i>
Ácidos graxos	$\omega$ -C-17 e $\omega$ -C-19	$\omega$ -C-17 e $\omega$ -C-19	$\omega$ -C-17 e $\omega$ -C-19
Lipídios polares	presentes	ausentes	presentes
Quinonas isoprenóides	MK7, MK6	MK7, MK6, MK9	MK7
Conteúdo de G+C	51,6 – 53,3	54,0 – 56,9	61,2 – 62,2

Fonte: Deinhard *et al.*(1987a)

### **3.3.1. *Alicyclobacillus cycloheptanicus***

Descrição baseada nas observações de Deinhard *et al.*(1987b)

São organismos aeróbios, Gram positivos, formadores de endosporos. O esporângio é ligeiramente entumescido e os esporos são ovais e geralmente subterminais, com aproximadamente 1 $\mu$ m de largura e 0,75 $\mu$ m de comprimento. Suas células, em forma de bastonetes tem aproximadamente 2,5 $\mu$ m a 4,5 $\mu$ m de comprimento e 0,35 $\mu$ m a 0,55 $\mu$ m de largura. Suas colônias são pequenas, circulares com a coloração tendendo ao branco amarelado , sem brilho.

A faixa de temperatura de crescimento varia de 40 a 53°C e a temperatura ótima é em torno de 48°C. A faixa ótima de pH varia de 3,5 a 4,5, porém o crescimento pode ocorrer em pH com valores entre 3,0 a 4,5.

Metionina, pantotenato, isoleucina e vitamina B12 são fatores de crescimento necessários. A presença de aminoácidos também favorece o crescimento. A formação de ácidos ocorre a partir de diferentes fontes de carbono, como: D-arabinose, ribose, D-xylose, galactose, glucose, frutose, manose, ramnose, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, D-lixose e 5 ceto-gluconato.

Cerca de 90% dos ácidos graxos presentes na membrana celular são: ácido  $\omega$ -cicloheptil undecanóico,  $\omega$ -cicloheptil tridecanóico e  $\omega$ -cicloheptil- $\alpha$ -hidroxi undecanóico. Sulfanolipídeos também estão presentes e a metaquinona MK-7 é predominante.

### **3.3.2. *Alicyclobacillus acidocaldarius***

Descrição baseada nas observações de Darland & Brock, 1971. O termo *acidocaldarius*, do latim, refere-se a habitat ácidos e quentes.

São aeróbios, Gram positivos, formadores de esporos, podendo formar cadeias pequenas contendo 5 ou 6 células. Os bastonetes apresentam 2 a 3  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,7 a 0,8  $\mu\text{m}$  de largura. Os esporos não entumescem o esporângio e são elipsoidais, localizando-se terminalmente ou subterminalmente no esporângio. Estes esporos possuem elevada resistência térmica. As colônias não são pigmentadas, tipicamente planas e possuem bordas irregulares.

Os ácidos graxos predominantes na membrana celular são:  $\omega$ -ciclohexil undecanóico e  $\omega$ - ciclohexil tridecanóico (Pinhatti, 1999). Hopanóides e sulfanolipídeos estão presentes, e a principal metaquinona é a MK-7 (Rosa *et al.*, 1974).

As fontes de carbono e energia utilizadas pelo organismo incluem principalmente glicose, galactose e glicerol. Não ocorre crescimento quando utiliza-se acetato, sorbitol, citrato e etanol. Como fonte de nitrogênio, utilizam a amônia e não utilizam o nitrato. Nenhum fator de crescimento é requerido.

Requer alta temperatura para seu desenvolvimento, entre 45 a 70°C, com ótimo na faixa de 60-65°C e pH ácido na faixa de 2,5 a 6,0 com ótimo entre os valores de 3 a 4. São importantes organismos produtores da enzima  $\alpha$ -amilase termorresistente (Koivula *et al.* 1993)

Baseado nas análises de similaridade de 16S r RNA observa-se uma grande correlação com o *Alicyclobacillus acidoterrestris*. O conteúdo de G+C de seu DNA varia de 61,2 a 62,2 mol% (Rosa *et al.* 1973)

Os ambientes ácidos-termais aquáticos e terrestres apresentam-se como principal fonte natural deste organismo.

A linhagem referência da espécie é ATCC 27009 (=DSM 446).

### **3.3.3. *Alicyclobacillus acidoterrestris***

Descrição baseada nas observações de Deinhard *et al.* (1987a). O termo *acidoterrestris*, do latim, refere-se a *acidum*: ácido e *terrestris*: da terra.

São aeróbios, Gram positivos, bastonetes formadores de endosporos que variam de 2,9 a 4,3  $\mu$  m de comprimento e 0,6 a 0,8  $\mu$  m de largura. O esporângio é ligeiramente entumescido e os esporos são ovais, subterminais a terminais,

variando de 1,5 a 1,8  $\mu\text{m}$  de comprimento, a 0,9 a 1,0  $\mu\text{m}$  de largura. As colônias são redondas, creme claras, translúcidas a opacas, apresentando diâmetro de 3 a 5  $\mu\text{m}$  após 6 dias de crescimento em pH 4,0 a 50°C. Nenhum fator de crescimento é requerido. A faixa de temperatura para o crescimento varia de 35 a 55° C, e a temperatura ótima de crescimento gira em torno de 42 a 53°C.

Em relação a suas características bioquímicas não produz de indol e dihidroxiacetona. A reação de Vogues Proskauer é negativa ou variável. O crescimento não ocorre na presença de 5% de NaCl.

Os ácidos graxos  $\omega$ -ciclohexil undecanóico e o  $\omega$ -ciclohexil tridecanóico, são predominantes na membrana celular (Pinhatti, 1999). Hopanóides e sulfanolídeos são presentes e a MK-7 é a menaquinina principal da membrana.

Baseados nas análises de similaridade do 16S rRNA, observa-se uma grande correlação com *A. acidocaldarius*. O conteúdo de G+C de seu DNA varia de 51,6 a 53,3 mol%. A linhagem tipo da espécie é a DSM 3922 (Deinhard *et al.* 1987a)

Este organismo difere do *A. acidocaldarius* em sua temperatura ótima de crescimento que apresenta-se mais baixa, na produção de ácido a partir de diferentes fontes de carbono e também no conteúdo inferior de G+C do seu DNA.

### **3.3.3.1 Patogenicidade do *Alicyclobacillus acidoterrestris***

Não existem evidências que os *Alicyclobacillus* apresentam riscos à saúde. Este organismo nunca foi incriminado como causador de doenças, não existindo

nenhum caso conhecido na literatura onde o mesmo tenha sido o agente causador de toxinfecção alimentar (Borlinghaus & Engel, 1997b).

Somente um estudo sobre a patogenicidade do *A. acidoterrestris* foi conduzido até o momento. Walls & Chuyate (2000a), utilizaram culturas padrões de *A. acidoterrestris* (ATCC 49025) e seguindo o protocolo da NFPA (National Food Processors Association) para teste de toxina botulínica injetaram as suspensões em camundongos. Para cada cepa testada 2 camundongos foram injetados intraperitonealmente com células bacterianas. Estas foram centrifugadas, removido o sobrenadante e ressuspensas em solução salina isotônica. Em paralelo, os mesmos autores inocularam em suco de maçã uma mistura de esporos ativados de 11 cepas de *A. acidoterrestris*. Porcos de laboratório foram alimentados com o suco inoculado de acordo com o protocolo da NFPA. Um animal foi alimentado com suco sem inoculação (controle). Todos os animais testados (camundongos e porcos de laboratório) foram observados durante 1 semana para verificar se ocorriam sinais de doenças. Decorrido este período não ocorreu nenhum sintoma adverso nos animais testados, indicando que o *A. acidoterrestris* não é patogênico.

#### **3.4. Ocorrência dos *Alicyclobacillus* em produtos ácidos**

Cerny *et al.*, (1984) foram os primeiros autores a relatarem a ocorrência de um surto de deterioração de suco de maçã, ocasionado por uma bactéria acidófila que apresentava esporos de elevada resistência térmica conhecida como *Bacillus acidoterrestris* e reclassificada posteriormente em um novo gênero, o *Alicyclobacillus* (Wisotzkey *et al.*, 1992).

No período de 1984 a 1994, não foram relatados surtos de deterioração por este microrganismo, porém Splittstoesser *et al.*, (1994) relataram a ocorrência de uma bactéria acidófila em suco de maçã e em uma bebida contendo uma mistura de suco de maçã e groselha, envasada à quente. Ainda estes mesmos autores, pesquisando a incidência de *Alicyclobacillus* em 33 amostras de diferentes tipos de sucos provenientes do varejo, compreendendo 8 sucos de maçã, 7 sucos de uva, 3 sucos de groselha, 3 sucos de cereja e 12 sucos “blend”, verificaram que somente uma amostra de suco de maçã, 1 de suco de uva e 1 de suco de cereja apresentaram esporos viáveis de *A. acidoterrestris*.

McIntyre *et al.*,(1995) isolaram bacilos acidófilos provenientes de sucos integrais de groselha, sucos cítricos deteriorados e também da água usada na elaboração desses sucos. Os autores consideraram que a fonte de contaminação não seriam somente os derivados de frutas, mas também outras fontes ambientais, como o ar, poeira, solo.

Na Itália, Prevedi *et al.*,(1995) investigaram a presença de *Alicyclobacillus* em sucos de frutas sem incidência de deterioração, mesmo assim foi constatada a presença desta bactéria em sucos de maçã, de laranja e de frutas tropicais.

Em um estudo realizado no Japão por Yamazaki *et al.*,(1996), foram isoladas bactérias acidófilas provenientes de bebidas isotônicas, suco de limão e suco de cenoura, com evidência de deterioração, as quais foram posteriormente identificadas como *Alicyclobacillus*.

Borlinghaus & Engel (1997a) testaram 166 amostras de sucos de maçã concentrado provenientes de origens e fornecedores distintos da Alemanha,

quanto a presença de *Alicyclobacillus* e obtiveram como resultado 36% de amostras positivas.

A partir de diferentes tipos de sucos de frutas, com ou sem evidência de deterioração Walls & Chuyate (1998) isolaram *A. acidoterrestris* de suco de maçã com uva, suco de maçã concentrado, suco de maçã com pêra e suco de maçã com groselha.

Em nossas condições Eiroa *et al.*,(1999) examinaram 75 amostras de suco concentrado de laranja procedentes de 11 fornecedores do Estado de São Paulo quanto a presença de *Alicyclobacillus* e constataram a positividade em 14,7% das amostras analisadas.

Pinhatti (1999) analisando 19 amostras de suco de laranja concentrado proveniente de diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo, detectou *Alicyclobacillus* em 79% das amostras. A ocorrência desta bactéria em diferentes tipos de sucos concentrados, sucos reconstituídos e em sucos integrais pasteurizados, incluindo laranja, maçã, abacaxi, uva branca, tomate, grapefruit e limão de diferentes procedências como Brasil, Estados Unidos e Canadá, também foi constatada por este mesmo autor.

Os primeiros relatos de *A. acidoterrestris* na Austrália descrevem o isolamento desta bactéria a partir de suco de maçã e também de uma bebida a base de maracujá que apresentavam sinais de deterioração (Jensen,2000) e de uma bebida a base de chá gelado contando como ingrediente a planta "rose hips"(Duong & Jensen, 2000).

Uma nova espécie de *Alicyclobacillus*, foi isolada do solo da ilha de Furnas, no arquipélago de Azores, por Albuquerque *et al.*, (2000), e foi denominada de *A. hesperidum*. Este organismo tem o percentual de G+C : 53,3%, e o componente predominante da parede celular são os ácidos alicíclicos  $\omega$ - ciclohexílico 17:0 e 19:0.

Recentemente Goto *et al.*,(2002) isolaram uma nova espécie dentro do gênero *Alicyclobacillus* a partir de chá, feito de flores de hibiscus, provenientes do Japão. Esta nova espécie apresentou diferenças genotípicas do *A. acidoterrestris*, após análises do 16S r RNA, o conteúdo de G + C de seu DNA é de 56,2%. Com base nos resultados obtidos os autores sugerem a nova espécie *Alicyclobacillus herbarius*.

Matsubara *et al.*, (2002), também isolaram uma nova espécie de *Alicyclobacillus*, a partir de bebidas ácidas, com evidências de deterioração, com odor característico de guaiacol. Esta nova espécie, o *A. acidiphilus*, tem como componente predominante da parede celular, ácido alicíclico  $\omega$ - ciclohexílico 17:0. O seu conteúdo de G + C é de 54,1%.

#### **3.4.1. Características da deterioração**

A deterioração de sucos a base de frutas por *Alicyclobacillus* tem sido caracterizada pelo desenvolvimento de odor descrito como anti-sépticos (Brown, 1996; Mcintyre, 1995), desinfetante (Borlinghaus & Engel, 1997) ou medicinal (Walls & Chuyate, 2000), embora muitas vezes o odor produzido pela deterioração seja pouco perceptível (Eguchi *et al.*, 2001a).

As características típicas de deterioração por este organismo geralmente são relatadas como, além do sabor desagradável, em um eventual aumento na turbidez do suco e a presença ou não de sedimentos no interior da embalagem (Yamazaki, 1996; Jensen, 2000). Os *Alicyclobacillus* não alteram o pH do meio e também não produzem gás (Yamazaki et al., 1996; Walls & Chuyate, 2000 b). Orr et al., (2000) observaram que em sucos de maçã inoculados com *A. acidoterrestris*, o pH original de 3,5 foi para 3,46, após 61 dias de incubação, e o Brix variou de 11,0° para 11,7° , nestas mesmas condições.

A principal substância responsável pelo odor característico de deterioração por *Alicyclobacillus* tem sido identificada como guaiacol (2-metoxi-fenol) (Splistoesser et al., 1998), podendo ser produzido a partir do aminoácido vanilina (Yamazaki et al., 1996) ou do aminoácido tirosina (Whifield, citado por Jensen, 2000). Pettipher et al., (1997) constataram que o “*Threshold*” para o guaiacol é de 2µg/ml de suco, e relatam que uma população de 10<sup>5</sup>UFC/ml de *A. acidoterrestris* seria necessário para produzir esta concentração de guaiacol. Estes autores observaram que nesta mesma população não se observa sinais visíveis de deterioração no suco.

Outra substância a qual também é atribuída a formação de odor desagradável nos sucos deteriorados por *Alicyclobacillus* é o 2-6-di-bromo-fenol na ordem de partes por trilhão (ppt) (Borlinghaus & Engel, 1997b). Jensen (1997) também detectou a presença destes halofenóis em sucos de frutas contaminados por *Alicyclobacillus*. A detecção de halofenóis em sucos vinha sendo atribuída a contaminação devido a componentes de agentes sanitizantes, e nunca relacionados com uma fonte microbiológica de contaminação.

Ainda Jensen (2000), fazendo a análise dos produtos desenvolvidos durante a deterioração do suco de maçã com *Alicyclobacillus*, detectou a presença dos halofenóis 2,6-dibromo-fenol e 2,6-dicloro-fenol. Estes halofenóis, como já descrito produzem sabores de desinfetante nos sucos e frutas. Este estudo conduzido na Austrália, foi o primeiro a relatar a produção do 2,6-dicloro-fenol pelo *A. acidoterrestris*.

Foi observada uma concentração bem maior de 2,6-dibromo-fenol do que de 2,6-dicloro-fenol, pelas cepas isoladas de sucos provenientes da Austrália (Jensen, 2000). Este mesmo autor detectou em suco de laranja e maçã uma concentração de guaiacol próxima a 100 vezes maior que os halofenóis. Observando as condições de produção do guaiacol, constatou que em suco de laranja a produção é maior que em suco de maçã e que estas altas concentrações são produzidas a 46°C, e ocorre mais rapidamente nos primeiros dias de incubação nos sucos inoculados experimentalmente com *Alicyclobacillus*, independentemente do nível de inoculo usado. Fazendo comparação entre os sucos acondicionados em garrafas de vidro e em embalagens do tipo longa vida, Jensen (2000) observou que a produção de guaiacol foi menor na embalagem longa vida devido a quantidade de O<sub>2</sub> reduzida. Quando injetou-se ar nestas embalagens tipo longa vida, a concentração de guaiacol aumentou, ficando próxima a detectada nas garrafas de vidro.

Em um estudo conduzido por Azuma *et al.*, (2000) que objetivou observar a influência de *A. acidoterrestris* nas características sensoriais do suco de laranja reconstituído e determinar quais os principais componentes voláteis destes sucos experimentalmente contaminados, concluíram que a capacidade de deteriorar suco de laranja não demonstrou ser uma característica distribuída entre as

linhagens de *Alicyclobacillus* estudadas. Os resultados obtidos também indicam que os ácidos isobutíricos, isovaléricos e 2-metil butírico podem ser os compostos responsáveis pelo problema de formação de odor desagradável em sucos contaminados por *Alicyclobacillus*. Os autores consideram também que o guaiacol, composto citado na literatura como indicador de deterioração pela bactéria foi detectado em quantidades similares em todas as amostras tanto nas inoculadas experimentalmente como as não inoculadas.

É importante observar que a incidência de *Alicyclobacillus* não está diretamente associada a deterioração. Sua presença nem sempre está associada a alterações no produto. A detecção de *Alicyclobacillus* em sucos de frutas não deteriorados (Prevedi *et al.*, 1995) sugere que a deterioração pode ser incidental, requerendo condições adequadas para o seu desenvolvimento.

### **3.5. Métodos de detecção, isolamento e identificação de *Alicyclobacillus***

#### **3.5.1. Detecção e isolamento**

Os métodos empregados para a detecção do crescimento bacteriano nas amostras de alimentos, incluem o plaqueamento direto de amostras diluídas ou brutas sobre a superfície de meio de cultura contendo ágar, incorporação das amostras no ágar fundido no momento do plaqueamento e inoculação em meio líquido.

Para o isolamento de organismos esporogênicos, suspensões das amostras devem ser aquecidas em soluções salinas, soluções tamponadas ou água, em temperaturas que ocasionem a morte apenas das células vegetativas. Posteriormente procede-se o plaqueamento em meio apropriado ou no caso de suspeita de baixa concentração de esporos, faz-se um enriquecimento por um tempo determinado a temperatura adequada.

Os meios de cultura utilizados para a detecção e isolamento de organismos acidotermofílicos são complexos, apresentam uma grande capacidade de tamponamento e fontes heterotróficas de carbono, extrato de levedura, sais e fontes de nitrogênio, fósforo e potássio, além da suplementação de íons metálicos. Estas bactérias esporogênicas aeróbicas podem ser isoladas em meios de cultura mínimos e acidificados (Priest, 1989).

O isolamento, detecção e enumeração de *Alicyclobacillus* não é até hoje uma tarefa fácil de ser realizada. Frente às dificuldades encontradas, os pesquisadores vêm dispensando inúmeros esforços no desenvolvimento de diferentes meios de cultivo e de novas técnicas de isolamento. Dentre as metodologias aplicadas, encontram-se a semeadura direta, a filtração da amostra seguida de semeadura em ágar seletivo e também o enriquecimento da amostra seguido por semeadura em ágar seletivo. Geralmente antes da etapa de enriquecimento faz-se um choque térmico utilizando diferentes binômios tempo/temperatura para a ativação dos esporos.

Os *Alicyclobacillus* são aeróbios e requerem altas temperaturas (entre 45°C a 70°C) e baixo pH (entre 2,5 e 5,0) para crescimento. Não crescem em meios com pH neutro e não podem ser isolados em meios comumente usados para o

isolamento de bacilos mesofílicos ou termofílicos em alimentos, como Ágar Triptona Glicose Extrato de Carne (*Tryptone Glicose Extract Agar* – TGE) ou Ágar Dextrose Triptona (*Dextrose Tryptone Agar* – DTA). Estes organismos podem crescer em meios acidificados como Ágar Batata Dextrose (*Potato Dextrose Agar* – PDA), OSA (*Orange Serum Agar*), *Thermoacidurans* Ágar, Ágar Extrato de Malte (*Malt Extract Agar* – MEA) ou Ágar WORT, dependendo do tempo, da temperatura e do tipo de inoculação (Pinhatti, 1999). Deve-se salientar que esses meios não são seletivos para as espécies de *Alicyclobacillus*.

Nos últimos anos, como o isolamento, detecção e identificação dos *Alicyclobacillus* tornou-se meta de vários pesquisadores, diversos trabalhos foram conduzidos com a finalidade de realizar estudos de comparação entre diferentes técnicas e meios de cultura.

Inicialmente Uchino & Doi (1967) no Japão, Darland e Brock (1971) nos Estados Unidos e Loginova (1978) na Itália e Rússia, isolaram *Alicyclobacillus acidocaldarius* a partir de habitat geotérmicos, fazendo o enriquecimento das culturas em caldo BSSA e o plaqueamento em meio BSSA (Agar Seletivo Semi Sintético de Darland e Brock), pH 4,5. As amostras sofriam um pré-tratamento térmico de 80°C/10 min antes de ocorrer o enriquecimento, e a temperatura de incubação ocorria a 50°C. Nestas mesmas condições de incubação, ativação e enriquecimento, Hippchen *et al.*, (1981) e Deinhard *et al.*, (1987b), isolaram bactérias ácido-termofílicas de solos de diferentes origens.

Baumgart (1993) utilizou como técnica para isolar *Alicyclobacillus* em sucos de frutas reconstituídos, a filtração da amostra pré-tratada termicamente em

membrana com poros de 0,45  $\mu$  m seguida de inoculação em ágar BAM (*Bacillus acidocaldarius* meidium), utilizando temperaturas de incubação de 45°C.

A metodologia utilizada por Splittstoesser *et al.*, (1994) para isolar organismos termoacidofílicos a partir de sucos de frutas industrializados proveniente do varejo, também foi a filtração da amostra em membrana com poros de 0,45  $\mu$  m, utilizando o ágar PDA pH 3,5, por um período de 14 dias a 43°C. Os mesmos autores, a partir de 2 isolados provenientes de suco de maçã industrializado e suco de maçã mais groselha, prepararam suspensões de esporos que foram testados em sua capacidade de desenvolvimento em meio PDA a diferentes pH, variando de 2,5 a 7,0 e também em meios enriquecidos. Os esporos sofreram choque térmico de 60°C/60 min. Como resultado, foi observado que em ágar PDA com pH 3,5 a 4,0 ocorreu maior recuperação dos esporos, quando comparado com os meios enriquecidos utilizados na pesquisa, como ágar nutriente (NA), ágar tripticase soja (TSA) e Brain Heart Infusion (BHI), mesmo com pH ajustado com ácido tartárico a 3,5. Também foi testado o meio semi-sintético (BSSA) com pH 3,3 a 4,9 e neste caso o crescimento foi positivo.

Esta mesma metodologia de filtração da amostra e posterior semeadura em PDA pH 3,5 e incubação a 50°C foi utilizada pelos pesquisadores Splittstoesser *et al.*, (1996) para o isolamento de esporos em suco de maçã integral e suco de maçã concentrado.

Com o objetivo de isolar bactérias termoacidofílicas de sucos de frutas industrializados McIntyre *et al.*, (1995) utilizaram o ágar PDA acidificado com a adição de ácido tartárico 10% estéril, após a autoclavagem, obtendo pH final de

3,5. Foi feito um enriquecimento das amostras em caldo para bactérias termoacidúricas (“Thermoacidurans Broth”, TAB) pH 4,0, seguido de choque térmico de 60°C ou 100°C/15 min, para ativação dos esporos em PDA acidificado a pH 3,5 e incubado a 37°C para crescimento e enumeração dos esporos.

Um estudo para determinar os limites de pH para a germinação e crescimento de esporos de bactérias termoacidofílicas também foi conduzido por McIntyre *et al.*, (1995). Neste ensaio inoculou-se uma suspensão de esporos, após sofrer um choque térmico de 60°C/ 15 min, em caldo PDB ( Potato Dextrose Broth), com pH variando de 2,5 a 5,9. Este pH foi ajustado com o uso de ácido cítrico ou hidróxido de sódio, sendo posteriormente incubados a 35°C. Os resultados apontaram que a faixa limite de pH variou de 3,0 a 5,3 e o crescimento mais denso, observado pela turbidez dos tubos, ocorreu em valores próximos do pH 3,0. Os pesquisadores também avaliaram a habilidade destas bactérias de crescer em anaerobiose, porém nestas condições atmosféricas (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>) não ocorreu crescimento.

Com o propósito de conhecer o comportamento de 4 cepas de bactérias termoacidofílicas provenientes de sucos de frutas e compará-las com 2 cepas padrão (*A. acidocampestris* e *A. acidocaldarium*) frente a diferentes temperaturas de incubação, habilidade em crescer em diferentes meios de cultura e diferentes faixas de pH, Prevedi *et al.*, (1995) conduziram um estudo onde os meios utilizados para o ensaio de crescimento foram: Malt extract agar (MEA) pH 4,0, Orange Serum agar (OSA) pH 5,0, Thermo-acidurans agar (TA) pH 4,9, Wort agar (WA) pH 4,7, MSR agar pH 5,6 e Tryptone Soy agar (TSA) pH 7,3. Para o estudo de limite de temperatura de crescimento, inoculou-se suspensão de esporos em ágar BAM pH 4,0 e incubou-se a 25, 30, 37, 40, 50, 55, 60, 65 e 70°C durante 7 dias.

Também foi determinado o limite mínimo de pH para a germinação e crescimento dos esporos, utilizando-se o ágar BAM a 50°C. O pH foi ajustado utilizando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou NaOH. Os resultados demonstraram que em meios com pH alto como o TSA (pH 7,3) e MRS (pH 5,65), não ocorreu o crescimento em nenhuma faixa de temperatura. Os pesquisadores concluíram que tanto os isolados como as 2 cepas padrão estudadas evidenciaram habilidade em crescer numa ampla faixa de temperatura (30 a 60°C), porém somente se desenvolveram em meios estritamente ácidos, (pH entre 2,5 a 5,5). O crescimento foi mais evidente quando a temperatura encontrou-se na faixa de 50-55°C e o pH em valores de 3,0 a 5,0.

A partir da observação de que esporos de *Alicyclobacillus* não se desenvolvem em meios de cultura ricos em nutrientes (Splittstoesser, 1994) um estudo foi conduzido por Splittstoesser & Churrey (1996) com a finalidade de observar a influência de vários tipos de proteínas hidrolizadas (peptona, neopteptonas, peptonas número 2 e número 3), pois estas são ingredientes presentes em meios de culturas como fonte de nitrogênio. Os resultados demonstraram que os 4 tipos de isolados proteicos, exerceram efeito inibitório na germinação dos esporos e a neoptona e peptona número 3 evidenciaram um maior grau de inibição. Os constituintes que conferem o caráter inibitório destas proteínas necessitam ser melhor investigados. Estes pesquisadores sugerem que o aminoácido triptofano seja um dos componentes responsáveis pela inibição do crescimento dos *Alicyclobacillus*. A não detecção de *Alicyclobacillus* em meios bacteriológicos amplamente utilizados, pode explicar porque só recentemente, esta bactéria tem sido reconhecida como agente de deterioração de alimentos ácidos. Deste modo, a presença desta bactéria nos alimentos tem sido negligenciada devido a utilização de meios ricos como o PCA (Plate Counter Agar) nos laboratórios de controle de qualidade microbiológica (Splittstoesser & Churrey, 1996).

No Japão, Yamazaki *et al.*,(1996) isolaram esporos de *Alicyclobacillus* provenientes de bebidas ácidas deterioradas, utilizando como técnica de a inoculação em ágar PDA (pH 4,0) e incubação a 37°C e também no ágar BAM (pH 4,0) e incubação a 50°C. Fazendo a caracterização dos isolados obtidos, observaram que todos apresentaram habilidade em crescer numa faixa de pH de 2,5 a 6,0, temperatura variando de 25 a 60°C, e não apresentaram capacidade de crescerem em condições de anaerobiose.

Objetivando o desenvolvimento de métodos de enumeração e métodos de detecção de *Alicyclobacillus* em sucos de frutas, Pettipher *et al.*,(1997) conduziram um estudo, onde para enumeração, testaram a habilidade de 3 diferentes meios de cultura: BAM, OSA e PDA, todos com pH próximo a 4,0, em recuperar esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498 previamente inoculados em suco de laranja. Compararam também a técnica de inoculação em profundidade e em superfície nestes diferentes meios. Os resultados apontaram que estes organismos cresciam bem na faixa de temperatura de 25 a 44°C, porém a temperatura ideal ficou próxima dos 44°C, e mostrando também ser semi-seletiva para este grupo de microrganismo. O meio OSA mostrou ser o que melhor recuperou os esporos, bem como a inoculação em superfície. Os autores sugerem que o método de enumeração deve ser executado da seguinte forma:

1. Inoculação de 0,2 ml do produto em superfície de agar OSA;
2. Incubação a 44°C/48h
3. Contagem das colônias como presuntivas para *A. acidoterrestris*.

Ainda neste estudo, Pettipher *et al.*,(1997) sugerem que para o método de detecção (presença/ausência) de *Alicyclobacillus*, as amostras devem ser pré-incubadas a 44°C/48h e com transferencia posterior de 10 µl em superfície de placas com ágar OSA. Em seguida as placas deverão ser incubadas novamente a 48°C.

O método de enumeração não é suficientemente sensível para detectar baixos níveis de *Alicyclobacillus* em sucos, e o método de detecção (presença/ausência), demonstrou ser mais sensível podendo detectar 1 célula /10 ml de suco concentrado ou 1 célula/100ml de suco diluído.

Estes mesmos autores sugerem também que a técnica da filtragem da amostra em membranas, com posterior inoculação em ágar OSA têm demonstrado ser um método bastante sensível para a detecção de *Alicyclobacillus* em sucos de frutas.

Eiroa *et al.*, (1999) conduzindo um estudo comparativo entre os meios OSA e BAM, objetivaram determinar qual apresentaria maior habilidade em recuperar esporos previamente inoculados em sucos de laranja, concluíram ser o ágar BAM o mais indicado .

A sensibilidade de diferentes meios de culturas usados para isolar *Alicyclobacillus* de alimentos, foi testado por Walls & Chuyate (1998), que investigaram 5 cepas obtidas de alimentos ácidos deteriorados como tomate enlatado, suco de maçã e suco de pêra. Os meios testados foram OSA, Tomato Juice Ágar Special, PDA (pH 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0), Dextrose Triptona Ágar(DTA) (pH 7,4) e ágar K (pH 3,7), incubados a temperatura de 20, 35 e 55°C. O ágar K demonstrou ser o mais eficiente, pois todos os isolados cresceram, e em menor tempo (1 a 2 dias), quando utilizou-se temperatura de incubação de 43°C.

Com o objetivo de obter maiores informações a respeito dos procedimentos de isolamento de *Alicyclobacillus*, Walls & Chuyate (2000b), fizeram um novo estudo comparativo entre o ágar K (pH 3,7) e os meios geralmente utilizados para

alimentos ácidos. Esporos foram inoculados em suco de maçã, de laranja e de misto de frutas, sendo isolados nos seguintes meios: ágar K (pH 3,7), meio semi-sintético (FSM) pH 4,0 e Meio Mínimo de Sais (MSM) pH 4,0. Os meios foram incubados a 24, 35, 43 e 55°C. A maior recuperação dos esporos foi obtida tanto com o ágar K como o agar MSM, incubados a 43°C. A determinação do melhor tratamento para ativação dos esporos também foi estudada, e empregados os tratamentos 60°C/10min; 80°C/5; 10; 15; 20; 25 e 30 min e 100°C/5min. A ativação dos esporos a 80°C/10min foi considerada mais apropriada. Os autores sugerem que quando estima-se que um número pequeno de esporos esteja presente na amostra, o uso da filtração para concentrar estes esporos promoveria resultados mais interessantes do que o uso do método da pré-incubação para determinar a presença ou ausência de esporos.

Ainda estes autores (Walls & Chuyate, 2000b), conduziram um estudo para verificar se a peptona apresenta-se como um agente inibidor do *Alicyclobacillus* pois estudos anteriores (Splittstoesser, 1996) apontaram que este ingrediente bastante comum em meios bacteriológicos de contagem, demonstrou caráter inibitório para a germinação e crescimento de esporos deste organismo. Devido a peptona ser um ingrediente do ágar K, os autores investigaram se a peptona causa alguma interferência (inibição) na contagem dos esporos. Os resultados apontaram que a peptona não exerceu nenhum efeito inibitório para as cepas de *Alicyclobacillus* testadas.

O ágar de soro de laranja (OSA) foi usado por Jensen (2000) na Austrália, para isolar *Alicyclobacillus* de diferentes sucos de frutas. Observaram um aumento do crescimento quando adicionava-se 0,5% de sacarose ao ágar OSA. Similarmente, foi observada uma melhoria na recuperação dos esporos presentes

no suco, quando o diluente era acidificado a pH 4,0 e adicionado 0,5% de sacarose.

Com o objetivo de isolar *Alicyclobacillus* em uma bebida, de origem australiana a base de chá contendo suco de amora deteriorado, Duong & Jansen (2000) inicialmente usaram o ágar OSA e incubação a 25°C. Como não ocorreu o isolamento da bactéria nestas condições, as amostras foram então diluídas, homogeneizadas e enriquecidas no caldo DSMZ (Deutsche Sammlung von Microorganism und Zellkulturen) e incubada a 46°C por 5 dias. Em seguida foram inoculadas em ágar DSMZ incubada a 46°C/5 dias. O meio DSMZ é semelhante ao BAM (*Bacillus acidocaldarius* médium) desenvolvido por Deinhard *et al.*, (1987) exceto que o DSMZ possui 2g de extrato de levedura/litro de ágar ou caldo, ao invés de 1g, como no meio BAM. Nestas condições, *Alicyclobacillus* foram isolados nas amostras do chá deteriorado. Estes foram testados em sua capacidade de crescer em OSA (pH 5,5), DSM (pH 4,0) e PCA (pH 7,0). As placas foram incubadas a 46°C/5 dias. Todos os isolados cresceram em DSMZ, porém não ocorreu crescimento em OSA e em PCA. Os autores sugerem reduzir o pH do meio OSA quando for usado para testes com *Alicyclobacillus*. Os autores consideram ainda que meios como BAM e DSMZ não são seletivos.

### **3.5.2. Identificação de *Alicyclobacillus***

#### **3.5.2.1 Identificação bioquímica dos *Alicyclobacillus***

O perfil bioquímico dos *Alicyclobacillus* é bastante variável. Os principais testes bioquímicos utilizados na identificação deste organismo estão contidos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Caracterização bioquímica de linhagens tipo de *A. acidocaldarius* (ATCC 27009), *A. cycloheptanicus* (ATCC 49028) e *A. acidoterrestris* (ATCC 49025), segundo o esquema de Gordon et al. (1973).\*

Características	<i>A. acidocaldarius</i>	<i>A. cycloheptanicus</i>	<i>A. acidoterrestris</i>
Gram	+	+	+
Motilidade	+	+	+
Catalase	+	-	+
Crescimento anaeróbio	-	-	-
Voges-Proskauer	+	-	-
Formação de ácidos a partir:			
D-glicose	+	-	+
L-arabinose	+	-	+
D-xylose	+	+	+
D-manitol	+	+	+
D-trealose	+	-	-
Utilização de citrato	+	-	+
Utilização de propionato	+	-	-
Hidrólise do amido	+	-	-
Desaminação da fenilalanina	-	-	-
Redução do nitrato	+	-	-
Formação do indol	+	-	-
Dihidroxiacetona	-	-	-
Cresc. em caldo nutriente	-	-	-
Crescimento em NaCl			
0%	+	+	+
5%	+	-	-
7%	+	-	-
10%	+	-	-
Crescimento em presença de 0,001% de lisozima.	+	-	-

\*O pH dos meios foi ajustado para 5,0  
 Fonte: Walls & Chuyate (1998)

### **3.5.2.2 Identificação genotípica dos *Alicyclobacillus***

Borlinghaus & Engels (1997b) consideram que um dos maiores desafios para um efetivo programa de controle de qualidade nos laboratórios de microbiologia seria o longo tempo (5 a 10 dias), necessário quando utilizam-se técnicas convencionais de isolamento dos *Alicyclobacillus*. Sugerem com alternativa duas técnicas analíticas, seguras e rápidas, a citometria de fluxo (FCM) e o PCR. Os mesmos autores analisando 16 amostras de suco de maçã concentrado de diferentes origens, através da técnica de citometria de fluxo observaram que 36% das amostras estavam contaminadas por *Alicyclobacillus*, com contagens > 0,05 células de *Alicyclobacillus*/ml.

A quimiotaxonomia, ou seja, as informações obtidas a partir de análises de componentes químicos celulares foram essenciais para a classificação e identificação de microrganismos do gênero *Alicyclobacillus*.

#### **3.5.2.2.1 Análise genética com marcadores RAPD**

O seqüenciamento do genoma inteiro de uma bactéria é uma prática muito complexa, mesmo pelas modernas técnicas de análise de DNA atualmente disponíveis( Willians *et al.*, 1990). O que normalmente se utiliza é a comparação dos genomas bacterianos entre si, onde o DNA de uma bactéria desconhecida é disposto de maneira que o DNA da bactéria de referência possa ser pareado e a homologia entre os DNAs calculada, porém, os resultados obtidos nem sempre permitem afirmar a distinção entre algumas espécies( Willians *et al.*, 1990)

Segundo Van Belkum (1994), uma série de técnicas de biologia molecular vêm sendo descritas na literatura no sentido de melhor elucidar investigações

epidemiológicas. Essas técnicas moleculares conduzem a uma maior rapidez e confiabilidade nos resultados, permitindo uma detecção fácil e segura do microrganismo sob investigação.

O surgimento de uma técnica molecular, denominada PCR (Polimerase Chain Reaction) tem revolucionado o estudo da genética dos microrganismos, sendo considerada um marco para a biologia molecular (Coutinho *et al.*, 1993). PCR consiste numa reação enzimática em cadeia que durante vários ciclos, duplica fitas complementares da seqüência alvo do DNA. Esta reação utiliza *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) complementares à pequena seqüência, em fitas opostas, que flanqueiam o DNA *target* (alvo). O ciclo padrão de PCR consiste de: 1) aquecimento próximo a temperatura de ebulição, para desnaturação do DNA molde (94°C); 2) resfriamento para permitir o anelamento dos *primers* às seqüências do DNA molde (34°C); 3) aquecimento moderado permitindo a extensão dos *primers* anelados pela ação de uma enzima DNA polimerase termo-estável duplicando o DNA alvo (72°C); e 4) desnaturação do duplexes recém-formados, retornando então a primeira etapa do ciclo. A seqüência de DNA alvo é duplicada desta forma a cada ciclo. A amplificação prossegue exponencialmente, chegando-se a 1 milhão de vezes após o vigésimo ciclo. Cada ciclo tem duração de 3 a 5 minutos e, é repetido de 30 a 40 vezes. O procedimento completo é finalizado em 2 a 4 horas (Brock & Madigan, 1991).

A obtenção de uma DNA polimerase termo-estável (95°C), extraída de uma bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, denominada de Taq polimerase (Saiki *et al.*, 1988) e o desenvolvimento de equipamentos automáticos de PCR, têm facilitado a introdução desta técnica nos laboratórios, bem como aumentado suas aplicações, não só pela rapidez, como pela facilidade de realização.

Os produtos obtidos da amplificação são separados por eletroforese em géis de agarose. Este processo tem como resultado um padrão de bandas com aspecto semelhante a um código de barras. A esse código damos o nome de *fingerprints* (impressões digitais) da bactéria, que possibilitam não só caracterizar como diferenciar espécies ou estirpes diferentes, pelo número e tamanho dos fragmentos amplificados (Coutinho *et al.*, 1993; Matthews & Oliver, 1994).

A reação de PCR também oferece a possibilidade da rápida identificação de bactérias, bem como sua detecção em alimentos, como reportado por Fach *et al.* (1993) em trabalho desenvolvido com linhagens de *Clostridium botulinum* produtoras de toxina A, responsáveis pelo botulismo humano.

Uma técnica de *fingerprints* de DNA denominada RADP – Randomly Amplified Polymorphic DNA, foi descrita (Welsh & Mclelland, 1990; Williams *et al.* 1990), tem sido amplamente utilizada. Esta técnica, uma variante da metodologia tradicional de PCR, utiliza pequenos *primers* únicos de seqüência arbitrária para amplificar DNA genômico, sem requerer conhecimento prévio da seqüência do DNA a ser amplificado. Os perfis dos produtos obtidos na amplificação, após a separação eletroforética, podem ser usados como *fingerprints* de linhagens de vários microrganismos tanto procariontes como eucariontes, permitindo discriminação entre elas. Assim sendo, a técnica de RAPD vem proporcionando uma nova estratégia para metodologia na caracterização de microrganismos (Stephan *et al.*, 1994). RAPD é hoje uma técnica estabelecida e amplamente utilizada para gerar informação da variabilidade do DNA tendo as mais diversas aplicações na análise genética de procariotos e eucariotos (Yamazaki *et al.*, 1997b).

Independente do nome utilizado e das pequenas variações na metodologia, a técnica de PCR utilizando *primers* de seqüência arbitrária, compostos por oligonucleotídeos, abriu uma perspectiva inteiramente nova para a análise genômica de indivíduos e populações. Além de facilitar e acelerar os estudos que já ocorriam com as espécies mais tradicionais, a tecnologia RAPD trouxe uma verdadeira “democratização” da análise de polimorfismo molecular, ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas. Desde sua descrição, o uso de marcadores RAPD na análise genética tem tido uma difusão extremamente rápida. As aplicações incluem:

- (1) a obtenção de “fingersprints” genômicos de indivíduos, variedades e populações;
- (2) a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma;
- (3) estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies;
- (4) a construção de mapas genéticos e a localização de genes de interesse econômico

Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares ao *primer* arbitrário devem estar suficientemente adjacentes (< 4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA *polimerase*. Em função da grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser visualizado diretamente na forma de uma banda num gel de eletroforese. A eletroforese é geralmente conduzida em gel de agarose e a visualização é feita com brometo de etídio em luz ultravioleta. Alternativamente, géis de poliacrilamida

de alta resolução podem ser utilizados e as bandas visualizadas por autoradiografia (AP-PCR) ou coloração com nitrato de prata. Tipicamente, cada *primer* arbitrário utilizado dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando assim em várias bandas do gel ( Williams, 1990).

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases é suficiente para causar a não complementariedade do *primer* com a sítio de iniciação (“priming site”) e assim impedir a amplificação de um segmento. Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer. Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda de gel) está presente ou ausente.

Outra característica importante do RAPD, além de sua rapidez e simplicidade, consiste no fato de que mínimas alterações na seqüência dos *primers* ou nas condições de amplificação podem resultar em drásticas mudanças nos perfis a serem obtidos.

A técnica do RAPD tem sido utilizada para identificar bactérias presentes em alimentos, Stephan *et al.*,(1994) caracterizou *Bacillus licheniformis* com o emprego desta, utilizando 2 *primers* compostos de 10 nucleotídeos. *Bacillus thuringiensis* também foi identificado e diferenciado de *Bacillus cereus* através da utilização desta técnica molecular em estudos desenvolvidos por Brousseau *et al.*,(1993).

*Fingerprints* de isolados de *Yersinia enterocolitica* obtidos pelo ensaio de RAPD permitiram a Rasmussen *et al.*,(1994) discriminarem linhagens patogênicas das não-patogênicas. Lawrence *et al.*,(1993) empregaram um *primer* ( com 10 nucleotídeos) no estudo de 91 linhagens de *Listeria monocytogenes* e, através dos *fingerprints* obtidos por RAPD, sugeriram um sorotipo que seria o mais freqüente em linhagens provenientes de alimentos.

Yamazaki *et al.*,(1997b), no Japão, identificaram 3 cepas isoladas de sucos de frutas deteriorados, como sendo *A. acidoterrestris*, pela técnica do RAPD, usando 3 *primers* com seqüência de 10 oligonucleotídeos cada um. Os autores sugerem que a técnica do RAPD é bastante eficiente e rápida para distinguir *A. acidoterrestris* de outras bactérias.

Zacarchenco *et al.*,(2000), isolaram 300 cepas de *B. sporothermodurans* (BSP) em leite UAT/UHT produzido no Brasil. Dessas, 24 cepas tiveram seu DNA cromossômico avaliado pela técnica do RAPD, sendo que os perfis obtidos foram muito similares ao de BSP referência (DSMZ 10599).

Com o objetivo de identificar e investigar as características epidemiológicas de *Listeria monocytogenes* isoladas de carne, Byun (2001), submetem estes isolados a identificação bioquímica e também a reação de RAPD, onde foram utilizados 3 *primers* para a amplificação do DNA. Os resultados indicam que a técnica do RAPD pode ser uma ferramenta importante para o estudo epidemiológico da *L. monocytogenes* como também de outras bactérias, pois se trata de uma técnica de fácil execução e de resultados idôneos.

### **3.6. Resistência térmica dos *Alicyclobacillus***

#### **3.6.1. Esporo bacteriano**

O esporo bacteriano (estado dormente das células vegetativas) é um termo usado para descrever o estado aparente de inativação metabólica, comparando com o metabolismo normal destas células. A falta de nutrientes resulta na interrupção da divisão celular de células normais, iniciando um novo conjunto de processos bioquímicos e morfológicos (Gombas, 1987).

Os esporos contêm ácido dipicolínico (DPA), DPA-dipirina, 2-6 ácido decarboxílico que não ocorre nas células vegetativas, aparece na fase de formação do córtex durante a esporulação coincidindo com a incorporação do cálcio pelo esporo. Acredita-se que o córtex é o local do esporo onde se localiza o DPA na forma de um complexo com o cálcio e o peptidoglicano, formando uma espécie de malha que protege o esporo do ambiente externo.

As razões que causam a termorresistência dos esporos são divididas em três aspectos: aspectos intrínsecos que se referem às diferenças inerentes entre espécies ou entre linhagens de uma mesma espécie: aspecto da desidratação do core, que é uma teoria bem aceita, onde as moléculas fortemente ligadas em forma cruzada, localizadas no material cortical formado por peptidoglicano são capazes de manter o core num estado de desidratação ou baixa atividade de água, que resulta em estabilidade das moléculas críticas e das organelas. O outro aspecto é a mineralização, que seria o termo usado para descrever a alta incorporação de minerais particularmente o cálcio, durante a esporulação. Os esporos podem ter até 3% de seu peso seco na forma de cálcio, e este alto nível

de calcificação está relacionado a sua resistência ao calor e a sua dormência(Gombas,1987).

Os gêneros de bactérias formadores de endosporos são *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus* , *Oscillospira* (Shida, 1996) e *Alicyclobacillus* ( Deinhard *et. al.*, 1987a). O esporo bacteriano, por sua vez, apresenta a propriedade de alta resistência térmica à maioria das técnicas de preservação de alimentos: como cozimento, congelamento, irradiação ou tratamento com antimicrobianos químicos. Numa condição de esterilidade comercial é de se esperar que todos os esporos que germinam e crescem no produto durante o estoque sejam destruídos. No entanto, quando o processo térmico é a pasteurização, é geralmente projetado com o objetivo de atuar sobre microrganismo mesófilos, sem eliminar os termófilos formadores de esporos mais termorresistentes como *Clostridium thermosaccharolyticum* e *Bacillus stearothermophilus*, quando o produto vai ser mantido a temperaturas inferiores a 35°C durante a estocagem (Pfug, 1990). Felizmente, a deterioração por estes microrganismos é rara, pois são poucos os produtos que são rotineiramente estocados a temperatura superiores a 45°C, que são favoráveis para a proliferação dos termófilos.(Gombas, 1987).

A ativação do esporo é um fenômeno físico, provavelmente relacionado a reconfiguração molecular. Existem vários tratamentos que são responsáveis pela ativação, como ionização, radiação, agentes redutores, pH extremo e calor. Uma possível explicação para a ativação é que esta pode resultar num arranjo estrutural, possivelmente aumentando a permeabilidade a germinantes, ou fazendo com que os sítios de ativação se tornem mais acessíveis. Esporos ativados podem germinar mais rápidos e ser menos exigentes quanto ao requerimento nutricional. Além disso, esporos ativados não sofrem uma perda

significativa de propriedades de resistência. A maioria dos tipos de ativação é reversível, ao estado original de dormência (Ito, 1981).

A ativação é dose dependente, ou seja, se o tratamento é muito severo, pode ser letal. A ativação térmica parece seguir uma função de tempo e temperatura, na qual tempo de exposição ótimo para ativação é inversamente proporcional a temperatura a ser utilizada (Pflug, 1990).

### **3.6.2. Ensaio de ativação**

A ativação térmica geralmente é necessária para uma melhor recuperação dos esporos presentes no alimento. Diferentes binômio tempo/temperatura são empregados como 60°C/60 min (Splittstoesser *et al.*,1994), 80°C/10 min (Prevedini *et al.*,1995) e 60°C/15 min (McIntyre *et al.*,1995).

Nos primeiros estudos de isolamento de *Alicyclobacillus* como os realizados por Uchino & Doi (1967) no Japão, Darland & Brock (1971) nos Estados Unidos e Joginova (1978) na Itália e Rússia a partir de diferentes fontes, como solos e fontes geotérmicas, o tratamento térmico utilizado para a quebra da dormência dos esporos era de 80°C/10min. Hippechen *et al.*,(1981) e Deinhard *et al.*,(1987a) isolaram bactérias acidotermofílicas de solos de diferentes origens, também utilizando 80°C/10min como binômio de ativação dos esporos.

A partir da ativação de uma suspensão de esporos de *A. acidoterrestris* a 80°C/10 min, Pettispher *et al.*,(1997) observaram que neste tratamento térmico, as células vegetativas foram destruídas, conseguindo-se uma esporulação de 90%. Quando ativou-se a mesma suspensão a 95°C/30 segundos, o resultado foi uma

redução da contagem de esporos, porém estes ainda sobreviveram e mostraram-se capazes de crescer em suco de laranja, deteriorando o produto.

Splittstoesser *et al.*, (1998) conduziram um estudo para determinar a melhor técnica de recuperação dos esporos de *Alicyclobacillus*. Para tanto, uma suspensão de esporos e células vegetativas foram suspensas em etanol 70% por 30 minutos para destruir as células vegetativas, e posteriormente foram termicamente ativados a 60°C/30 min. Os autores observaram que este tratamento dobrou a contagem de células viáveis, indicando que cerca de 50% dos esporos estavam em estado dormente e necessitando de ativação para germinar e produzir colônias. Pontius *et al.*,(1998), constataram que o melhor tratamento de ativação para esporos de *Alicyclobacillus* seria o de 65°C/45 min.

Para determinar as melhores condições de ativação de esporos de *Alicyclobacillus* em suco de laranja, Eiroa *et al.*,(1999) submeteram suspensões de esporos de cultura padrão de *A. acidoterrestris* DSM 2498 a diferentes tratamentos térmicos (60°C/60 min; 60°C/30 min; 70°C/20 min; 80°C por 5, 10 e 30 min e ebulição por 5 min). Como resultado, os autores relataram grande recuperação de esporos quando ativados a 70°C/20 min. Entretanto Silva *et al.*,(1999), constataram que a contagem de suspensões de esporos de *Alicyclobacillus* ativadas termicamente ou não ativadas foi similar.

Objetivando avaliar o efeito de tratamentos térmicos a diferentes tempos e temperaturas para melhor ativação de esporos em suco de maçã, Walls & Chuyate (2000b) inocularam suspensões de *A. acidoterrestris* em suco de maçã e aqueceram as suspensões a 60°C/10 min; 80°C/5, 10, 15, 20, 25 e 30 min e 100°C/15 min. Observaram que quando foi utilizado uma baixa concentração de inóculo, o tratamento a 80°C/10 min apresentou contagens significativamente

superiores aos outros tratamentos. Porém, quando a concentração de esporos foi maior ( $10^3$  esporos/ml) e ativados a 80°C em diferentes intervalos de tempo, não ocorreu nenhuma diferença nas contagens obtidas. Os autores consideraram o tratamento a 80°C/10 min como sendo o mais apropriado.

Pettipher & Osmundson (2000) consideram que se amostras que porventura possuam esporos de *A. acidoterrestris* forem ativadas a 80°C/10 min, pode resultar num aumento da contagem deste organismo. Jensem (2000) relata que o melhor tratamento para a ativação dos esporos dos *Alicyclobacillus* seria 70°C/20 min, e considera que a diferença entre os tratamentos de ativação é provavelmente arbitrária, no entanto alguma forma de ativação é necessária.

### **3.6.3. Estudo da resistência térmica dos *Alicyclobacillus***

Considera-se que a resistência térmica dos esporos bacterianos seja influenciada por alguns fatores ambientais como: pH, atividade de água e composição do meio. O pH do meio de aquecimento é um dos fatores mais importantes. Os esporos geralmente são mais resistentes em soluções com pH ligeiramente superior ao seu ótimo, e a sua resistência térmica diminui marcadamente à medida que o pH do meio diminui (Blocher & Busta, 1983). A acidificação dos alimentos geralmente é usada para prevenir o crescimento de alguns microrganismos termoresistentes, porque o baixo pH pode reduzir a resistência térmica dos esporos, além do fato de muitas bactérias esporuladas não serem capazes de crescer em pH inferiores a 3,7.

A característica de resistência térmica dos *Alicyclobacillus* é muito importante na determinação do processo térmico utilizado para preservação de produtos de frutas. Acredita-se que o fato dos os *Alicyclobacillus* possuírem como

componente celular em sua membrana, ácido graxo com radical  $\omega$ -ciclohexil, contribua para sua sobrevivência a baixos níveis de pH e altas temperaturas, e esta estrutura circular auxilia na estabilidade do core e da membrana (Pontius *et al.*, 1998). Devido a estas características, este organismo tornou-se uma grande preocupação para a indústria de sucos de frutas( Borlinghaus & Engel, 1997a).

As primeiras pesquisas relativas a resistência térmica de esporos de *A. acidoterrestris*, como as de Cerny *et al.*,(1985) e Splittstoesser *et al.*,(1994) relatavam valores D a 90°C de 15 e 16 a 23 min respectivamente. Splittstoesser *et al.*,(1994) também determinaram o valor D de 2,4 a 2,8 min a 95°C. Esses resultados sugerem que os esporos podem sobreviver aos tratamentos usualmente empregados durante a pasteurização 88 a 96°C por 2 min.

Mcintyre *et al.*,(1995) utilizaram temperaturas típicas de pasteurização (87,8° C; 91°C e 95°C) para determinarem resistência térmica de *Alicyclobacillus* em sucos de groselha e os valores D obtidos foram 11,0; 3,8 e 1,0 min respectivamente.

No intuito de verificar a influência de fatores como pH, concentração de sólidos solúveis, temperatura de aquecimento e outros, sobre a resistência térmica dos *Alicyclobacillus*, diversos estudos foram conduzidos por diferentes autores. Borlinghaus & Engel (1997b) realizaram um ensaio de resistência térmica onde inocularam suco de maçã a 50 e 15° Brix com esporos de *A. acidoterrestris* e pasteurizaram as amostras entre 100 e 135°C (em intervalos de 5°C) durante 6 segundos. Para a cepa padrão, o valor D obtido neste estudo foi superior do já relatado na literatura. Os autores concluíram que a sensibilidade térmica dos *Alicyclobacillus* depende das condições nas quais os seus esporos são expostos.

A influência de diferentes tampões e pH na resistência térmica dos *Alicyclobacillus acidoterrestris* foi investigada por Murakami *et al.*,(1998). Verificaram que em baixas concentrações (20 mM), o valor D 90°C no tampão citrato e tampão fosfato foi de 13,6 e 12,9 minutos respectivamente, mostrando uma pequena variação. No entanto, em altas concentrações (100 mM), o valor D 90°C no tampão citrato 14,4 minutos foi significativamente maior que em tampão fosfato, 12,3 minutos. Tem sido relatado que a resistência térmica dos esporos decresce gradualmente quando a concentração de tampão fosfato aumenta, porém isso não ocorreu com os *Alicyclobacillus*. Os valores em tampão McIlvaine não variaram muito dentro da faixa de pH 3,0 a 8,0. A 88, 90, 92 e 95°C, em tampão McIlvaine, os valores D foram 24,1-29,1; 14,8-16,8; 5,7-7,1 e 2,2-2,8 minutos respectivamente. Fica evidente neste estudo, que a resistência térmica dos esporos de *A. acidoterrestris* é pouco afetada pela variação de pH do meio de aquecimento. O valor Z também não variou muito com a variação de pH dos diferentes tampões, ficando numa faixa de 6,4 a 7,1°C. Com os resultados obtidos observaram que os esporos de *A. acidoterrestris* puderam sobreviver em bebidas ácidas e deterioradas, o que segundo os autores é explicado pelo fato destas bebidas serem aquecidas muito rapidamente a 90-95°C, para prevenir a perda de cor e formação de odores desagradáveis durante o processo térmico. Para se conseguir uma efetiva redução dos *A. acidoterrestris* nos sucos, faz-se um pequeno aumento na temperatura de pasteurização ou utiliza-se alguma substância antibacteriana simultaneamente ao processo térmico (Murakami *et al.*,1998).

Spittstoesser *et al.*,(1998) estudaram o efeito de sólidos solúveis na resistência térmica de *Alicyclobacillus* em suco de uva com diferentes graus Brix e constataram que quando se aumenta a concentração de sólidos solúveis, a resistência térmica deste organismo também aumenta. Estes resultados demonstraram que é mais difícil destruir os esporos de *Alicyclobacillus* em sucos

concentrados do que em sucos prontos para beber. Em sucos de uva com 16° Brix, o D 95°C foi de 1,9 minuto, enquanto que o mesmo suco com 65° Brix, o D 95°C foi de 12 minutos. Ácido sórbico e SO<sub>2</sub> que são conservantes bastante utilizados em sucos, por reduzirem a resistência térmica de ascósporos de fungos, no entanto, concentrações de 100 mg/litro não produziram efeito de reduzir a resistência térmica dos esporos de *Alicyclobacillus*.

O mecanismo da resistência térmica dos esporos bacterianos ainda não é conhecido com detalhes. Sabe-se que está associada com a desidratação, conteúdo de ácido dipicolínico, presença de proteínas termo-estáveis, mineralização e desmineralização. Muitos autores ( Blocher & Busta, 1983; Orr & Beuchat, 2000), concordam que a desmineralização dos esporos diminui a resistência e a remineralização com íons divalentes como Ca<sup>++</sup> ou Mg<sup>++</sup> aumenta a resistência térmica.

Yamazaki *et al.*,(1997a) conduziram um estudo objetivando estudar a influência de cátions divalentes na resistência térmica de esporos de *A. acidoterrestris*. Após submeterem os esporos desta bactéria provenientes de um suco de fruta deteriorado à desmineralização e posteriormente á mineralização com cálcio, determinaram então a resistência térmica três formas de esporos obtidas (controle, desmineralizada e Ca – mineralizada). As temperaturas estudadas foram 89, 90 e 95°C. Os resultados demonstraram que para outras bactérias, como por exemplo o *Bacillus subtilis*, a forma mineralizada com Ca apresentou elevada resistência térmica quando comparada ao controle ou a forma desmineralizada, no entanto para os *A. acidoterrestris*, nenhuma diferença nos valores D a 90°C foi observada entre as 3 formas de esporos estudadas. O conteúdo de Ca e Mn dos esporos de *A. acidoterrestris* não foi facilmente alterado pelos tratamentos de desmineralização e remineralização, e resistência térmica dos esporos também não foi afetada por estes tratamentos. Estes esporos têm a

característica de manterem fortemente ligados em sua estrutura o Ca e o Mn, mesmo sob condições de baixo pH. Pode-se considerar que para os esporos de *Alicyclobacillus*, a presença de quantidades constantes de Ca e a característica de manter os íons divalentes fortemente ligados em sua estrutura pode ser relatada como justificativa para sua elevada resistência térmica.

Ainda Yamazaki *et al.* (1997a), constataram que a resistência térmica destes esporos não foi afetada pela presença de diferentes cátions divalentes (Ca, Mg, Ba, Mn e Si) no meio utilizado para esporulação.

O efeito do pH, tipo de ácido e temperatura sobre a resistência térmica de esporos de isolados de *A. acidoterrestris* a partir de sucos de frutas também foi estudado por Pontius *et al.*, (1998). Este estudo foi realizado em um sistema semelhante a um suco de fruta, composto de 12% de glicose e 30 mM de ácido cítrico ou ácido málico ou ácido tartárico, com valores de pH variando de 2,8 a 4,0. As temperaturas utilizadas foram 88, 91, 94, 97 e 100°C. Os resultados demonstraram que na faixa de pH variando de 2,8 a 4,0, o efeito do pH na resistência térmica foi observado quando utilizou-se baixas temperaturas, porém este efeito não foi observado em altas temperaturas. A 91°C e pH 3,1 e 3,7 o valor D foi de 31,3 e 54,3 minutos, respectivamente, enquanto que a 97°C em pH 3,1 e 3,7 os valores D obtidos foram de 7,9 e 8,8 minutos, respectivamente. O tipo de ácido usado na composição da solução de suco de frutas (málico, cítrico e tartárico) não afetou a resistência térmica dos esporos. Os autores observaram também que os valores D obtidos para todas as cepas de *A. acidoterrestris* usadas neste estudo, foram maiores que os observados em outros estudos. Consideraram que a diferença nos valores D para uma mesma cepa reflete nas diferenças das condições de esporulação e o efeito do meio de aquecimento. As cepas usadas neste estudo também foram estudadas por Splittstoesser *et al.*, (1998) sendo que estes autores obtiveram valores D inferiores e o meio de

esporulação usado foi o PDA pH 3,5 e neste estudo relatado as cepas foram submetidas a esporulação em PDA pH 5,6. Como conclusão os autores consideraram que 97°C, que é uma das temperaturas mais altas usadas em pasteurização de sucos de frutas, o valor D obtido neste estudo foi de 8 a 9 minutos, sendo que o tempo empregado na prática é de geralmente 2 minutos.

Com o objetivo de investigar a influência da temperatura ( $T = 85 - 97^{\circ}\text{C}$ ), conteúdo de sólidos totais ( $\text{SS} = 5-60^{\circ}\text{ Brix}$ ) e pH ( $2,5 - 6,0$ ) na resistência térmica da cepa padrão de *A. acidoterrestris* NCIMB 13137, Silva *et al.*,(1999) utilizaram como meio de aquecimento uma solução simulando um suco de fruta. Esta solução era composta de caldo de extrato de malte, ajustada para o valor específico de Brix e pH, antes da esterilização, com frutose e ácido clorídrico, respectivamente. Nos resultados, como esperado, a temperatura foi o fator que causou maior variação nos valores D, seguido do conteúdo de sólidos solúveis e pelo pH. O valor D aumentou com o aumento do teor de sólidos totais e pH, principalmente a baixas temperaturas, por exemplo, ao redor de 97°C, o efeito do pH e do teor de sólidos totais não foi muito visível. Os valores D obtidos variaram de 0,5 minuto ( $T = 97^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{SS} = 5^{\circ}\text{ Brix}$  e  $\text{pH} = 6,0$ ) a 94,9 minutos ( $T = 85^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{SS} = 60^{\circ}\text{ Brix}$  e  $\text{pH} = 6,0$ ). Quando os autores utilizaram  $\text{pH} = 2,5$ ,  $\text{SS} = 5^{\circ}\text{Brix}$  e  $T = 85^{\circ}\text{C}$ , o valor D obtido foi de 35,5 min, nestas mesmas condições, somente elevando-se o a porcentagem de sólidos solúveis para 60°Brix, o valor D obtido foi de 60,3min.

Silva *et al.*,(1999) determinaram também a resistência térmica da cepa padrão *A. acidoterrestris* em suco de cupuaçú, suco de laranja e em concentrado de groselha, observando que a resistência térmica dos esporos desta bactéria é maior nestes sucos do que nas soluções contendo extrato de malte, frutose e/ou HCl. Os autores consideram que alguns compostos específicos presentes nos diferentes sucos possam causar um efeito de aumentar a resistência térmica dos

esporos. Para o suco de capuaçú os valores D a 85°C foi de 17,5 min e o D a 91°C foi de 5,3 min, o Z obtido foi de 9,0°C. Para o suco de laranja os valores obtidos a 85 e 91°C foram de 65,6 a 11,9 min respectivamente, com Z = 7,8°C, e para o concentrado de groselha (26,1° Brix) a 91°C o D foi de 3,84 min e nesta mesma temperatura, porém com 58,5° Brix o valor D obtido para o concentrado de groselha foi de 24,1 min.

Komitopoulou *et al.*,(1999) estudaram o efeito da nisina sobre a resistência térmica de esporos de *A. acidoterrestris* em suco de laranja e suco de maçã, e concluíram que a presença da nisina reduz a resistência térmica dos esporos, e o efeito é mais evidente a temperaturas na faixa de 80 a 90°C , quando comparado com temperaturas em torno de 95°C.

Utilizando suco de laranja integral, Eiroa *et al.*,(1999) determinaram a resistência térmica de *A. acidoterrestris* e constataram uma elevada termoresistência das cepas estudadas, variando o valor D na faixa de 60,84 a 94,52 min para 85°C; 10,03 a 20,60 min para 90°C e 2,49 a 8,69 min para 95°C. O valor Z variou entre 7,18 a 11,25°C. Valores semelhantes foram encontrados por Jensem (2000) que determinou a resistência térmica de 2 isolados de *A. acidoterrestris* provenientes de suco de maçã e de uma bebida ácida, onde o D a 95°C variou de 2,1 a 2,5 min.

### **3.7. Medidas de controle dos *Alicyclobacillus***

A deterioração dos produtos ácidos, como os sucos de frutas por *A. acidoterrestris* tornou-se um grande problema para a indústria alimentícia, pois o processamento térmico necessário para inativar os esporos deste organismo

produzirá alterações organolépticas inaceitáveis ao produto. O aumento da temperatura no processo térmico, às vezes, torna-se impraticável.

Existem atualmente alguns parâmetros conhecidos como inibitórios para o crescimento de *Alicyclobacillus* em sucos de frutas, como por exemplo, a refrigeração ( Jensen, 2000). Até o momento se sabe que os *Alicyclobacillus* não crescem em temperaturas inferiores a 20°C ( Cerny *et al.*, 2000), no entanto sucos de frutas pasteurizados não são distribuídos sob refrigeração, e o resfriamento desses produtos pode apresentar um grande aumento de custo. A estocagem do suco concentrado, com elevado Brix, sob condições de congelamento inibe a ação deteriorogênica deste organismo. No entanto, após sua diluição em água, o produto torna-se susceptível a contaminação e conseqüente ação deteriorogênica do microrganismo (Eguchi *et al* 2001a).

Estudos têm sido conduzidos para desenvolver estratégias que previnam o crescimento do organismo e conseqüentemente a deterioração do produto. Um número de fatores tem sido investigados como presença de ácidos orgânicos, preservativos e desinfecção da matéria prima para o controle da presença dos *Alicyclobacillus* em alimentos.

Yamazaki *et al.*, (1997a) examinaram o efeito de alguns ácidos orgânicos no crescimento de *A. acidoterrestis* e constataram que o ácido láctico e ácido succínico são inibitórios inicialmente, porém após 36 horas cessa a inibição e a população final volta a tornar-se similar à população inicial (controle). A maior inibição do crescimento de *A. acidoterrestis* foi observada com 0,1% de ácido acético. Os resultados indicaram que produtos que contenham ácido acético, como molhos de saladas, dificilmente serão deteriorados, no entanto, produtos a base de outros ácidos poderão tolerar o crescimento deste organismo.

O efeito da nisina, um polipeptídeo produzido por cepas de *Lactobacillus lactis*, que inibe a germinação de esporos, foi estudado por Komitopoulou *et al.*,(1999), sobre uma população conhecida de esporos de *A. acidoterrestris*. Os autores observaram que a 44°C, utilizando-se 50UI/ml de nisina, o crescimento de *A. acidoterrestris* ocorreu de uma forma bastante vagarosa, e nesta mesma temperatura dobrando-se a concentração de nisina ( 100UI/ml), o crescimento desta bactéria foi totalmente inibido. Os autores sugerem o uso da nisina antes da pasteurização do suco, pois a mesma irá diminuir a resistência térmica dos esporos que porventura estejam presentes. Na Austrália a nisina é um aditivo alimentar aprovado somente para uso em produtos de tomate, segundo a Australian New Zeland Food Authority (ANZFA). O uso da nisina pode ser uma opção para o controle de crescimento de *A. acidoterrestris* em produtos de frutas, porém a indústria prefere produzir produtos sem conservantes, particularmente se for para o mercado exportador, pois o país comprador pode não permitir o uso de determinados aditivos.

Partindo-se do princípio que os *Alicyclobacillus* são estritamente aeróbios, Cerny *et al.*,(2000) investigaram como o potencial de óxido-redução ou a eliminação do oxigênio influenciam o crescimento deste organismo em diferentes sucos de frutas. É difícil de se obter a total ausência de oxigênio nestes sucos, pois pode ser encontrado oxigênio remanescente quando ocorre um equilíbrio de gases após os procedimentos da produção de vácuo. Os autores estudaram o comportamento dos *Alicyclobacillus* em sucos de maçã, de uva branca, de uva vermelha e em suco de laranja, e constataram que o suco de laranja, que possui um potencial de óxido redução maior, apresentou as melhores condições de crescimento.

Ainda Cerny *et al.*,(2000), observaram que o potencial de óxido-redução dos sucos variou com a adição de ácido ascórbico, ou seja, aumentando-se a

concentração de ácido ascórbico, o potencial de óxido-redução diminui, o qual pode ser um procedimento utilizado para melhorar a qualidade dos sucos, conforme sugerem os autores.

Alguns autores estudaram a eficácia de diferentes desinfetantes na destruição de esporos de *A. acidoterrestris*. Doyle *et al.*, (1999) relataram o efeito de alguns sanificantes sobre soluções de esporos de *A. acidoterrestris*, mantidos a 23°C durante 10 minutos. Observaram uma redução do número de esporos variando de 0,4 a 2,4 ciclos logarítmicos quando utilizou-se 1% de peróxido de hidrogênio, 200ppm de cloro, 500ppm de cloreto de sódio acidificado. A exposição a 8% de fosfato trisódio e ao ácido peracético (Tsunami®), foi menos efetiva. Foi estudado também o efeito destes desinfetantes em superfícies de maçãs não lavadas, e o observado foi que tanto o cloro a 500ppm e o cloreto de sódio acidificado a 1200ppm foram efetivos, porém reduziram menos que 1 ciclo logarítmico na população inicial de esporos. O tratamento com 2% de peróxido de hidrogênio foi ineficiente na inativação dos esporos remanescentes na superfície das maçãs.

Um estudo conduzido por Orr *et al.*, (2000), também objetivou avaliar a eficácia de diferentes desinfetantes químicos na destruição de esporos de *Alicyclobacillus*. Foi observada uma redução de 2,2; 0,4 e 0,1 ciclos logarítmicos quando se empregou 200ppm de cloro, 500ppm de cloreto de sódio acidificado e 0,2% de peróxido de hidrogênio, sobre uma suspensão de esporos proveniente de 5 cepas distintas de *A. acidoterrestris*. Aumentando-se a concentração para 1000ppm de cloro ou 4% de peróxido de hidrogênio, a população de esporos foi reduzida em mais que 5 ciclos logarítmicos. Tratamentos com 8% de trisódio fosfato ou 80ppm de Tsunami® não reduziu significativamente o número de esporos. Também foi estudada a eficiência dos tratamentos químicos em destruir

cepas de *A. acidoterrestris* inoculadas experimentalmente em superfícies de maçã. O tratamento com 500ppm de cloro ou 1200ppm de cloreto acidificado de sódio reduziu o número de células viáveis, porém a redução foi menor que um ciclo logaritimico. Foi observado que os tratamentos com cloro (500 ou 1000ppm) ou com cloreto de sódio (1200ppm) inativaram significativamente os esporos inoculados nas superfícies das maçãs, porém a magnitude da redução foi bem menor quando comparada com a redução dos esporos tratados em soluções aquosas dos diferentes sanificantes químicos. A observação que estes compostos são substancialmente menos efetivos em destruir esporos inoculados em superfícies de maçãs, comparando com a eficiência destes mesmos sanificantes em destruir esporos em suspensões aquosas é devido em parte à inacessibilidade dos esporos, geralmente localizados nas fissuras, ranhuras, da pele das maçãs. Sabe-se que as superfícies das frutas é hidrofóbica, proporcionando assim proteção às células vegetativas e esporos contra o contato com as soluções aquosas dos sanificantes. O uso de detergentes, solventes, surfactantes e uma operação de lavagem mais vigorosa das frutas poderiam melhorar a eficiência do desinfetante. Outra alternativa, segundo os autores seria uma combinação de calor e desinfetante, exercendo assim uma ação sinérgica na destruição de esporos nas superfícies das frutas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

Os sucos utilizados na pesquisa, de procedência comercial, tinham as seguintes características:

**Suco de abacaxi:** pH-3,5 a 4,1; Brix(20°C) 12 a 15; % acidez 0,4 a 0,76; % de sólidos em suspensão 13 a 22 e densidade 1,045 a 1,058.

**Suco de maracujá:** pH- 2,6 a 3,5; Brix(20°C) 12 a 13; % acidez 3,7 a 4,2; % de sólidos em suspensão 22 a 32 e densidade 1,044 a 1,058.

As frutas, maracujá e abacaxi, utilizadas o preparo dos sucos em laboratório, foram obtidas no CEASA ( Centrais de Abastecimento de Campinas, S.A)

#### 4.1.1. Culturas de *Alicyclobacillus*:

Foram utilizadas as cepas padrão : *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498, *Alicyclobacillus acidocaldarius* CCT 2490 e *Alicyclobacillus cycloheptanicus* CCT 4382 da coleção de culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”.

#### **4.1.2. Vidraria**

A vidraria utilizada foi esterilizada em estufa a 170°C por 2 horas.

#### **4.1.3. Instrumentos e Equipamentos**

Foram utilizados os seguintes instrumentos e equipamentos:

- Autoclave horizontal FABBE
- Balança analítica Scienthe AS 210 D
- Banho-maria com agitação Marconi.
- Calibrador de Temperatura Omega CL 511.
- Camara de Fluxo Laminar Veco
- Centrifuga refrigerada SPIN VI Incibrás
- Estufa regulada a 170°C
- BOD regulada a 50°C
- Maçarico Record
- Medidor de p H DPMH-2, Digimed

- Microscópio com contraste de fase Olympus
- Câmara fria regulada a  $-18^{\circ}\text{C}$
- Refratômetro manual Atago N 50
- Tubos TDT de vidro de boro-silicato
- Termopar flexível tipo T cobre-constantan
- Microcentrifuga Eppendorf
- Termociclador Perkin-Elmer 2400
- Transiluminador
- Cuba de eletroforese- 100volts
- Câmera Polaroid

#### **4.1.4. Meios de cultura e reagentes utilizados**

- Ágar BAM ( *Bacillus acidocaldarium* medium)
- Diluente para *Alicyclobacillus*

- Reagentes para a extração de DNA: Solução de EDTA; Solução de Lisozima, Solução de detergente (SDS), Solução de Clorofórmio, Dióxido de Silica; Solução de etanol e Tris).
- Reagentes para a quantificação do DNA : corante azul de bromofenol; gel de agarose; marcador padrão de DNA (  $\lambda$ -hind), solução tampão TAE ( Tris-acetato).
- Reagentes para a reação de RAPD : *Primers* de oligonucleotídeos,  $MgCl_2$ , desoxirribonucleotídeos, enzima Taq DNA polimerase, gel de agarose, brometo de etídeo, tampão TBE (Tris-ácido bórico), marcador padrão de DNA (  $\lambda$ -hind).

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.2. Constatação da pureza da cultura padrão *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498.

Em princípio foi constatada a pureza da cultura de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498, obtida da coleção de culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello". A cultura foi inoculada por estrias em superfície de placas contendo ágar BAM (*Bacillus acidocaldarius* medium), e a seguir incubada a 50°C durante 48 horas. Posteriormente, foram feitas observações microscópicas e macroscópicas das colônias (forma, cor, tamanho e odor).

#### **4.2.3. Preparo de sucos de abacaxi (*Ananas comosus* (L) merrill var. havaiano ) e maracujá (*Passiflora edulis* sims var. amarelo-azedo) em condições estéreis**

Para determinar as condições ótimas de tempo e temperatura para ativação dos esporos, foi usado como meio de aquecimento os próprios sucos. Para esta finalidade as frutas (abacaxi e maracujá) foram lavadas cuidadosamente com esponja e detergente líquido, enxaguadas e imergidas em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 100 mg/l, de cloro ativo durante 15 minutos. A seguir as frutas foram enxaguadas em água corrente, recebendo um enxágüe final em água estéril. A partir deste momento, trabalhou-se em capela de fluxo laminar vertical estéril. Após serem enxugadas com toalha estéril, foram preparados sucos com ajuda de facas, para cortar a fruta, e centrifuga, previamente lavadas e sanificadas. Todos estes cuidados foram tomados para minimizar uma eventual contaminação com esporos presentes nas frutas. Em seguida os sucos foram coados e congelados em câmaras frias a  $-18^{\circ}\text{C}$  em recipientes estéreis.

Após a extração destes sucos foram determinados o pH e o °Brix, e os resultados obtidos para o suco de maracujá foi o pH 3,7 e 13 °Brix, e para o suco de abacaxi o pH foi de 3,9 e 12°Brix.

#### **4.2.4. Preparo da suspensão de esporos**

Uma suspensão padrão de esporos foi preparada pela inoculação da cepa de *A. acidoterrestis* DSM 2498, em 10 tubos contendo ágar BAM inclinado, após incubação a  $50^{\circ}\text{C}$ , por 72 horas. Foram realizadas observações da presença de esporos em microscópio de contraste de fase, marca Olympus. Quando

constatada a presença de numerosos esporos refringentes, cerca de 80% do campo observado, foram adicionados 5 ml de água destilada estéril em cada tubo, sendo o crescimento removido com auxílio de alça bacteriológica. Em seguida a suspensão obtida foi transferida para um frasco Erlenmeyer contendo 100 ml de água destilada e pérolas de vidro estéreis. Após vigorosa agitação foi retirada uma alíquota de 20 ml da suspensão e transferida para 1 tubo de 20 x 180 mm com tampa rosqueável. A seguir foi aplicado um tratamento térmico de 70°C por 20 min, baseado em experiências anteriores com outros sucos. A seguir o tubo foi resfriado em banho de água gelada, até temperatura próxima de 45°C. Após o choque-térmico, seguindo a metodologia de STUMBO (1973), retirou-se porções de 1 a 3 ml da suspensão de esporos e espalharam-se com alça de Drigalsky em superfície de placas com ágar BAM, para promover uma maior produção de esporos. A incubação foi realizada a 50°C durante 72 horas.

Após incubação foram feitas observações em microscópio de contraste de fase até o aparecimento de uma grande quantidade de esporos refringentes (cerca de 80 a 90% do campo observado). Neste momento foi feitas a coleta e limpeza dos esporos, de acordo com Stumbo (1973): Nas colônias obtidas nas placas de ágar BAM foi adicionado aproximadamente 5 ml de água destilada estéril, e removido com auxílio de alça de Drigalsky e retirado com pipeta estéril. A seguir, a suspensão das diferentes placas, foi coletada em um frasco Erlenmeyer estéril contendo 100 ml de água destilada estéril. A suspensão de esporos assim obtida foi submetida à centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, em centrífuga refrigerada a 7°C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e os sedimentos foram ressuspensos em água destilada estéril e novamente centrifugado. Esta operação de limpeza foi realizada três vezes. Após a última centrifugação os esporos foram ressuspensos em 10 ml de água destilada estéril e transferidos para frasco estéril contendo 100 ml de água destilada e pérolas de vidro. A suspensão foi então armazenada sob refrigeração a 4°C. Foram

preparadas suspensões de esporos para as cepas 4,6 e 7, da mesma forma indicada acima.

#### **4.2.5. Quantificação dos esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498 presentes na suspensão.**

A população aproximada de esporos, presente na suspensão mãe foi determinada mediante contagem em câmara de Petroff-Houser. Para obter o valor real da população de esporos, foi realizada também contagem em placas com ágar BAM, onde uma alíquota de 1,0ml da suspensão de esporos foi diluída em 9,0ml de água destilada estéril. Esta diluição foi submetida a uma ativação térmica a 70°C por 20 minutos, seguida de resfriamento em banho de gelo. Em seguida foram realizadas diluições sucessivas decimais até  $10^{-8}$ . Um volume de 1,0 ml de cada diluição foi transferido, em duplicata, para placas de Petri esterilizadas, com posterior adição de ágar BAM e homogeneização. Após solidificação do meio, foi efetuada a incubação a 50°C, até contagem constante, por um período de aproximadamente 7 dias. Foram contadas as colônias típicas e os resultados expressos em UFC/ ml (Unidades Formadoras de Colônias/ml).

#### **4.2.6. Determinação das condições ótimas de tempo e temperatura para ativação dos esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498.**

Um volume de 0,5 ml da suspensão de *A. acidoterrestres* DSM 2498 foi inoculado em tubos de 20 x 180 mm com tampa rosqueável, contendo 10 ml de suco de maracujá e 10 ml de suco de abacaxi, em ensaios independentes, de maneira a atingir uma concentração final de esporos da ordem de aproximadamente  $10^3$  UFC/10 ml de suco.

Em continuação, foram aplicados sete tratamentos térmicos diferentes em banho-maria com agitação, com 2 repetições, como segue: 60°C/60 min, 60°C/30 min, 70°C/20 min; 80°C/5 min; 80°C/10 min; 80°C/30 min e ebulição/5 min, seguidos de resfriamento em banho de gelo. Foram realizadas duas repetições deste ensaio.

Após os tratamentos térmicos foram preparadas diluições decimais sucessivas utilizando diluente para *Alicyclobacillus* (Anexo 1). Destas diluições foram inoculadas 0,1 ml em superfície de placas contendo ágar BAM, seguido de espalhamento com alça de Drigalsky e incubação a 50°C. Diariamente, durante sete dias foi feita a contagem de colônias nas placas, até se obter uma população constante.

O tempo e temperatura ótimos de ativação foi determinado como sendo aquele que produziu a maior contagem de esporos e foi utilizado posteriormente nos ensaios de isolamento de resistência térmica.

#### **4.2.7. Determinação do tempo de incubação ótimo para isolamento de esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 a partir de amostras de suco de maracujá e abacaxi experimentalmente contaminados.**

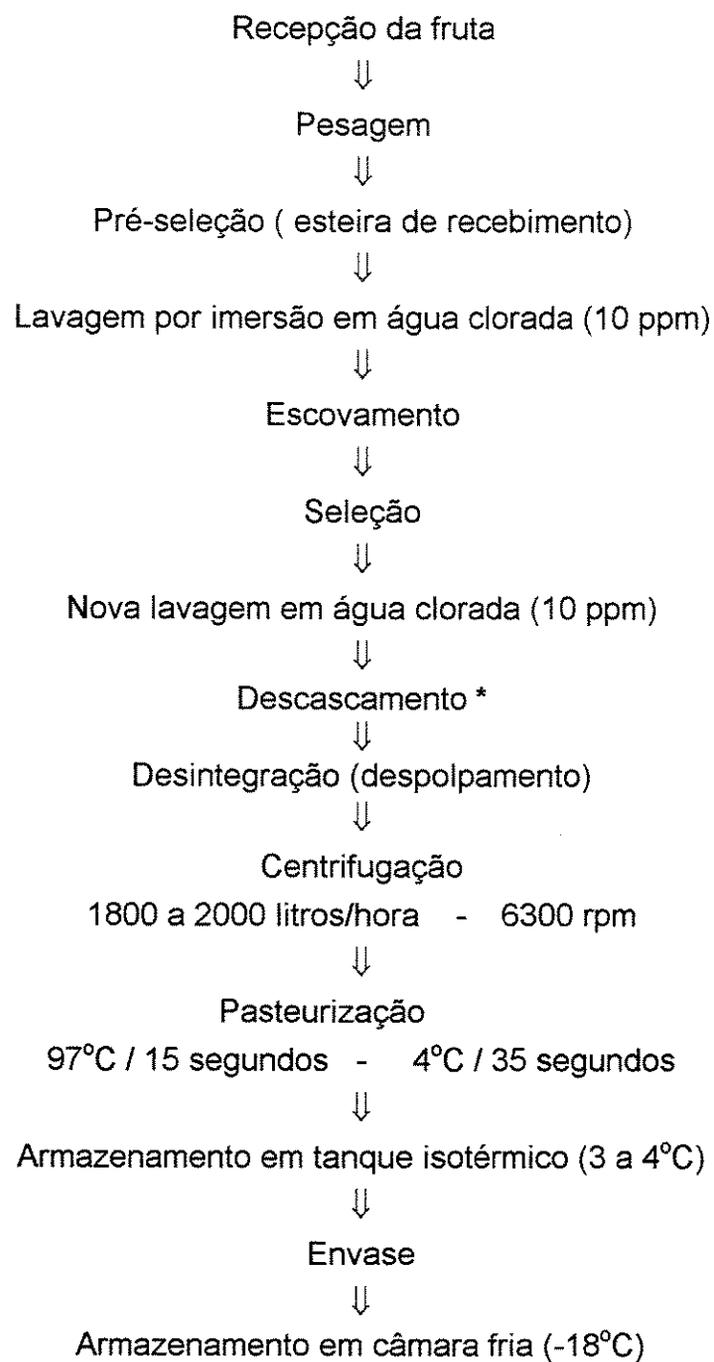
O estudo foi conduzido da seguinte maneira: retirou-se uma alíquota de 20 ml da suspensão mãe de esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498, preparada como descrito em 4.1.3, sendo a seguir aplicado um tratamento térmico de 70°C / 20 min, seguido de resfriamento em banho de gelo. Após a ativação dos esporos foram feitas diluições e cálculos para inocular 100 ml de cada suco, com uma quantidade tal da suspensão de esporos ativados, que fosse atingida uma

contaminação de aproximadamente  $10^4$  esporos/ml. Os tubos foram inoculados a  $50^\circ\text{C}$  durante 120h, realizando contagens em ágar BAM nos tempos: 0h; 24h; 48h; 72h; 96h e 120h.

#### **4.2.8. Isolamento de *Alicyclobacillus* a partir de sucos comerciais pasteurizados de abacaxi e maracujá.**

Os sucos utilizados nesta pesquisa eram procedentes de uma indústria processadora no Estado de São Paulo. As amostras foram coletadas no período de março a agosto de 1999 representando assim diferentes épocas de extração e períodos de processamento durante a safra. Os sucos apresentaram-se num total de 12 lotes, compreendendo 4 a 5 amostras por lote.

Estes sucos eram integrais, pasteurizados ( $97^\circ\text{C}/15\text{s}$ ), acondicionados em embalagens plásticas tipo garrafa com capacidade de 1000ml, e posteriormente congelados. Estas amostras eram armazenadas em câmaras frias a  $-18^\circ\text{C}$  na indústria de procedência, e transportadas até o laboratório para as análises em caixas isotérmicas. Durante o processamento destes sucos ( Figura 1), tornou-se importante observar que os mesmos estavam livres de qualquer agente conservador, conforme informação do fabricante. Foram examinadas um total de 57 amostras de suco de maracujá e 50 amostras de suco de abacaxi.



**Figura 1:** Fluxograma do processamento de suco de abacaxi e maracujá.

\*Etapa realizada só para o suco de abacaxi.

Para a detecção dos esporos eventualmente presentes nos sucos, inicialmente foi feita a etapa de enriquecimento das amostras: Para isso, a partir de um litro de suco de fruta (maracujá e abacaxi), previamente homogeneizado, foram retiradas 10 porções de 10 ml de suco e inoculadas em 10 tubos contendo 10 ml de caldo BAM, seguido de incubação a  $50^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}/24$  (para os sucos de abacaxi) e 48h (para os sucos de maracujá). Estes tempos ótimos de enriquecimento foram determinados previamente. Os tubos com caldo BAM, já inoculados com as amostras de suco, sofreram antes da incubação a  $50^{\circ}\text{C}$ , um choque térmico de  $70^{\circ}\text{C}/20\text{min}$ , tratamento observado como o melhor para ativar os esporos presentes nos dois tipos de sucos estudados.

Para a quantificação dos esporos presentes nos sucos, foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP), utilizando-se a série de 10 tubos. Após o enriquecimento das amostras, foi feita a subcultura do conteúdo de cada tubo em placas de ágar BAM, com incubação a  $50^{\circ}\text{C}$ , e a leitura das placas ocorreu a cada 24h, por um período de 7 dias. Após a confirmação do crescimento em ágar BAM e observação de colônias típicas, o número de tubos positivos foi estabelecido e usado para estimar o NMP. Cabe neste momento salientar que a técnica do NMP clássica foi adaptada aos experimentos com o objetivo de simplificar o trabalho dado o elevado número de amostras, a serem examinadas. A adaptação foi baseada em cálculos realizados determinando a população de esporos com a ajuda fórmula de Halvorson & Ziegler (1933) e comparação com os valores que seriam obtidos pela tabela de NMP/100 ml contida em Eaton *et al.*, (1995).

#### **4.2.9. Preservação das cepas isoladas**

As cepas isoladas conforme o item 4.2.7 foram purificadas pela técnica de estrias em superfície do meio ágar BAM, seguido de incubação a  $50^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ .

As colônias purificadas isoladas foram examinadas quanto a pureza, através de observações macroscópicas e microscópicas. Estas cepas foram então mantidas em tubos com ágar BAM a 4°C para posteriormente serem caracterizadas. Estas foram designadas por letras, segundo o lote de origem.

#### **4.2.10. Caracterização das cepas isoladas.**

A partir das cepas isoladas presuntivamente como *A. acidoterrestris* foram feitas observações microscópicas e macroscópicas das colônias (forma, tamanho, cor) e odor característico.

Em seguida foi feita a identificação bioquímica e genotípica destas cepas.

##### **4.2.10.1. Identificação bioquímica das cepas isoladas**

Inicialmente, a partir das culturas purificadas, foram realizados testes bioquímicos como: prova da catalase, benzidina, hidrólise do amido, e produção de acetoina, segundo Gordon (1973), porém com ajuste do pH do meio para valores próximo de 5,0. Em paralelo, também foi examinada a capacidade de crescimento em condições de anaerobiose e em pH 3,5 e 6,8. A motilidade também foi investigada em caldo BAM, com incubação a 50°C, fazendo-se observações microscópicas em intervalos regulares, durante 18 horas de incubação, antes que iniciasse a esporulação.

#### **4.2.10.1.1. Identificação bioquímica das cepas isoladas pela utilização do sistema API CH 50.**

Para o preparo do inóculo as cepas isoladas foram cultivadas por 24h em 100ml de caldo BAM a 50°C sob agitação a 1.500 rpm. A seguir as células foram separadas por centrifugação (5.000 rpm por 5 min) e lavadas com solução salina estéril, obtendo-se assim uma suspensão de células limpas. Em continuação, numa ampola contendo 5 ml de água destilada estéril, preparou-se uma suspensão de células, com uma densidade celular indicada pela turbidez igual ao tubo 2 da escala de Mac Farland correspondendo a  $6.10^8$  UFC/ml, que acompanha o kit do sistema API CH 50 (Deinhard *et al.*, 1987a). Esta suspensão de células foi utilizada, após a obtenção da turbidez desejada, segundo instruções do fabricante, para inocular o meio basal.

O meio basal utilizado para a inoculação das galerias do sistema API CH 50, foi o meio BAM modificado, sem adição de glicose e com azul de bromofenol (30 mg/ml) utilizado como indicador, de acordo com Deinhard *et al.* (1987a).

A suspensão de células obtida, foi usada para inocular 20 ml do meio basal, com 2 vezes o número de gotas que foram necessárias para obter a turbidez do tubo 2 da escala de Mc Farland. Este procedimento foi realizado para viabilizar a inoculação do meio com uma quantidade aproximadamente constante de células, em cada teste do API CH 50.

Com o meio basal assim preparado, preencheu-se com pipeta Pasteur os poços das galerias. Na câmara de incubação, foi colocado nos alvéolos do fundo, 10ml de água estéril, e então as galerias foram incubadas a 50°C em condições de aerobiose, por 48-72hs.

#### **4.2.10.2. Identificação genotípica das cepas isoladas utilizando a Técnica do RAPD.**

De um total de 90 cepas isoladas das amostras do suco de maracujá examinadas, foram escolhidas 16 cepas de diferentes lotes que apresentaram elevada positividade para bactérias termoacidófilas.

##### **4.2.10.2.1. Extração do DNA genômico total das cepas isoladas dos sucos.**

O DNA genômico das cepas isoladas presuntivamente como *A. acidoterrestis* (Tabela 4) foi extraído de acordo com a metodologia de Doyle & Doyle (1990).

Os isolados foram inoculados em 20ml de caldo BAM e incubados a 50°C com agitação em *shaker* de plataforma com controle de temperatura por 24h. Em seguida, retirou-se 750µl da suspensão que foram transferidos para um tubo Eppendorf contendo 750µl de NaCl. Os microrganismos foram sedimentados por centrifugação, pulso de 1 min em microcentrífuga (14.000 rpm). O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 100µl de EDTA-Solução-Salina (EDTA-0.01M e NaCl-0.15M pH8.0).

A seguir, adicionou-se 100µl de solução de glicose-50mM, EDTA-10mM, Tris pH8.0-25mM (GET) mais uma solução de lisozima (lisozima-100mg-GET-10ml). Após homogeneização o tubo foi incubado a 37°C por 30 min com agitação com inversão (5 vezes) a cada 10 min. Em continuação, adicionou-se 100µl de solução detergente (SDS) 20%. Após homogeneização cuidadosa o tubo foi colocado em banho-maria a 50°C por 10 min, com agitação ocasional.

**Tabela 4:** Cepas isoladas de sucos de maracujá e cepas padrão utilizadas na Técnica do RAPD.

Número	Lote / N° do isolado	Origem
1	E(1)	Suco de maracujá
2	E(2)	Suco de maracujá
3	E(7)	Suco de maracujá
4	E(14)	Suco de maracujá
5	E(15)	Suco de maracujá
6	E(25)	Suco de maracujá
7	E(27)	Suco de maracujá
8	E(34)	Suco de maracujá
9	E(35)	Suco de maracujá
10	F(58)	Suco de maracujá
11	F(59)	Suco de maracujá
12	G(83)	Suco de maracujá
13	I(85)	Suco de maracujá
14	J(87)	Suco de maracujá
15	J(88)	Suco de maracujá
16	D(90)	Suco de maracujá
17	<i>B. acidocaldaricus</i> CCT 2490	Coleção de cultura*
18	<i>B. acidocaldaricus</i> CCT 2490	Coleção de cultura*
19	<i>B. cycloheptanicus</i> CCT 4382	Coleção de cultura*
20	<i>B. acidoterrestris</i> DSM 2498	Coleção de cultura*
21	<i>B. acidoterrestris</i> DSM 2498	Coleção de cultura*

\* Coleção de culturas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”.

Em seguida, foram adicionados 50 $\mu$ l de perclorato de sódio, gota a gota, invertendo cuidadosamente o tubo, após cada adição. Adicionou-se então 500 $\mu$ l de CIA(Clorofórmio-24ml e Álcool isoamílico-1 ml), homogeneizando-se com cuidado até formar uma emulsão.

O próximo passo foi centrifugar o conteúdo do tubo Eppendorf a temperatura ambiente durante 5 min a 1.500rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo Eppendorf, e descartando-se o resto. Adicionou-se então ao conteúdo deste novo tubo 500 $\mu$ l de NaCl 4M e 40 $\mu$ L de Dióxido de Sílica ( 0,5g Dióxido de Sílica em 45ml de NaCl 4M), homogeneizando bem, e incubou-se em banho-maria a 50°C por 5 min. Em seguida, deu-se um pulso de 20 segundos em microcentrífuga, eliminou-se o sobrenadante e lavou-se 2 vezes com solução G (NaCl-50Mm, Tris pH 7,5-10mM, EDTA-2,5mM, Etanol-50%). A cada lavagem deu-se um pulso de 20 segundos em microcentrífuga, eliminou-se o sobrenadante, e o precipitado deixou-se secar a temperatura ambiente por aproximadamente 4h. Este precipitado foi ressuspenso em 40 $\mu$ l de água purificada (Milli-Q) esterilizada e colocado em banho-maria a 37°C por 10min. Após a incubação, centrifugou-se a temperatura ambiente, durante 60 segundos, transferindo então o sobrenadante para um novo tubo. Este sobrenadante assim obtido continha o DNA extraído e limpo.

#### **4.2.10.2.2. Quantificação do DNA cromossômico.**

Uma alíquota de 5  $\mu$ l de DNA foi cuidadosamente transferida para um tubo de microcentrífuga tipo eppendorf, onde adicionou-se 2  $\mu$ l de solução corante (glicerol 25%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e EDTA

150mM, pH8,0 ). Em seguida, a alíquota foi aplicada em gel de agarose 0,8%, solidificando em molde acrílico com 30 canaletas, juntamente com um marcador-padrão de concentração conhecida do DNA, o  $\lambda$  hind (GIBCO-BRL). A solução tampão utilizada para a eletroforese foi TAE (TRIS- acetato 4,0 mM, EDTA 1Mm, pH 8,0 ) . A eletroforese foi feita a 100V. Posteriormente, o gel foi imerso em solução tampão TAE contendo brometo de etídeo( 5  $\mu$ g/ml) por 30 minutos. Em seguida, o DNA foi visualizado através de um transiluminador, e finalmente teve sua concentração obtida através da comparação com o DNA de concentração conhecida, para sua posterior utilização na reação de RAPD.

#### **4.2.10.2.3. Reação de RAPD.**

As ampliações foram feitas com oligonucleotídeos de seqüência aleatória *primers* obtidos comercialmente da empresa Life Technology. Cada reação de amplificação em um volume final de 10 $\mu$ l continha: 3mM MgCL<sub>2</sub>, 200 $\mu$ l de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, CTP, dGTP, dTTP), 0,32 $\mu$ l do *primer*, tampão, 0,25 unidades de Taq DNA polimerase e 1 $\mu$ l de DNA dos isolados. Controles foram feitos pela substituição da solução do DNA genômico por água (Figura 2).

Yamazaki *et al.*,(1997b) testaram a capacidade de 42 *primers* em gerar marcadores moleculares do tipo RAPD, entre o DNA do *A.acidoterrestis* DSM 2498 e de algumas bactérias por eles isoladas. Apenas 3 *primers* demonstraram adequada similaridade entre a cepa padrão e seus isolados. Estes *primers* foram denominados de *Primer 1*, *Primer 2* e *Primer 3* (Tabela 3), e utilizados em nosso estudo. Das 90 cepas isoladas do suco de maracujá e caracterizadas

presuntivamente como *B.acidoterrestris*, escolheu-se 16 cepas mais significativas para serem utilizadas nas reações de RAPD(Tabela 5).

**Tabela 5:** *Primers* utilizados nas reações de RAPD, segundo Yamazaki *et al.*,(1997b).

<i>Primer</i>	Seqüência 5' – 3'
1	AACGGGCAAC
2	CCTGTGATGGGC
3	GCCGCGCCAGTA

As reações de amplificação foram repetidas pelo menos 2 vezes e realizaram-se em termociclador Perkin-Elmer, modelo 2400. As reações seguiram o programa descrito por Yamazaki *et al.*,(1997): desnaturação inicial a 94°C por 15s ; 50 ciclos de: 94°C por 4s, 45°Cpor 8s, 72°C por 40s e uma extensão final de 72°C por 3 min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,4%, contendo 10mg/ml de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (TRIS-EDTA-ácido bórico). Foi utilizado como padrão de tamanho de banda o marcador de 500 pares de bases (DNA Ladder-GIBCO-BRL). A eletroforese foi conduzida a 120V por 6 h. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com câmera Polaroid, filme Kodak 667, usando filtro laranja, tempo de exposição de 1 segundo e abertura de diafragma de 5,6.

#### **4.2.10.2.4. Análise dos perfis dos produtos de RAPD.**

Com base na presença ou ausência de fragmentos de DNA dos isolados amplificados pelos 3 *primers*, foi obtida uma matriz de dados binários, atribuindo-se 1 para presença de banda e 0 para ausência, estimando-se assim o grau de similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard com a utilização do programa NTSYS (Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 1.70. Mediante a matriz de similaridade genética obtida pelo coeficiente de Jaccard foi feito um dendograma das relações entre as cepas isoladas do suco de maracujá e a cepa padrão *B. acidoterrestris* DSM2498, empregando-se o método de agrupamento UPGMA ( Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average ) no programa NTSYS versão 1.70 (Willians *et al.*, 1990).

#### **4.2.11. Determinação da Resistência Térmica dos esporos das cepas isoladas do suco de maracujá e identificadas como *Alicyclobacillus acidoterrestris*.**

Das cepas isoladas do suco de maracujá e identificadas como *A. acidoterrestris* pela técnica do RAPD, foram escolhidas 3 (cepas 4, 6 e 7) por apresentarem elevada similaridade genética com a cepa padrão DSM 2498. O ensaio de resistência térmica também foi feito para a cepa padrão *A. acidoterrestris* DSM 2498, no suco de maracujá.

##### **4.2.11.1. Determinação do Atraso Térmico para Cálculo dos Parâmetros de Resistência Térmica pelo Método do Tubo TDT**

O atraso térmico foi medido para as temperaturas ensaiadas na resistência térmica dos esporos em suco de maracujá: 87,90 e 95<sup>0</sup>C. Foi utilizado um

termopar tipo T cobre-constantan Omega Eng. N. ° 36, flexível, previamente calibrado.

O termopar foi inserido no tubo TDT de 6,0mm de diâmetro interno e 8,0mm de diâmetro externo e 105mm de comprimento, por um orifício feito no seu fundo, que depois foi selado com silicone e Durepoxi. Para que a junta quente não encostasse na parede do tubo, o termopar foi ajustado com muito cuidado e centrado. Após secar a vedação, o tubo foi preenchido pela outra extremidade com o suco de maracujá inoculado com os esporos numa concentração de  $10^7$  UFC/ml. O mesmo tipo de tubo TDT foi utilizado no ensaio de resistência térmica.

O tubo TDT, então, foi selado com maçarico em sua outra extremidade. Inverteu-se o tubo para que a extremidade do tubo selada com o maçarico tornasse, então, o fundo do tubo. Dessa forma, a junta quente do termopar estaria localizada no centro do tubo. Os dados de temperatura foram medidos por um aparelho calibrador milivoltímetro Omega Eng. Modelo “CL 511”.

Foi medido o tempo necessário para que o suco de maracujá contendo esporos atingisse a temperatura do tratamento térmico. O atraso térmico foi adicionado aos tempos reais de inativação térmica dos esporos nos ensaios de resistência térmica.

#### **4.2.11.2. Determinação da Resistência Térmica dos Esporos em Suco de Maracujá**

A determinação da resistência térmica dos esporos foi efetuada pelo método do tubo TDT em banho de água.

Para obter os parâmetros de resistência térmica em suco de maracujá, valores D (minutos) e Z (°C), foram ensaiadas três temperaturas ( 87, 90 e 95°C). Para cada temperatura, foram testados cinco tempos distintos, além do tempo inicial (zero). Somente para o tempo inicial (zero), foi dado o choque térmico de ativação de 70°C/20min, nos esporos, previa á quantificação.

Foram distribuídos 0,2 ml da suspensão de esporos ( $10^7$  UFC/ml) e 1,8 ml do suco de maracujá, previamente esterilizado em cada um dos tubos TDT (8,0 mm diâmetro externo; 6,0 mm de diâmetro interno a 105 mm de comprimento), que foram selados com maçarico. Os tubos TDT foram submetidos ao tratamento térmico, em banho de água à temperatura controlada. Aos tempos de tratamento térmico dos esporos, foram acionados os respectivos tempos de atraso térmico. Por fim, os tubos foram levados ao resfriamento imediato em banho de gelo, até temperatura ambiente.

Além da contagem inicial ( tempo "0"), foram determinados os sobreviventes após os 5 períodos de aquecimento. Para cada período de aquecimento foram utilizados 2 tubos TDT e a contagem de sobreviventes foi efetuada em placas de ágar BAM , pelo método de profundidade, em duplicata. As placas foram incubadas a 50°C por um período de 7 dias.

Com os dados obtidos, foram graficados o logaritmo do número de sobreviventes versus o tempo de aquecimento real nas temperaturas estudadas e, em seguida, foi realizada regressão linear dos dados, pelo Microsoft Excel, para determinação dos valores de D. Para obtenção do valor de Z, foram graficados os logaritmos de D versus as temperaturas ensaiadas e realizada a regressão linear dos dados, também pelo Microsoft Excel.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Quantificação dos esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498 viáveis presentes na suspensão:

A quantificação de esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498, viáveis, presentes na suspensão foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade em ágar BAM, com incubação a 50°C até contagem constante. O resultado médio das contagens obtidas foi de  $3,0 \times 10^7$  UFC esporos/ml de suspensão, a qual foi utilizada como padrão durante todo o trabalho. Para a cepa 4, o resultado obtido foi de  $1,7 \times 10^7$  esporos/ml, para a cepa 6, foi de  $2,4 \times 10^7$  esporos/ml e para a cepa 7 foi  $1,2 \times 10^7$  esporos/ml.

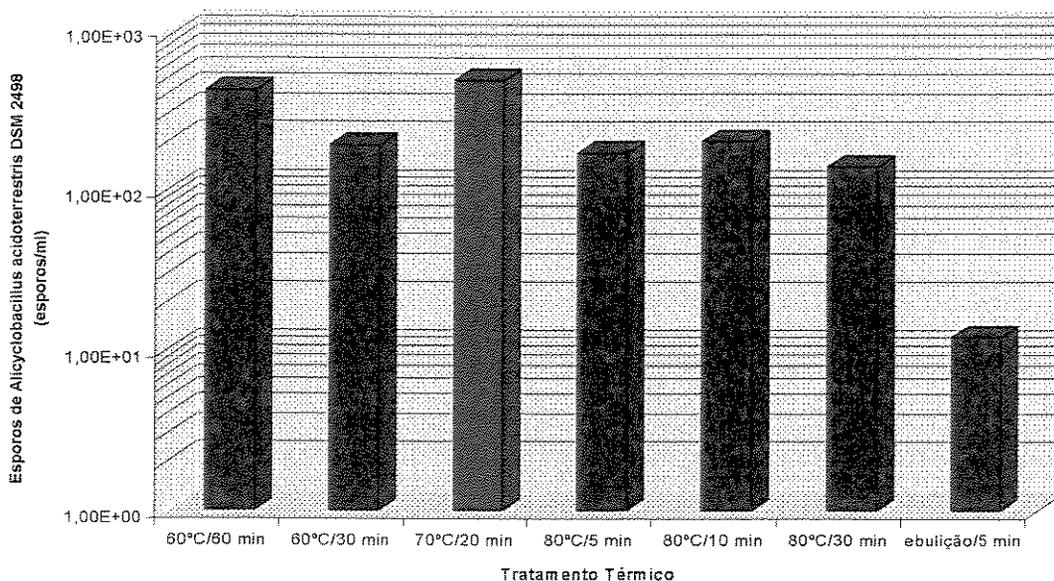
### 5.2. Determinação das condições ótimas de tempo e temperatura para ativação dos esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498.

O *A. acidoterrestris* possui esporos com elevada resistência térmica, sobrevivendo ao tratamento de pasteurização usualmente empregado nas indústrias de suco, permanecendo em estado dormente neste alimento. Faz-se necessário uma ativação quando deseja-se isolar e/ou enumerar os esporos deste organismo que porventura estejam presentes.

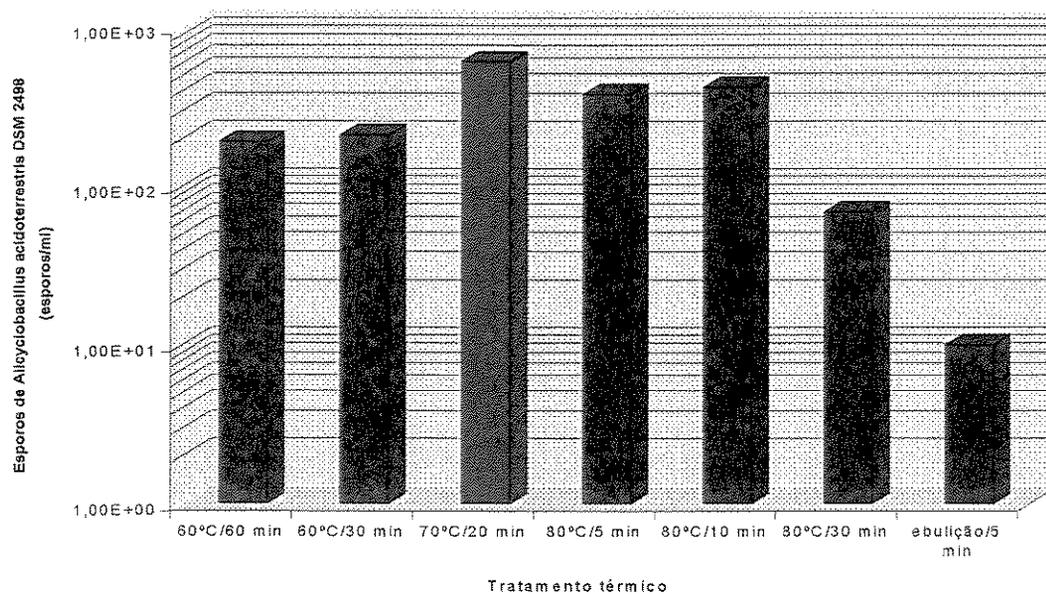
A ativação do esporo é um fenômeno físico, provavelmente relacionado a reconfiguração molecular, e os tratamentos responsáveis pela ativação são a ionização, radiação, agentes redutores, pH extremo e mais comumente o calor, onde é portanto denominada de ativação térmica.

No estudo da determinação das condições ótimas de tempo e temperatura para ativação dos esporos de *A. acidoterrestis* DSM 2498, em suco de abacaxi e suco de maracujá os resultados obtidos estão contidos no Figura 2 e Figura 3, respectivamente. Os resultados correspondem às médias das contagens em triplicadas.

Dos resultados obtidos na Figura 2, foi observado que o tratamento de ativação a 70°C / 20 min foi ligeiramente melhor para os esporos de *A. acidoterrestis* DSM 2498 em suco de abacaxi, seguido pelo binômio 60°C/ 60 min. Splittstoesser et al (1994) observaram que o tratamento térmico de 60°C / 60 min foi o que apresentou melhores resultados para a ativação de esporos de *A. acidoterrestis* inoculados em diferentes sucos de frutas.



**Figura 2.** Contagem de esporos de *A. acidoterrestis* DSM 2498 em suco de abacaxi pH 3,9 após choque térmico, em ágar BAM com incubação a 50°C por 7 dias. Os resultados correspondem as médias das triplicatas.



**Figura 3.** Contagem de esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 em suco de maracujá pH 3,7 após choque térmico, em ágar BAM com incubação a 50°C por 7 dias. Os resultados correspondem as médias das triplicatas.

Na Figura 3, onde estão os resultados dos ensaios em que foi utilizado o suco de maracujá como meio de aquecimento para os esporos, os tratamentos térmicos que se mostraram mais eficientes foram os de 70°C/20 min e 80°C/10 min. Observando que as contagens obtidas com o binômio 70°C/20 min foram ligeiramente superiores as obtidas com o binômio 80°C/10 min, o primeiro tratamento foi considerado como o melhor. Estes resultados são os mesmos encontrados por Eiroa *et al.*, (1999), que conseguiram uma melhor recuperação dos esporos experimentalmente inoculados em suco de laranja integral, quando utilizou como tratamento de ativação 70°C/ 20 min. Também Jensen (2000), considera este binômio como o melhor para a ativação de esporos em diferentes produtos ácidos.

O choque térmico a 80°C/10min, também apresentou resultados relativamente satisfatórios para a ativação dos esporos inoculados no suco de maracujá. Pettipher *et al.*,(1997), Pinhatti (1999), Walls & Chuyate (2000b) e Pettipher & Osmundson (2000), relataram que quando foi utilizado este binômio, resultou-se num aumento da contagem de esporos de *A. acidoterrestris*. Somente Silva *et al.*,(1999) observaram que as contagens de suspensões de esporos ativadas a 80°C /10 min e não ativadas foi similar.

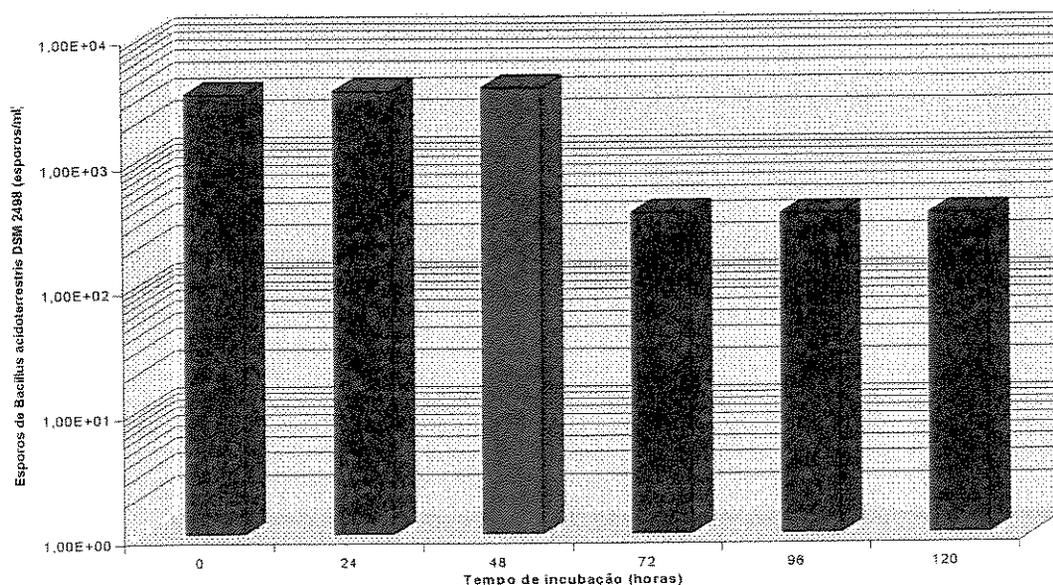
A ativação térmica é utilizada por diversos autores, onde diferentes binômios tempo / temperatura são empregados. Splitstoesser *et al.*,(1998) utilizando o binômio de ativação 60°C/30min obtiveram o dobro da contagem de células viáveis, o que indicou que cerca de 50% dos esporos estavam em estado dormente, necessitando ativação para germinar.

Pode-se considerar que a diferença entre os tratamentos de ativação empregados é provavelmente arbitrária e dependente do meio de aquecimento. No entanto alguma forma de ativação é necessária.

### **5.3.Determinação do tempo de enriquecimento ótimo para amostras de suco de maracujá e de abacaxi contaminados experimentalmente com esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498.**

O tempo de incubação da amostra na fase de enriquecimento em caldo BAM é um parâmetro importante para a recuperação dos esporos de *A. acidoterrestris* que porventura estejam presentes nos sucos de maracujá e abacaxi.

Nas Figuras 4 e 5, podem ser observados os resultados dos experimentos de determinação do tempo de enriquecimento ótimo para amostras de suco de maracujá e de abacaxi, respectivamente, contaminadas experimentalmente com esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 e posterior incubação a 50°C.



**Figura 4.** Contagem de esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 após ativação a 70°C/20 min em suco de maracujá pasteurizado durante o enriquecimento a 50°C por 120 h, em ágar BAM (pH 4,5).

Dos resultados obtidos na Figura 4, pode-se dizer que o melhor período de enriquecimento para contagem dos esporos em suco de maracujá foi de 48 horas, já que a partir do terceiro dia de, a população começou a decrescer.

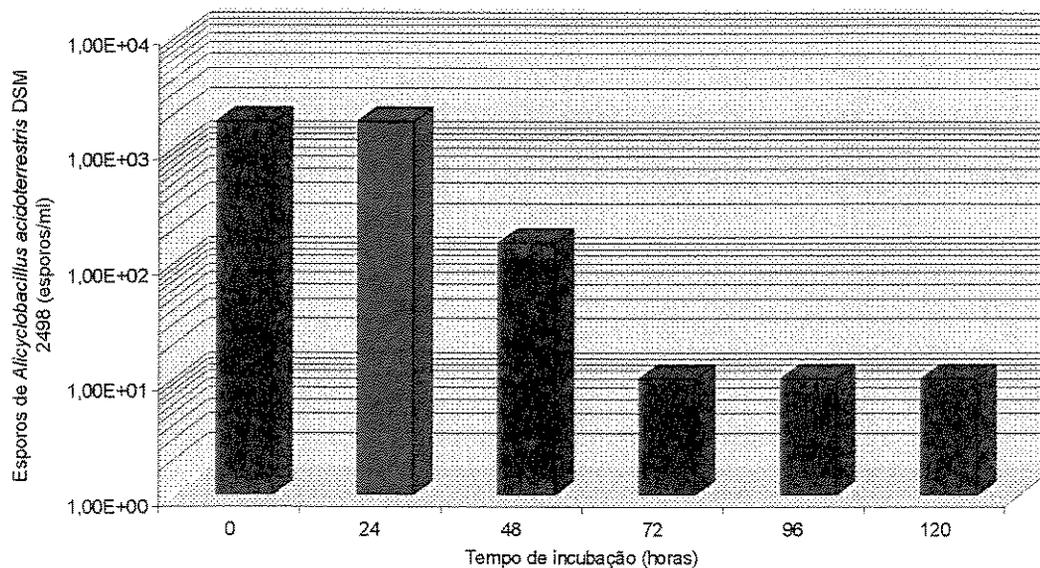
Diferentes autores utilizaram a técnica de enriquecimento da amostra para a detecção de *Alicyclobacillus* em alimentos. Cerny *et al.*,(1984) quando isolaram este organismo de sucos reconstituídos, primeiramente promoveram o enriquecimento da amostra em caldo BSSA para posterior plaqueamento em ágar BSSA. A mesma metodologia foi utilizada por McIntyre *et al.*,(1995) onde o meio de enriquecimento foi o Caldo *Thermoacidurans*.

Os resultados obtidos nesta pesquisa para suco de maracujá, vem confirmar o que foi descrito por autores como Eiroa *et al.*,(1999) que também utilizaram como tempo de enriquecimento de amostras de suco de laranja o período de 48 horas, pois este oferecia melhores condições de recuperação de esporos. Este mesmo período de enriquecimento foi utilizado por Walls & Chuyate (2000b), quando isolaram *Alicyclobacillus* de amostra de sucos de frutas.

Alguns autores consideram que este período de enriquecimento é extremamente necessário para permitir o desenvolvimento dos organismos que estejam presentes. Pettipher & Osmundson (2000) sugeriram um método de detecção (presença / ausência) de *A. acidoterrestris* em alimentos, considerando que um período de enriquecimento da amostra, em água destilada estéril, de 48 horas é o ideal para permitir o desenvolvimento destes organismos, para posteriormente fazer o isolamento em placas com ágar seletivo. Os autores consideram que a sensibilidade deste método é grande, podendo detectar 1 célula / ml de suco concentrado ou por 100 ml do produto final.

Na Figura 5, correspondente aos resultados do ensaio em que foi utilizado o suco de abacaxi, o período de enriquecimento que demonstrou ser mais satisfatório foi a 24 horas. Após 48 horas, houve uma acentuada redução da população. Acredita-se que esta redução possa ter ocorrido no suco de abacaxi, pois este não é um substrato ideal de crescimento para *Alicyclobacillus*, como já observado por diversos autores ( Splittstoesser,1995: Walls & Chuyate 2000b).

Os resultados obtidos nesta pesquisa para o suco de abacaxi são os mesmos observados por Pinhatti (1999) para suco de laranja concentrado. Este mesmo autor acredita que o ciclo de crescimento do *A. acidoterrestris* é bastante rápido, justificando assim o período de enriquecimento relativamente curto, de 24 horas. Porém Silva *et al.*,(1999) e Walls & Chuyate (2000b) consideram que este organismo tem um ciclo de crescimento bastante longo, sendo necessário um período de enriquecimento de no mínimo 48 horas.



**Figura 5.** Contagem de esporos de *A.acidoterrestris* após ativação a 70° C / 20 min em suco de abacaxi pasteurizado e incubado a 50°C por 120h, em ágar BAM (pH 4,5).

#### **5.4. Isolamento de *Alicyclobacillus* a partir de amostras de sucos comerciais pasteurizados de abacaxi e maracujá.**

Foram isoladas um total de 90 cepas de bactérias esporogênicas termoacidófilas, sendo todas provenientes do suco de maracujá (Tabela 6). Não ocorreu nenhuma amostra positiva para o suco de abacaxi.

As amostras de suco de maracujá que apresentaram positividade para *Alicyclobacillus* não apresentavam evidências sensoriais de deterioração. É importante observar que a incidência desta bactéria não está diretamente relacionada com a deterioração. Sua presença nem sempre está associada a alterações no produto. A detecção de *Alicyclobacillus* em sucos de frutas não deteriorados, também por outros autores como Prevedi et al (1995), Eiroa et al., (1999) e Pinhatti (1999), Walls & Chuyate (2000a) sugerem que a deterioração pode ser incidental, requerendo condições adequadas para o seu desenvolvimento.

Observou-se lotes do suco de maracujá com alta porcentagem de amostras presuntivamente positivas para a presença de *Alicyclobacillus*, como no caso dos lotes E e F que apresentaram 100 % de amostras positivas. Os lotes G, I, e J apresentaram também elevada porcentagem de amostras positivas. Em outros lotes não foram evidenciados esporos de bactérias suspeitas de ser *Alicyclobacillus* (Lotes A, B, C, H, K e L). Mesmo assim, nos lotes com elevada positividade de amostras a contagem de esporos termoacidófilos nestas, foi baixa, variando o NMP/100ml, entre 1,1 e >23. O limite de detecção de esporos do método foi 1,1 NMP/100ml (Tabela 6).

**Tabela 6:** Ocorrência de esporos de bactérias esporogênicas termoacidófilas em amostras de suco de maracujá comercial pasteurizado, extraído em diferentes épocas do ano.

Época do ano	Lote	Amostras examinadas (nº)	Cepas Isoladas (nº)	Amostras positivas		Esporos termoacidófilas (NMP/100 ml)
				nº	%	
março	A	4	0	0	0	< 1,1
abril	B	4	0	0	0	< 1,1
abril	C	4	0	0	0	< 1,1
maio	D	5	1	1	20	1,1
junho	E	5	45	5	100	9,2; 16,1; >23; >23, >23
junho	F	5	39	5	100	>23; 6,9; 12,0; >23; 16,1
julho	G	5	2	1	20	2,2
julho	H	5	0	0	0	< 1,1
julho	I	5	2	2	40	1,1; 1,1
agosto	J	5	2	2	40	2,2; 1,1
agosto	K	5	0	0	0	< 1,1
agosto	L	5	0	0	0	< 1,1
TOTAL		57	90	16	28,1	

Todas as cepas isoladas, provenientes do suco de maracujá, tinham a propriedade de apresentar no meio de crescimento forte odor desagradável característico, adstringente e levemente ácido.

O aspecto das colônias foi bastante similar entre todas elas. Estas apresentaram-se com cor creme, translúcidas a opacas, com bordas lisas a ligeiramente irregulares, com diâmetro variando de 2 a 4 mm. Todas as cepas apresentaram semelhanças macroscópicas, porém puderam ser reunidas em 2 grupos diferentes devido a algumas variações nas características microscópicas. Assim, 10 cepas apresentaram esporos ligeiramente arredondados e maiores, com localização central, dentro do esporângio ligeiramente dilatado, e 80 cepas caracterizaram-se por possuírem esporos cilíndricos, sub-terminais com esporângio dilatado ( Anexo 1).

A seguir foram escolhidas 16 culturas contendo isolados representativos dos dois grupos que apresentaram características similares, para determinar o perfil bioquímico.

Observa-se que nos meses de junho e julho ocorreu uma maior incidência de esporos de termoacidófilas nas amostras de suco de maracujá, seguido pelo mês de agosto. Esta elevada positividade pode ser devido a que estes meses são caracterizados pelo clima seco, onde devido ao baixo índice pluviométrico, ocorra um acúmulo de poeira, e sabendo-se que o solo é o habitat natural dos *Alicyclobacillus*, estes possam ficar depositados nas superfícies das frutas, principalmente o maracujá que apresenta uma superfície bastante rugosa. Resultados semelhantes foram relatados por Eguchi *et al.*,(2001c), quando observaram que frutas colhidas imediatamente após um dia chuvoso ou em

estações chuvosas apresentaram contagens significativamente menores de esporos de bactérias termoacidófilas, quando comparada com as contagens das frutas coletadas nas estações de ausência de chuva. Estes resultados apontam que a principal fonte de contaminação dos *Alicyclobacillus* nas indústrias é a própria fruta e um sistema eficiente de lavagem e sanificação das mesmas poderia reduzir o número deste organismo já nas primeiras etapas de processamento dos sucos.

O uso de sanificantes, como o cloro ou o cloreto de sódio inativam em parte os esporos presentes na superfície das frutas, porém devido a inacessibilidade dos esporos, geralmente localizados nas fissuras e rugosidades, em particular do maracujá, e sabendo-se que a superfície das frutas é hidrofóbica, ocorre uma proteção natural aos esporos contra o contato com as soluções aquosas dos sanificantes. Doyle (1999) e Orr & Beuchat (2000) sugerem o uso de solventes ou surfactantes em conjunto com os sanificantes e uma operação de lavagem mais vigorosa das frutas para melhorar a ação dos sanificantes em inativar os esporos.

Nenhum isolamento ocorreu a partir das amostras de suco de abacaxi. Os resultados obtidos para este suco estão de acordo com as observações realizadas por Splittstoesser *et al.*, (1995) e por Walls & Chuyate (2000b). Estes autores inocularam uma população conhecida de esporos de *A acidoterrestris* em diferentes sucos comerciais, incluindo o de abacaxi com pH 3,8 e 13,4°Brix, para Splittstoesser *et al.*, (1995), ou pH 3,61 e 13,0°Brix para Walls & Chuyate (2000b). Nos dois estudos realizados foi constatado o crescimento desta bactéria na maioria dos sucos. O mesmo não ocorreu para o suco de abacaxi, ou sucos que continham abacaxi na formulação onde foi observado um decréscimo da população. As características do suco de abacaxi estudado nesta pesquisa onde

tentou-se isolar *Alicyclobacillus* são semelhantes as características dos sucos estudados pelos autores citados, ou seja, pH 3,8 e 12°Brix.

Mcintyre *et al.*,(1995), relatam que a sobrevivência e a capacidade de germinação dos esporos em sucos, depende da sua concentração inicial e principalmente da característica do suco em que se encontra. Podem ocorrer inibidores naturais no produto (ex: benzaldeído em óleo de laranja; compostos fenólicos em uvas ) prevenindo ou retardando o crescimento nos sucos.

Ainda Splittstoesser *et al.*,(1995) investigando a razão de porque só ocorrer o crescimento de *A. acidoterrestres* em suco de uva branco e não em suco de uva vermelho, constataram que o fator inibitório neste suco era devido a presença de compostos fenólicos provenientes das uvas vermelhas. Algo similar poderia talvez ocorrer para o suco de abacaxi, onde a existência de algum fator inibitório (talvez enzimas como a bromelina) em sua constituição, possa interferir no desenvolvimento do *A. acidoterrestres*, visto que seu pH e sua concentração de sólidos solúveis são compatíveis para o desenvolvimento de bactérias esporogênicas termo-acidófila como os *Alicyclobacillus*. Até o momento não está muito claro o porque certos produtos suportam o crescimento e germinação deste organismo e outros não, e maiores estudos a este respeito necessitam ser conduzidos.

Considerando os resultados dos ensaios para determinação do tempo ótimo de enriquecimento a 50°C de esporos de *A. acidoterrestres* DSM 2498 em suco de abacaxi (Figura 5), onde foi constatado decréscimo da população da bactéria, o isolamento de esporos termo-acidófilos a partir deste suco, poderia não ter sido executado. Porém o experimento foi realizado, visto que o mesmo seria realizado

em meio BAM onde o suco de abacaxí estaria diluído. Também foi contemplada a possibilidade da ocorrência de um número elevado de esporos em abacaxí que poderiam vir a ser detectados.

Como é sabido, os *Alicyclobacillus* sobrevivem ao processo de pasteurização usualmente empregado para sucos de frutas. Porém o seu crescimento nos meios de cultura é bastante vagaroso ( Walls & Chuyate, 1998), podendo não ser detectado durante os testes de rotina em laboratórios de controle de qualidade. Este organismo representa um novo desafio para as indústrias processadoras de suco, onde a qualidade destes produtos poderia ser inicialmente avaliada pela presença de *Alicyclobacillus*.

#### **5.5. Identificação bioquímica das cepas isoladas do suco de maracujá pelo sistema API CH 50.**

Não foram obtidos resultados satisfatórios com o uso do sistema API CH 50, pois não foram observadas variações nítidas na viragem do indicador. Somente foi possível agrupar as cepas em subgrupos com perfil bioquímico semelhantes.

A identificação bioquímica de isolados provenientes de alimentos ácidos pelo uso do sistema API CH 50 foi utilizada por diferentes autores. Prevedi *et al.*, (1995) caracterizando 4 isolados provenientes de sucos de frutas, não conseguiram obter um perfil bioquímico que apresentasse semelhanças entre eles. Estes autores consideram que o sistema API CH 50 oferece resultados difíceis de serem interpretados, e que a execução do teste é bastante laboriosa.

Também Petthipher *et al.*,(1997), observaram resultados pouco consistentes quando utilizaram o sistema tanto a 37°C como a 44°C. Estes resultados estão de acordo com as observações de Eiroa *et al.*,(1999), trabalhando com a identificação de cepas isoladas de bactérias termoacidófilas isoladas de suco de laranja. Este método não foi considerado apropriado para a identificação de *A. acidoterrestris*.

### **5.6. Determinação da Similaridade Genética pela Reação de RAPD.**

Os padrões de bandas (presença e ausência) foram utilizados para determinar o grau de similaridade genética entre as cepas isoladas do suco de maracujá e o *A. acidoterrestris* DSM2498.

Sómente o *Primer 1* e o *Primer 2* amplificaram o DNA dos isolados (Figura 6 e Figura 7), o mesmo não ocorrendo para o *Primer 3*.

Agrupando-se os dados obtidos pela amplificação com o *primer 1* e com o *primer 2*, obteve-se um dendograma, conforme a Figura 8. Considerando 0,20 de similaridade, podemos dividir os isolados em 2 grandes grupos. Um grupo contendo 2 cepas padrão de *A. acidocaldarius* (n°17 e n°18) e 1 cepa padrão de *A. cycloheptanicus* (n°19), e outro grande grupo envolvendo as demais cepas, onde neste grupo existem isolados com 95% de similaridade genética com a cepa padrão *A. acidoterrestris* DSM 2498 (n°20 e n°21) como é o caso dos isolados n° 2,8, 9,11,12,13. Os isolados 4,6 e 7 apresentaram uma similaridade genética com a cepa padrão DSM em torno de 99%. A menor similaridade genética com a cepa padrão foi observada para as cepas n°10 e 15 (aproximadamente 60%).

Nove das 43 cepas isoladas do lote E, foram submetidas ao RAPD. Destas, as cepas 4, 6, e 7 (isolados 14, 25 e 27; Anexo 1), apresentaram uma similaridade genética muito alta com a cepa padrão DSM 2498, em torno de 99%. Os sucos provenientes do lote E apresentaram elevada incidência de bactérias termoacidófilas (Tabela 6). Estes sucos foram extraídos no mês de julho, época do ano que ocorre escassez de chuva, favorecendo o acúmulo de poeira e solo nas frutas, favorecendo assim a presença de esporos de *A. acidoterrestris* nas superfícies das mesmas. As características macroscópicas destas 3 cepas se apresentaram bastante similares, no entanto a cepa 6 (isolado 25) apresentou características microscópicas um pouco distinta das demais ( Anexo 1).

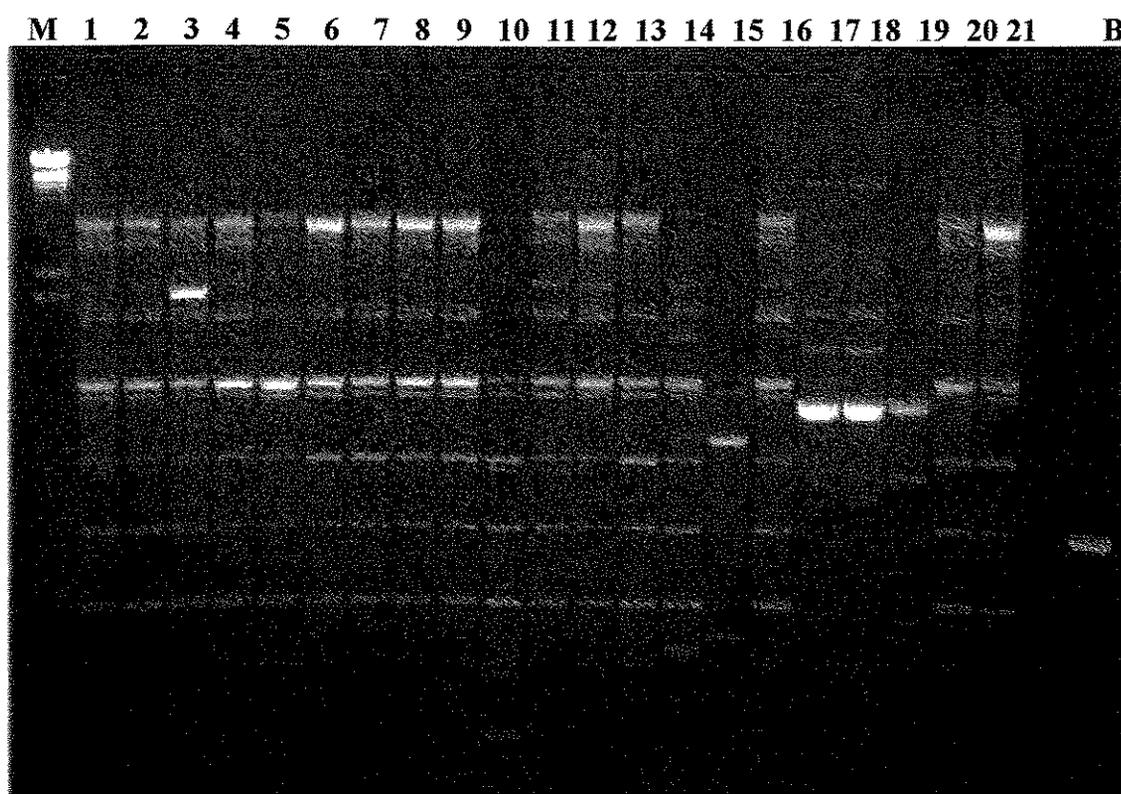
Duas cepas das 39 isoladas do lote F, foram também submetidas ao RAPD. Destas cepas, a nº 10 (isolado 58 ) apresentou uma baixa similaridade com a cepa padrão DSM 2498, em torno de 70%, já a similaridade da cepa nº11( isolado 59 ), também do lote F foi em torno de 95% .

A Similaridade Genética entre a cepa 12 (isolado 83) , proveniente do lote G e a cepa padrão DSM 2498, foi superior a 95%. Esta cepa nº12, demonstrou como característica microscópica, esporos maiores que os observados para a cepa padrão. Os sucos provenientes deste lote, foram extraídos no mês de julho, um dos períodos do ano em que a incidência de *Alicyclobacillus* foi maior ( Tabela 6).

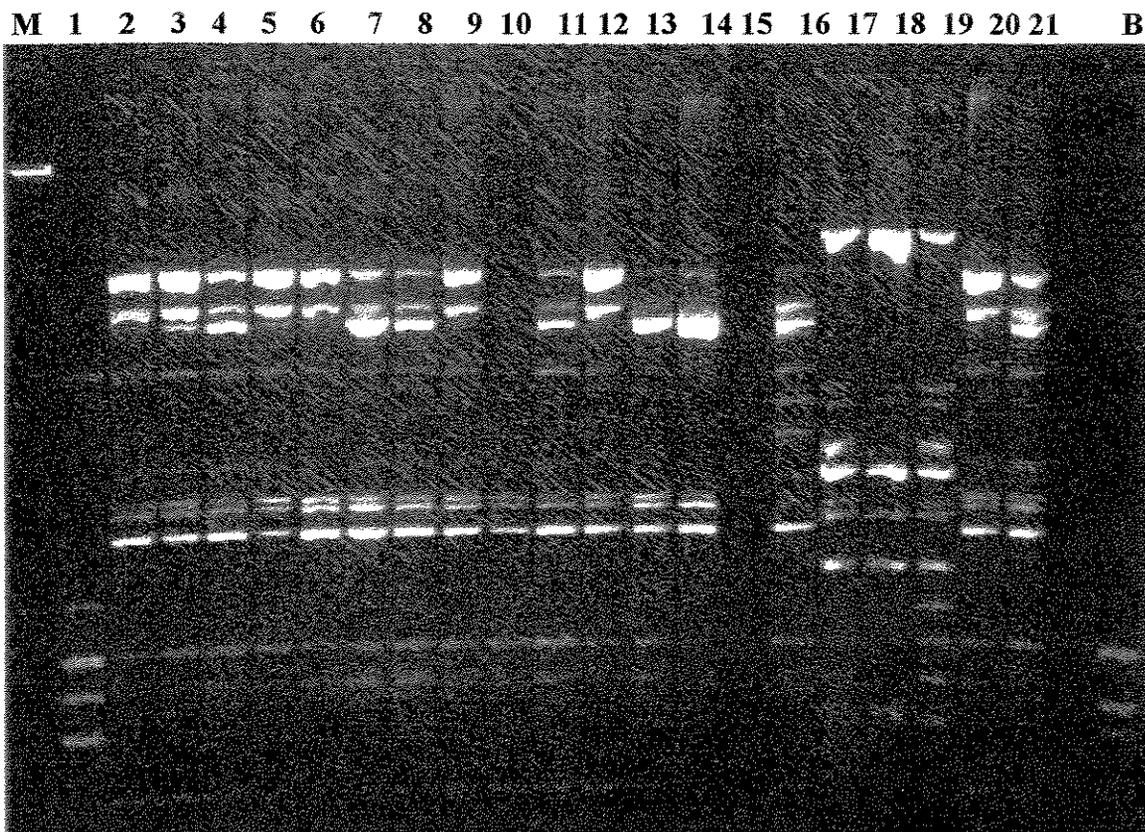
Uma cepa proveniente do lote I, e duas cepas proveniente do lote J foram também examinadas pelo mesmo método. Para a cepa nº 13 (isolado 85), do lote I, foi observada uma similaridade genética com o *A. acidoterrestris* DSM 2498 maior que 95%, e tanto as suas característica microscópicas como as macroscópicas foram bastante semelhantes às da cepa padrão. Para as cepas do lote J, cepa nº14 (isolado 87) e 15 (isolado 88), a similaridade com a cepa padrão

não foi tão alta, sendo que a cepa nº 15 apresentou a menor similaridade dentre todas as cepas estudadas, em relação a cepa padrão, em torno de 60%.

Os valores de Similaridade Genética com a cepa padrão DSM 2498, obtidos pela cepa nº14 (isolado 87), do lote J, e da cepa nº16 (isolado 90), proveniente do lote D, foram semelhantes, próximos de 90%.



**Figura 6.** Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA genômico de 21 cepas com o *Primer 1*. As amostras estão ordenadas da esquerda para a direita conforme estabelecidos na Tabela 4. B. corresponde ao branco da reação e M ao marcados de 500 pares de bases (DNA.Ladder GIBCO – BRL).



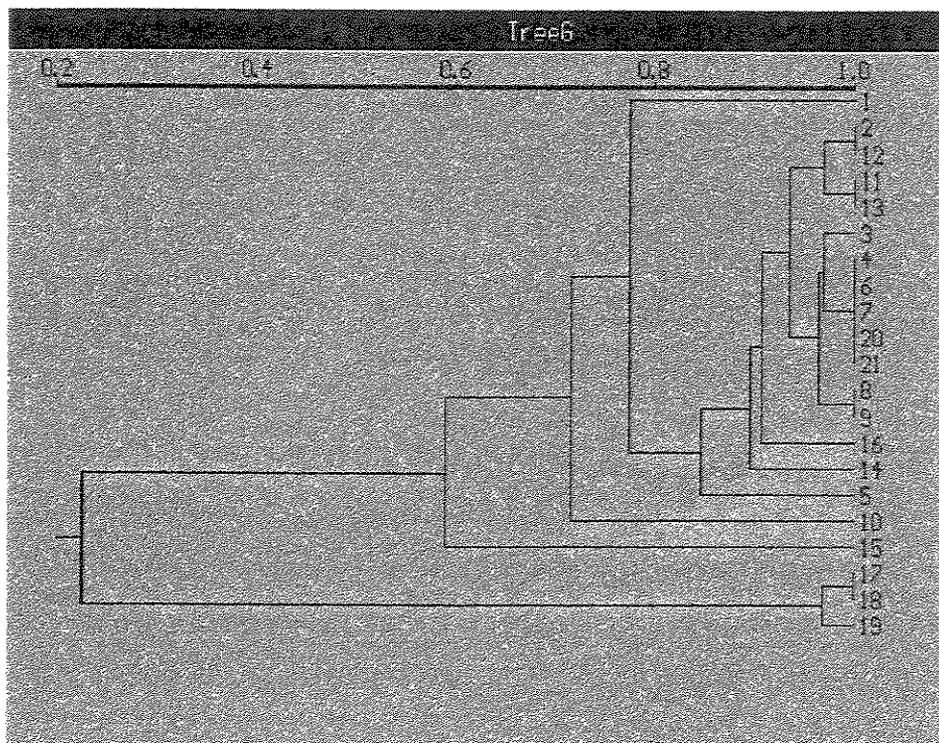
**Figura 7.** Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA genômico de 21 cepas com o *Primer 2*. As amostras estão ordenadas da esquerda para a direita conforme estabelecidos na Tabela 4. B. corresponde ao branco da reação e M ao marcados de 500 pares de bases (DNA.Ladder GIBCO – BRL).

A reação de RAPD aplicada aos isolados das amostras de suco de maracujá, constatou elevada similaridade genética com os esporos do *A. acidoterrestris* DSM 2498, sugerindo serem microrganismos da mesma espécie, pois os *primers* utilizados foram obtidos a partir da região 16S do rDNA, que é uma região altamente conservada para organismos da mesma espécie. Os dados da Figura 8 demonstraram que os isolados do suco de maracujá cepas 1 a 16 (exceto as cepas 10 e 15), apresentaram uma alta similaridade genética com as cepas padrão 20 e 21 de *A. acidoterrestris* DSM 2498, e baixa similaridade

genética com as cepas 17 e 18 de *A. acidocaldarius* e com a cepa 19 de *A. cycloheptanicus*

**Tabela 7:** Grupos e subgrupos de cepas isoladas de suco de maracujá e cepas padrão, com base no dendograma da Figura 8.

Grupo	Subgrupo	Cepa	Origem	
A	I	1	Suco de maracujá	
		2	Suco de maracujá	
		3	Suco de maracujá	
		4	Suco de maracujá	
		5	Suco de maracujá	
		6	Suco de maracujá	
		7	Suco de maracujá	
		8	Suco de maracujá	
		9	Suco de maracujá	
		11	Suco de maracujá	
		12	Suco de maracujá	
		13	Suco de maracujá	
		14	Suco de maracujá	
		16	Suco de maracujá	
		20		<i>B. acidoterrestris</i> DSM 2498
		21		<i>B. acidoterrestris</i> DSM 2498
	II	10	Suco de maracujá	
		15	Suco de maracujá	
B	I	17	<i>B. acidocaldarius</i> CCT 2490	
		18	<i>B. acidocaldarius</i> CCT2490	
	II	19	<i>B. cycloheptanicus</i> CCT4382	



**Figura 8.** Dendrograma obtido pelo agrupamento dos dados de amplificação do DNA de 21 cepas, pelos *Primers* 1 e 2. A identificação completa das cepas encontra-se na Tabela 4.

Yamazaki *et al.*,(1997b), usando esta mesma técnica de RAPD, identificaram como *A .acidoterrestris* algumas cepas provenientes de sucos de frutas no Japão . Estas cepas também apresentavam elevada similaridade genética, em torno de 90%, com a cepa padrão DSM 2498.

**5.7. Determinação do Atraso Térmico em Suco de Maracujá pH 3,5 para Cálculo dos Parâmetros de Resistência Térmica dos esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, pelo Método do Tubo TDT.**

**Tabela 8:** Determinação do atraso térmico para diferentes temperaturas, utilizando suco de maracujá pH 3,5 pelo método do tubo TDT, com auxílio de termopar flexível tipo T cobre-constantan.

Temperatura (°C)	Tempo de atraso térmico (minutos / segundo)
87	1'67"
90	1'36"
95	1'15"

\*Resultados referentes as médias dos atrasos térmicos encontrados.

Os valores médios dos atrasos obtidos para cada temperatura foram utilizados durante os ensaios de resistência térmica, sendo adicionados aos tempos de aquecimentos reais do ensaio.

**5.8. Resistência térmica de esporos identificados como *A . acidoterrestris* e da cepa padrão DSM 2498 em suco de maracujá pH 3,5.**

Os índices de redução decimal (valores de D) de esporos de *A . acidoterrestris* são extremamente variáveis, sendo afetados pelas condições de crescimento deste microrganismo e pelo meio em que os esporos são aquecidos. Neste trabalho foi determinado a resistência térmica de esporos de 3 cepas

identificadas como *A. acidoterrestris* pela técnica do RAPD, e também da cepa padrão DSM 2498, em suco de maracujá pH 3,5 e 12°Brix. Os valores D obtidos em suco de maracujá para a cepa padrão DSM 2498 a 87, 90 e 95°C, foram 19,89; 4,79 e 1,39 minutos, respectivamente ( Tabela 9 ).

**Tabela 9:** Resistência Térmica dos esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 em suco de maracujá p H 3,5.

Temperatura (°C)	Tempo de Aquecimento (min)	Média de Sobreviventes (UFC/ml)	Log do N° de Sobreviventes	D (min)	R <sup>2</sup>
87	0	4,00E+06	6,602	19,9	0,989
	30	3,00E+05	5,477		
	60	2,70E+04	4,431		
	80	1,50E+03	3,176		
	120	1,10E+01	1,041		
90	0	2,50E+06	6,398	4,8	0,979
	5	3,00E+05	5,477		
	10	1,50E+04	4,176		
	15	3,60E+03	3,556		
	20	4,10E+02	2,613		
	25	1,10E+01	1,041		
95	0	3,50E+06	6,544	1,4	0,976
	2	2,50E+05	5,398		
	4	1,60E+04	4,204		
	6	1,20E+03	3,079		
	8	1,00E+01	1		

UFC/ml : Unidades Formadoras de Colônias/ml. Contagem em ágar BAM por plaqueamento em profundidade. Incubação a 50°C/7dias. Os resultados correspondem às médias das duplicatas.

Acredita-se que os *Alicyclobacillus*, principalmente por possuírem como componente celular em sua membrana, o ácido graxo  $\omega$ -ciclohexil undecanóico, possa ser um dos fatores que contribua para sua sobrevivência a baixos níveis de pH e altas temperaturas, e esta estrutura circular auxilia na estabilidade do core e da membrana (Pontius *et al.*, 1998). Devido a estas habilidades , este organismo tornou-se uma grande preocupação para a indústria de sucos de frutas.

Vários autores tem investigado os parâmetros de resistência térmica de *A. acidoterrestris* em tipos diferentes de sucos de frutas. Eiroa *et al.*,(1999) estudando a resistência térmica desta bactéria em sucos de laranja, inoculou uma suspensão de esporos da cepa padrão *A. acidoterrestris* DSM 2498 no suco e obteve os seguintes resultados,  $D_{85^{\circ}\text{C}}=50,0$  min;  $D_{90^{\circ}\text{C}}=16,9$ min e  $D_{95^{\circ}\text{C}}=2,7$ min.

Em um estudo recente, Silva *et al.*,(2000), usando como meio de aquecimento a polpa de cupuaçu ( *Theobroma grandiflorum* ) , determinou a resistência térmica da cepa padrão *A. acidoterrestris*. O estudo foi conduzido a temperaturas entre 85 e 97°C. Verificando os resultados obtidos pelo autor ,  $D_{91^{\circ}\text{C}}=4,57$ min , e comparando aos obtidos no suco de maracujá, nesta pesquisa  $D_{90^{\circ}\text{C}} =4,79$  min, ambos indicam a elevada resistência térmica desta bactéria em produtos ácidos.

Para o ensaio de resistência térmica das 3 cepas identificadas como *A. acidoterrestris*, os resultados obtidos estão nas Tabelas 10, 11 e 12 respectivamente.

**Tabela 10:** Resistência térmica da Cepa 4 em suco de maracujá pH 3,5

Temperatura (°C)	Tempo de Aquecimento (min.)	Média de Sobreviventes (UFC/ml)	Log da média de Sobreviventes	D (min)	R <sup>2</sup>
87	0	3,60E+06	6,556	28,9	0,999
	30	2,50E+05	5,398		
	60	1,20E+03	3,079		
	80	2,20E+02	2,342		
	120	1,00E+01	1		
90	0	6,00E+06	6,778	8,0	0,989
	5	1,90E+06	6,279		
	10	4,00E+04	4,602		
	15	1,10E+04	4,041		
	20	3,30E+03	3,518		
	25	5,00E+02	2,699		
95	0	6,00E+06	6,778	2,0	1,000
	2	1,00E+05	5		
	4	1,00E+03	3		
	6	1,00E+02	2		
	8	1,10E+01	1,041		

UFC/ml : Unidades Formadoras de Colônias/ml. Contagem em ágar BAM por plaqueamento em profundidade. Incubação a 50°C/7 dias. Os resultados correspondem às médias das duplicatas

**Tabela 11:** Resistência térmica da Cepa 6 em suco de maracujá pH 3,5

Temperatura (°C)	Tempo de Aquecimento (min)	Média de Sobreviventes (UFC/ml)	Log da média de Sobreviventes	D (min)	R <sup>2</sup>
87	0	4,10E+06	6,613	20,9	1,000
	30	3,70E+05	5,568		
	60	1,20E+04	4,079		
	80	2,50E+02	2,398		
	120	1,80E+01	1,255		
90	0	3,90E+06	6,591	4,2	0,999
	5	5,10E+05	5,707		
	10	4,50E+04	4,653		
	15	2,10E+03	3,322		
	20	1,20E+02	2,079		
	25	1,00E+01	1		
95	0	5,30E+06	6,724	1,9	0,998
	2	4,20E+05	5,623		
	4	3,80E+04	4,580		
	6	2,10E+03	3,322		
	8	2,00E+02	2,301		
	10	2,30E+01	1,361		

UFC/ml : Unidades Formadoras de Colônias/ml. Contagem em ágar BAM por plaqueamento em profundidade. Incubação a 50°C/7dias. Os resultados correspondem às médias das duplicatas.

**Tabela 12:** Resistência térmica da Cepa 7 em suco de maracujá pH 3,5

Temperatura (°C)	Tempo de Aquecimento (min)	Média de Sobreviventes (UFC/ml)	Log da média de Sobreviventes	D (min)	R <sup>2</sup>
87	0	5,10E+06	6,707	25,7	0,995
	30	4,50E+05	5,653		
	60	3,50E+03	3,544		
	80	4,10E+02	2,612		
	120	1,50E+01	1,176		
90	0	4,10E+06	6,613	4,7	0,990
	5	3,50E+05	5,544		
	10	1,20E+04	4,079		
	15	2,50E+03	3,398		
	20	2,10E+02	2,322		
	25	1,30E+01	1,114		
95	0	3,60E+06	6,556	1,8	1,000
	2	2,40E+05	5,380		
	4	2,10E+04	4,322		
	6	1,60E+03	3,204		
	8	1,20E+02	2,079		
	10	1,00E+01	1		

UFC/ml : Unidades Formadoras de Colônias/ml. Contagem em ágar BAM por plaqueamento em profundidade. Incubação a 50°C/7dias. Os resultados correspondem às médias das duplicatas.

Alguns autores investigaram os parâmetros de resistência térmica de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, porém nenhum a partir de suco de maracujá.

Mcintyre *et al.*,(1995), estudando a resistência térmica de *A.acidoterrestris* isolados de sucos de frutas, usou temperaturas típicas de pasteurização (87,7; 91,1 e 95°C), e com os valores D obtidos verificaram que os esporos de *Alicyclobacillus* podem sobreviver a esses tratamentos térmicos usualmente empregados aos sucos.

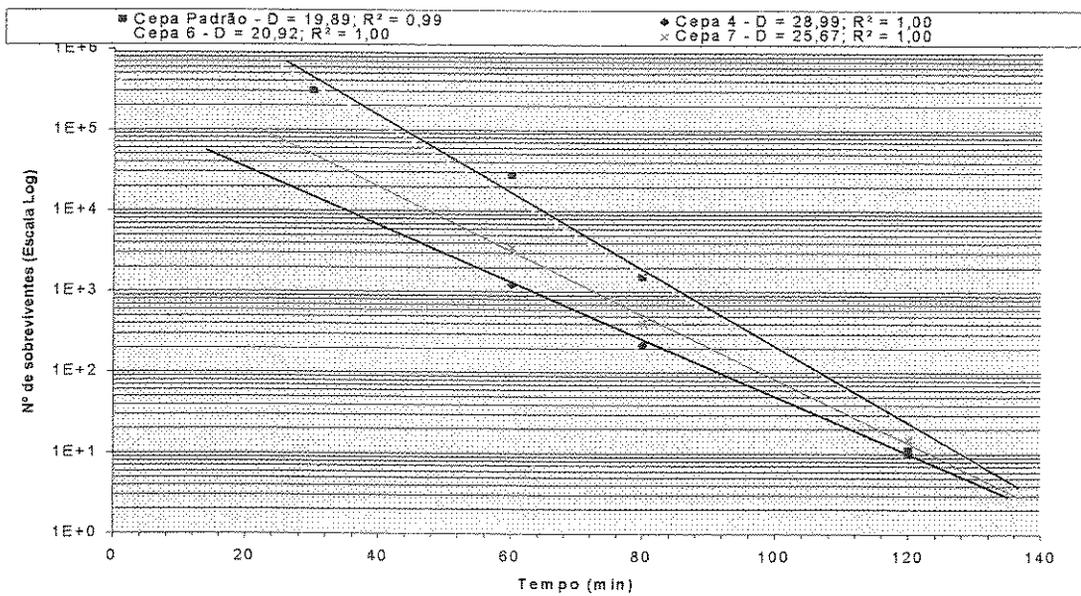
Splittstoesser *et al.*,(1994), em um ensaio semelhante a esta pesquisa, inoculou esporos isolados de sucos comerciais em sucos estéreis e determinou a resistência térmica desses esporos em sucos de uva (pH3,3) e suco de maçã (p H 3,5). As temperaturas utilizadas pelos autores foram : 85, 90, 95°C. Para o suco de uva os valores D obtidos foram 57min; 16min e 2,4min respectivamente. Os resultados obtidos(valores D) para o suco de maçã foram 56 min; 23min e 2,8min. Comparando-se os resultados desta presente pesquisa com os acima citados , verifica-se que tanto a cepa padrão DSM 2498 como as cepas isoladas do suco de maracujá possuem uma resistência térmica menor do que a obtida por Splittstoesser *et al.*,(1994). Isto poderia ser atribuído ao meio de aquecimento dos esporos, que nos dois ensaios foram diferentes, ou seja suco de uva ou maçã e suco de maracujá.

Pontius *et al.*,(1998) também observaram que a resistência térmica das cepas de *A . acidoterrestris* por eles estudadas foi maior que a relatada quando estas mesmas cepas foram usadas em um estudo conduzido por Splittstoesser *et al* (1998), pois o meio de esporulação usado nas pesquisas de Pontius *et al* (1998) foi o PDA pH 5,6 e o meio de esporulação para o estudo de Splittstoesser foi PDA pH 3,5.

Pelos resultados aqui obtidos e comparando-os com os de diferentes autores, torna-se claro que a diferença nos valores D obtidos para uma mesma

cepa reflete nas diferenças das condições de esporulação e no efeito do meio de aquecimento.

Na Figura 9, pode ser observada a curva de sobrevivência das cepas identificadas como *A. acidoterrestreis* e da cepa padrão DSM 2498, em suco de maracujá com pH 3,5 e temperatura de 87°C.

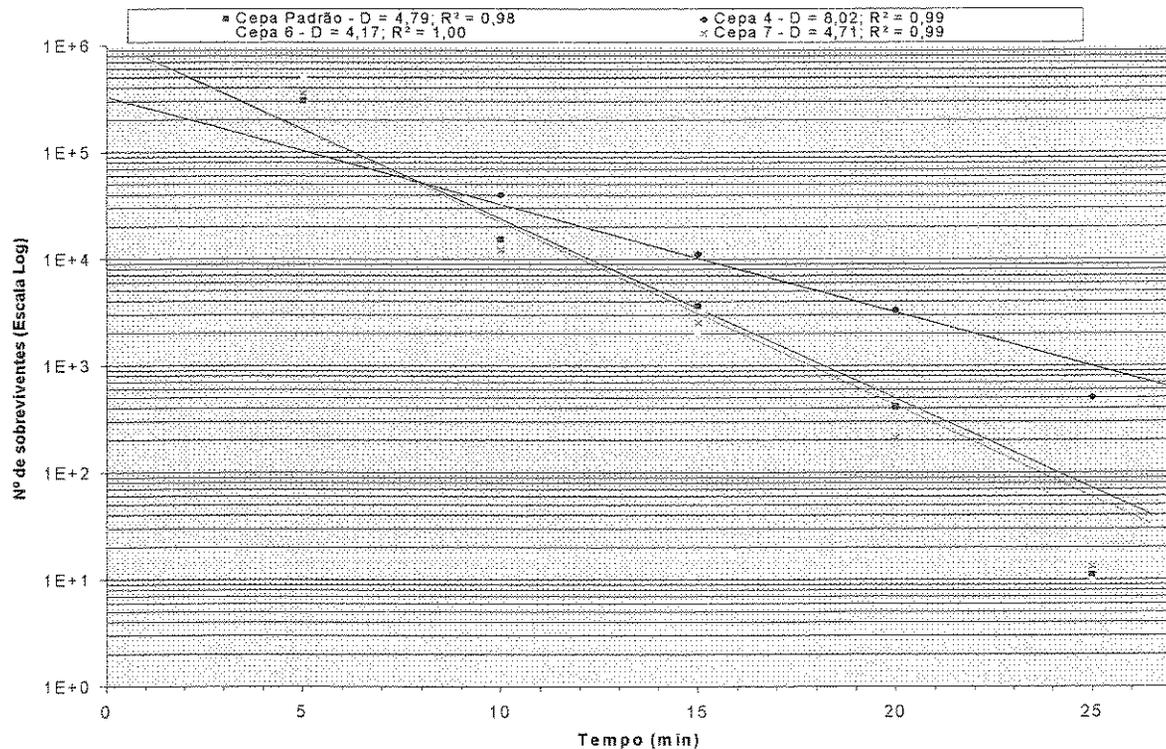


**Figura 9.** Curva de sobrevivência das cepas identificadas como *A. acidoterrestreis* e da cepa padrão DSM 2498 em suco de maracujá com pH 3,5 e temperatura de 87°C.

De acordo com a Figura 9, observamos que a cepa mais resistente é a cepa 4, isolada de suco de maracujá, seguida da cepa 7, da cepa 6 e por fim a cepa padrão, quando a temperatura utilizada foi 87°C.

Todas as cepas demonstraram um comportamento logarítmico com relação ao tempo de aquecimento a temperatura constante.

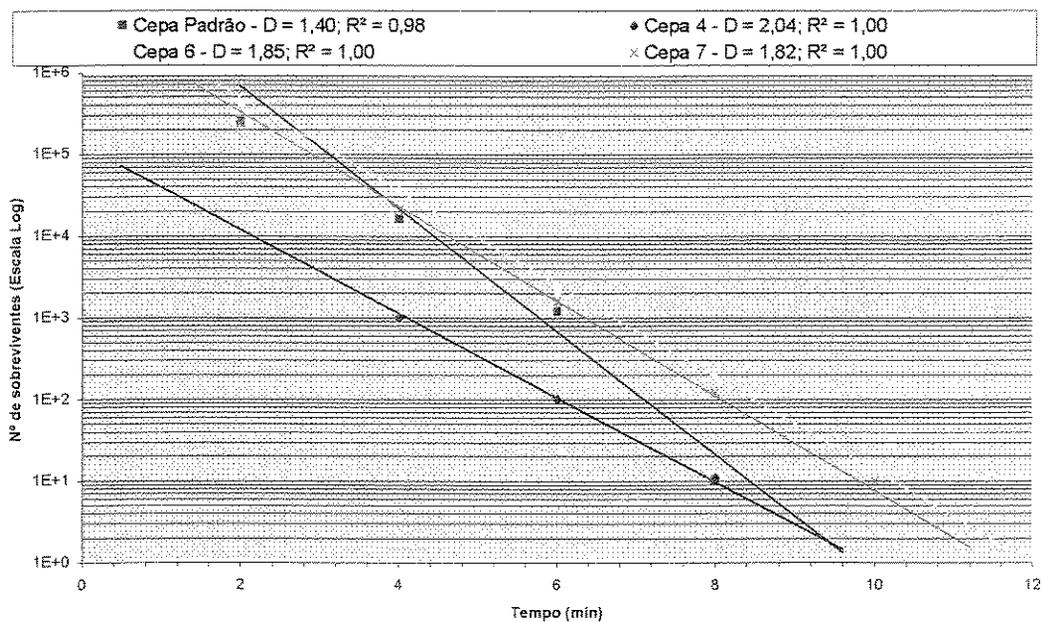
Quando a temperatura de aquecimento dos esporos foi de 90°C, os resultados obtidos, também englobando as cepas estudadas podem ser observados no Figura 10.



**Figura 10.** Curva de sobrevivência das cepas identificadas como *A. acidoterrestris* e da cepa padrão DSM 2498 em suco de maracujá com pH 3,5 e a temperatura de 90°C.

A cepa 4, apresentou a maior resistência térmica á temperatura de 90°C. A cepa padrão e a cepa 7 apresentaram uma resistência a esta temperatura bastante semelhante, com valores  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  4,79 e 4,71min, respectivamente . Nestas condições de temperatura, a cepa 6 apresentou a menor resistência térmica.

Na Figura 11, podemos verificar como as 4 cepas estudadas se comportam em temperaturas de 95°C.



**Figura 11.** Curva de sobrevivência das cepas identificadas como *A. acidoterrestis* e da cepa padrão DSM 2498 em suco de maracujá com pH 3,5 á temperatura 95°C.

Á temperaturas de 95°C, a cepa 4 novamente apresentou maior resistência, seguidas das cepas 6 e 7, sendo que a cepa padrão apresentou a menor resistência entre as cepas testadas.

Splittstoesser et al.,(1998) relata que elevando-se a concentração dos sucos, aumenta-se a resistência térmica dos esporos. Estes resultados mostram que é mais difícil destruir esporos em sucos concentrados do que em sucos integrais. Este mesmo efeito da concentração de sólidos solúveis sobre a resistência térmica dos esporos de *Alicyclobacillus* foi observado por Silva et al.,(1999).

Foi observado por Splittstoesser et al.,(1998 ) que a presença de sulfitos e de ácido ascórbico,que são conservantes geralmente empregados nos sucos de frutas, não afetou a sensibilidade dos esporos de *A. acidoterrestris* ao calor quando utilizado o suco de uva como meio de aquecimento. Porém Komitopoulou et al.,(1999) observaram que a nisina, quando empregada em suco de laranja e suco de maçã apresentou a propriedade de reduzir a resistência térmica deste organismo, sendo este efeito mais evidente quando empregou-se temperaturas na faixa de 80 a 90°C, quando comparado a temperaturas ao redor de 95°C.

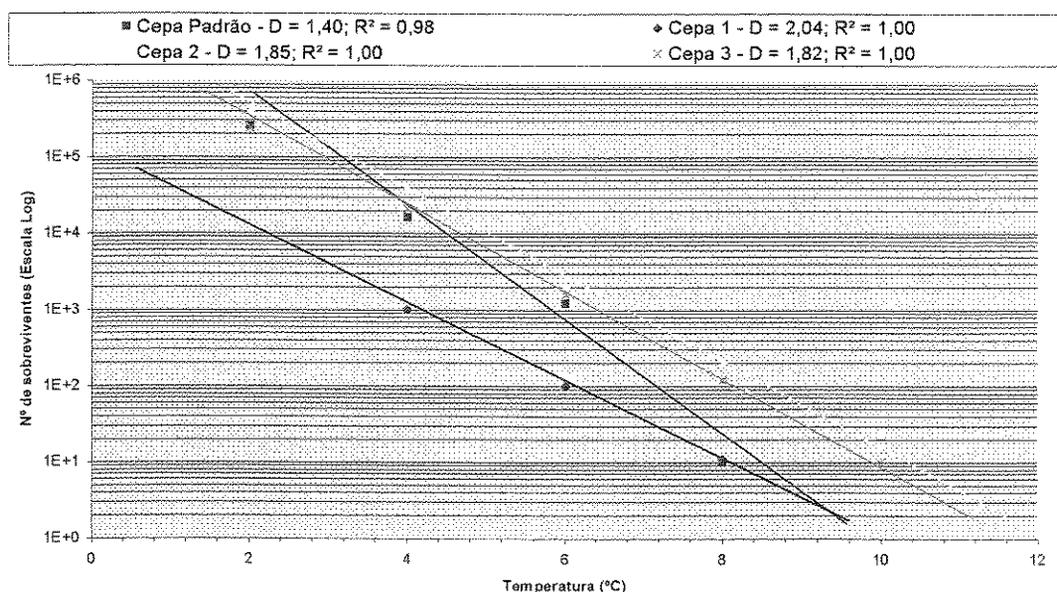
Os coeficientes térmicos Z, obtidos para as 4 cepas estudadas podem ser observados na Tabela 13;

Tabela 13 : Coeficiente Z ( °C) da cepa padrão DSM 2498 e das 3 cepas isoladas do suco de maracujá pH 3,5.

Cepa	Z (°C )
Cepa 4	7,02
Cepa 6	7,97
Cepa 7	7,24
Cepa padrão DSM 2498	7,13

Verificando os resultados da Tabela 13, pode-se concluir que a cepa que apresentou maior resistência térmica foi a cepa 4, isolada do suco de maracujá, justificado por apresentar um menor coeficiente térmico (Z), indicando maior dependência da mudança de temperatura, e também por apresentar valores D, superiores das demais cepas.

Na Figura 12 pode ser visualizado o comportamento dos coeficientes térmicos das 3 cepas isoladas do suco de maracujá e da cepa padrão DSM 2498.



**Figura 12.** Curva de Morte térmica, média de valor D médio das cepas identificadas como *A. acidoterrestris* e da cepa padrão DSM 2498 em suco de maracujá com pH 3,5.

O coeficiente térmico da cepa padrão ( $Z=7,13^{\circ}\text{C}$ ) é menor do que a média dos coeficientes dos 3 isolados do suco de maracujá ( $Z=7,41^{\circ}\text{C}$ ), demonstrando assim sua menor resistência térmica.

A cepa padrão *A. acidoterrestris* DSM 2498 utilizada nesta pesquisa foi isolada originalmente a partir de suco de maçã (Cerny *et al.*, 1984) e as demais cepas estudadas como já dito, foi isolada de suco de maracujá. Sabendo-se que a resistência térmica dos esporos bacterianos é influenciado por fatores ambientais com pH, atividade de água e composição do meio, justifica-se a menor resistência térmica atribuída a cepa padrão DSM 2498.

Geralmente umas das temperaturas mais altas usadas na pasteurização de sucos de frutas é de 97°C por alguns segundos (Pontius *et al.*, 1998). O suco de maracujá utilizado nesta pesquisa foi pasteurizado utilizando-se no processo o binômio tempo/ temperatura de 97°C por 15 segundos, dados fornecidos pela indústria processadora.

Os resultados dos experimentos para a determinação da resistência térmica da cepa padrão DSM 2498 em suco de maracujá pasteurizado, demonstram uma elevada resistência térmica desta bactéria, pois os valores D e z obtidos a temperatura de 95°C são bastante elevados, respectivamente 1,4 min e 7,13°C, e indicam que a pasteurização geralmente empregada nas indústrias de suco (95-97°C), não é eficiente na eliminação das mesmas.

O processo utilizado na indústria fornecedora do suco de maracujá é de 97°C/15 s, e os valores  $D_{95^{\circ}\text{C}} = 1,4$  min e  $z = 7,13^{\circ}\text{C}$ , obtidos nesta pesquisa para a cepa padrão DSM 2498, e usando a equação:

$\log(D_2 / D_1) = (-1/z) (T_2 - T_1)$ , onde T é a Temperatura, temos que:

$D_{97^{\circ}\text{C}} = 0,73$  min, para a cepa padrão DSM 2498

O número de reduções decimais ( $\gamma$ ) da cepa padrão DSM 2498 neste processo é dado pela seguinte equação:

$$\gamma = F/D_{97^{\circ}\text{C}}, \text{ onde } F \text{ é o tempo do processo}$$

$$\gamma = 0,34 \text{ reduções logarítmicas.}$$

Dentre as 3 cepas estudadas, isoladas do suco de maracujá, e utilizando-se os resultados da cepa 4 que apresentou uma resistência térmica superior as demais ( $D_{95^{\circ}\text{C}}=2,04$  e  $z =7,02$ ), pode-se calcular que:

$$D_{97^{\circ}\text{C}} = 1,04\text{min para a cepa 4}$$

O número de reduções que o processo causou nesta cepa pode-se calcular:

$$\gamma = F/D_{97^{\circ}\text{C}}, \text{ onde } F \text{ é o tempo do processo e}$$

$$\gamma = \text{número de reduções.}$$

$$\gamma = 0,24 \text{ reduções logarítmicas.}$$

Percebe-se que o número de reduções logarítmicas tanto da cepa padrão DSM 2498 ( $\gamma=0,34$ ) com da cepa 4 que apresentou maior resistência térmica ( $\gamma=0,24$ ), não atingem nem 1 redução decimal, o que demonstra a necessidade de medidas de controle mais efetivas para evitar a contaminação e posterior deterioração do suco por *Alicyclobacillus*.

Para estabelecer um novo critério de pasteurização no suco de maracujá que provoque no mínimo 3 reduções decimais, visando eliminar deteriorantes como no caso o *A. acidoterrestris*, poderia-se predizer as seguintes condições:

Para a cepa padrão DSM 2498 :  $D_{95^{\circ}\text{C}}=1,4$  min um aumento de  $Z$  °C causaria uma redução decimal na resistência.

$$z=7,13^{\circ}\text{C}$$

$$D_{95+7,13=102,13^{\circ}\text{C}}= 1,4/10 =0,14\text{min}$$

Usando a fórmula :  $\gamma = F/D_{102,3^{\circ}\text{C}}$ , onde  $\gamma = 3$  e isolando  $F$ :

$$F= 25 \text{ s}$$

Portanto para se obter 3 reduções logaritmicas, da cepa padrão DSM 2498, deve-se utilizar no processo de pasteurização do suco de maracujá a temperatura de  $102,13^{\circ}\text{C}$  durante 25 s. De acordo com Grice (1993), os sucos de frutas não devem sofrer tratamentos térmicos muito rigorosos, nunca superiores a  $97^{\circ}\text{C}$  por poucos segundos, pois as características organolépticas destes sucos seriam afetadas. No entanto, nesta pesquisa foi simulado em laboratório este tratamento térmico ( $102,13^{\circ}\text{C}/25\text{s}$ ), no mesmo suco de maracujá estudado e não foi observada nenhuma alteração em suas características, como cor, aroma e sabor.

Partindo-se dos dados obtidos para a cepa 4, que demonstrou maior resistência que as demais, para se obter 3 reduções logarítmicas, o tratamento

térmico indicado seria o de 102,1°C durante 36s, o que para as indústrias de sucos trata-se de um valor impraticável, por ser muito elevado.

Para se conseguir uma efetiva redução de *A. acidoterrestris* nos sucos, ou faz-se um aumento da temperatura de pasteurização sem que isto afete seus atributos sensoriais, ou também pode-se utilizar simultaneamente com o processo térmico algum antimicrobiano, como a nisina ( Komitopoulou *et al.*,1999 ) que auxilie na redução da resistência térmica dos esporos desta bactéria. Outra alternativa para minimizar a presença destes esporos seria utilizar agentes surfactantes que auxiliem a eficiência dos sanificantes, durante as operações de lavagem das frutas (Doyle *et al.*1999 ; Orr, 2000).

Pelo exposto, conclui-se que se a matéria prima estiver contaminada mesmo com uma baixa população de *A. acidoterrestris*, a deterioração do produto final poderá ocorrer, se condições satisfatórias para o desenvolvimento da bactéria ocorrerem, devido a alta resistência dos seus esporos.

## 6. CONCLUSÕES

1. As condições ótimas de tempo e temperatura para ativação dos esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 em sucos de maracujá e abacaxi foram de 70°C por 20 min .
2. O melhor tempo de incubação para enriquecimento em suco de maracujá, de *A. acidoterrestris* DSM 2498 foi de 48 hs.
3. De um total de 57 amostras de suco de maracujá comercial, foram constatadas 16 (28%) amostras positivas para presença de esporos de bactérias termoacidófilas.
4. A contaminação por esporos de bactérias termoacidófilas, nas amostras positivas variou entre 1,1 e >23 NMP/100ml de suco ocorrendo aparentemente a maior incidência no mês de junho e julho, que são meses caracterizados por clima seco.
5. Não foram obtidos isolamentos de *A. acidoterrestris* a partir de amostras de suco de abacaxi.
6. O sistema API CH 50 para identificação bioquímica de *Bacillus* não foi satisfatório para a identificação de *Alicyclobacillus*.
7. O método do RAPD sugeriu a ocorrência de elevada similaridade genética entre os isolados do suco de maracujá e a cepa padrão *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498.

8. A técnica RAPD apresentou resultados satisfatórios e reprodutíveis, podendo ser utilizada como uma ferramenta na identificação de *Alicyclobacillus*.
9. As cepas isoladas do suco de maracujá sobreviveram ao processo de pasteurização, realizado na indústria processadora, porém não provocaram deterioração no produto,
10. As cepas isoladas do suco de maracujá apresentaram maior resistência térmica do que a cepa padrão *A. acidoterrestris* DSM 2498.
11. Os processos usuais de pasteurização aplicados aos sucos não são suficientes para destruir os esporos das bactérias termo-ácido-tolerantes. Um processo de 102,1°C e 36 s seria adequado para reduzir 3 ciclos logarítmicos da cepa mais termoresistente isolada neste estudo.
12. O risco de deterioração pode ser minimizado através da adoção de Boas Práticas de Fabricação e de um correto monitoramento das condições do processamento e do produto final, preocupando-se com lavagem e seleção da fruta, com as condições de abuso de temperatura na armazenagem e conservação do produto.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZUMA, E.; YOKOYA, F.; NOGUEIRA, P.C. Influência de *A. acidoterrestris* nas características sensoriais, microbiológicas e químicas de suco de laranja reconstituído. **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Ceará, 2000.
- BAUMGART, J. Merkmale grampositiver bakterien und weitere identifizierung. In: BAUMGART, J. (Ed.) **Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln**. Hamburg: Behr's Verlag, 1993. Cap. IV. 8, p.245-260.
- BLOCHER, J.; BUSTA, F. Bacterial spore resistance to acid. **Food Technology**, nov.87-99. 1983.
- BORLINGHAUS, A & ENGEL, R. *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice (AJC). **Fruit Processing**, n7, p.1-5, 1997a.
- BORLINGHAUS, A.; ENGEL, R. *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) Supplies – Method development and validation. **Fruit Processing**, n.7, p.1-5, 1997b.
- BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T. **Biology of Microorganism**. 6 ed. Prentice Hall, Inc., New Jersey, 1991.
- BROUSSEAU, R.; SAINT-ONGE, A.; PRÉFONTAINE, G.; MASSON, L.; CABANA, J. Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**: 114-119, 1993.
- BROWN, K.L. New microbiological spoilage challenges in aseptics: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage in aseptically packed fruit juices. In: OHISSON, T. (Ed.) **Advances in aseptic processing and packaging technologies**. p.1-14.1996

- BROWN, K.L. New microbiological spoilage challenges in aseptics: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage in aseptically packed fruit juices. Food Hygiene Department, Campden & Chorleywood Food Reserch Association. 1985.
- BYUN, S. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. **Int. Journal of Food Microbiology**, **69**: 227-235, 2001.
- CAETANO-ANNOLLÉS, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Bio/Technol.**, **9**: 553-557, 1991.
- CANCILLA, M.R.; POWELL, I.B.; HILLIER, A.J.; DAVIDSON, B.E. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrary primed polymerase chain reaction with 32P and fluorescent labels. **Appl. Environ. Microbiol.**, **58**: 1772-1775, 1992.
- CERNY, G; DUONG, A.; HENNLICH, W.; MILLER, S. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices. **Food Australia**, **52(7)**: 286-289, 2000.
- CERNY, G.; HENNLICH, W.; PORALLA, K. Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderserrgers. **Z Lebens Unters Forsch**, n.179, p.224-227, 1984.
- CERNY, G.; HENNLICH, W.; PORALLA, K. Spoilage of fruit juice by Bacilli: isolation and characterisation of the spoling microorganism. **Z. Lebns Unters Forsch**, **179**: 224-227, 1985.
- COUTINHO, H.L.C.; HANDLEY, B.A.; KAY, H.E.; STEVENSON, L.; BERINGER, J.E. The effect of colony age on PCR fingerprinting. **Lett. Appl. Microbiol.**, **17**: 282-284, 1993.

- DARLAND, G.; BROCK, T.D. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov. an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. **Journal of General Microbiology**, n.67, p.9-15, 1971.
- DE ROSA, M.; GAMBACORTA, A.; BU'LOCK, J.D. Effects of pH and temperature on the fatty acid composition of *Bacillus acidocaldarius*. **Journal of Bacteriology**, n.117, p.212-214, 1974.
- DEINHARD, G.; BLANZ, P.; PORALLA, K.; ALTAN, E. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soil. **Systematic Applied Microbiology**, n.10, p.47-53, 1987a.
- DEINHARD, G.; SAAR, J.; KRISCHKE, W.; PORALLA, K. *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing  $\omega$ -cycloheptane fatty acids. **Systematic Applied Microbiology**, n.10, p.68-73, 1987b.
- DOYLE, M.P. Inactivation of *Alicyclobacillus* spores. At a glance newsletter. **Center for Food Safety & Quality Enhancement**, 8: (2) 1 . 1999.
- DOYLE, J.L.; DOYLE, J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**.12: 13-15. 1990.
- DUONG, H. & JENSEN, N. Spoilage of iced tea by *Alicyclobacillus*. **Food Australia** 52 ( 7 ): 292-293, 2000.
- EATON, A.; CLESCERI, A.; GREENBERG, A . **Standard Methods for the examination of water and wastewater**, 18 th ed. APHA. Washington. 1995.
- EGUCHI, S.; MANFIO, G.; PINHATTI, M.. Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices. Detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. Part I. **Fruit Processing**, 1: 12-18, 2001a.

- EGUCHI, S.; MANFIO, G.; PINHATTI, M. Acidothermophilic sporeforming bactéria (ATSB) in orange juices. Detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. Part II. **Fruit Processing**, **2**: 55-62, 2001b.
- EGUCHI, S.; MANFIO, G.; PINHATTI, M. Acidothermophilic sporeforming bactéria (ATSB) in orange juices. Detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. Part III. **Fruit Processing**, **3**: 95-101, 2001c.
- EIROA, M. N.U.; JUNQUEIRA, V & SCHMIDT, F. *Alicyclobacillus* in orange juices : Occurrence and heat resistance of spores. **Journal of Food Protection**, vol 62, n 8, 883-886, 1999.
- EIROA, .N.U.; LEITÃO, M.F.F.; DAVENPORT, R.R.; CULLEN, B.T. *Zygosaccharomyces baillii* em sucos de frutas concentrados: estudo da ocorrência e avaliação da sua resistência ao calor e aos conservantes químicos. **Col. ITAL**, n.14, p.57-72, 1984.
- FACH, P.; HAUSER, D.; GUILLOU, J.P.; POPOFF, M.R. Polymerase chain reaction for the rapid identification of *Clostridium botulinum* type A strains and detection in food samples. **J. Appl. Bacteriol.**, v.75, p.234-239, 1993.
- GIOVANNONI, S. The polymerase chain reaction. In: **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. (E. Stackebrandt and M. Goodfellow; des.) John Wiley & Sons Ltd. p.177-203, 1991.
- GOMBAS, D.E. Bacterial sporulation and germination. In: Thomas J. Montville. **Food Microbiology. Concepts in Physiology and Metabolism**. Florida. CRC Press Inc.:131-156. 1987.
- GORDON, R.E. The genus *Bacillus*. **Agricultural Handbook** n°427. Washington. USDA-ARS. 1973.

- GOTO, K.; MATSUBARA, H.; MOCHIDA, K. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing  $\omega$ -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. **Int. Journal of Syst. And Evol. Microb.**, 52:109-113. 2002.
- GRICE, K.G. Manufacture of UHT fruit juices. **Food Australia**, 45(9): 445-447, 1993.
- HALVORSON, H.; ZIEGLER, A. Application of statistics to problems in bacteriology. **Journal Bacteriology**. 25: 101-121. 1933.
- HERSON, A.; HULLAND, E. Canned foods. Na introduction to their microbiology. **Journal of Churchill**, London, 319p. 1980.
- HIPPECHEN, B.; ROLL, A.; PORALLA, K. Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing  $\omega$ -cyclohexane fatty acids and hopanoids. **Archives of Microbiology**, n.129, p.53-55, 1981.
- HIRAISHI, A.; INAGAKI, K.; TANIMOTO, Y. Phylogenetic characterization of a new thermoacidophilic bacterium isolated from hot springs in Japan. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 43 : 295-304. 1997.
- ITO, K. Thermophilic organism in food spoilage flat-sour aerobes. **Journal of Food Protection**, 44:(2)157-163. 1981.
- JENSEN, N. *Alicyclobacillus* in Australia. **Food Australia**, 52(7): 282-286, 2000.
- KOIVULA, T.; HEMILA, H.; PALVA, I. Cloning and sequencing of a gene encoding acidophilic amylase from *B. acidocaldarius*. **Journal of General Microbiology** (139): 2399-2407. 1993.
- KOMITOPOULOU, E.; BOZIARIS I.; DAVIES, E. *A. acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. **International Journal of Food Science and Technology**, 34: 81-85, 1999.

- LAWRENCE, L.M.; HARVEY, J.; GILMOUR, A. Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**(9): 3117-3119, 1993.
- LEITÃO, M. F. Microbiologia de sucos, polpas e produtos ácidos. **Manual Técnico de Industrialização de Frutas**. p: 34-59. Instituto de Tecnologia de Alimentos. 1986.
- LOGINOVA, L.G.; KHRAPTSOVA, G.I.; EGOROVA, L.A.; BOGDANOVA, T.I. Acidophilic, obligate thermophilic bacterium *Bacillus acidocaldarius* isolated from hot springs and soil of Kusnashir island. **Microbiology**, v.47, p.771-775, 1978.
- MATSUBARA, H.; GOTO, K.; MATSUMURA, T. *Alicyclobacillus acidophilus* SP.NOV., a novel thermo-acidophilic,  $\omega$ -alicyclic fatty acid containing bacterium isolated from acid beverages. **Int. Journal of Syst. and Evol. Microb.**, **52**: 1681-1685, 2002.
- MATTHEWS, K.R.; OLIVER, S.P. Differentiation of *Staphylococcus* species by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **J. Food Protection**, **57** (6): 486-489, 1994.
- MAZURIER, S.; AUDURIER, A.; MARQUET – VAN DER MEER, N.; NOTERMANS, S.; WERNARS, K. A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of *Listeria monocytogenes* isolates. **Res. Microbiol.**, **143**: 507-512, 1992.
- MCINTYRE, S.; IKAWA, J.; PARKINSON, N.; HAGLUND, J.; LEE, J. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. **Journal of Food Protection**, v.58, n.3, p.319-321, 1995.

- MURAKAMI, M.; TEDZUKA, H.; YAMAZAKI, K. Thermal resistance of *A. acidoterrestris* spores in different buffers and pH. **Food Microbiology**, **15**: 577-582, 1998.
- MYERS, L.E.; SILVA, S.V.P.S.; PROCUNIER, J.D.; LITTLE, P.B. Genomic fingerprinting of '*Haemophilus somnus*' isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay. **J. Clin. Bacteriol.**, **31**: 514-517, 1993.
- NIEDERHAUSER, C.; CANDRIAN, U.; HÖFELEIN, C.; JERMINI, M.; BÜHLER, H.P.; LÜTHY, J. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, **58** (5): 1564-1568, 1992.
- ORR, R. & BEUCHAT, L. Efficacy of disinfectants in killing spores of *A. acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivor. **Journal of Food Protection**, vol 63, n 8 , 1117-1122, 2000.
- ORR, R.; BEUCHAT, L.; SHEWFELT, C. . Detection of guaiacol produced by *A. acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses and comparison with spore and vegetative cell populations. **Journal of Food Protection**, **63**(11): 1517-1522, 2000.
- PARISH, M. Microbiological Concerns in Citrus Juice Processing. **Food Tecnology**, n.4, p.129-132, 1991.
- PFLUG, I. **Microbiology and engineering of sterilization process**. 7<sup>a</sup> ed. Environmental Sterilization Laboratory. Minnessota University. 1990.
- PETTIPHER, G. & OSMUNDSON, M.E. Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Food Australia**. 52 (7): 293-295, 2000.
- PETTIPHER, G.L.; OSMUNDSON, M.E.; MURPHY, J.M. Methods for detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth

- and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. **Letters in Applied Microbiology**, n.24, p.185-189, 1997.
- PINHATTI, M. Isolamento e caracterização de Alicyclobacillus e estudo de sua ocorrência em sucos de frutas industrializados. **Tese de mestrado. UNICAMP**, 88p, 1999.
- PINHATTI, M.; EGUCHI, S.; MANFIO, G. Detection of Acidothermophilic Bacilli in Industrialized Fruit Juices. **Fruit Processing**, **9**: 350-353, 1997.
- PONTUIS, A.; RUSHING, J.; FOEDEGIND, P. Heat resistance of *A. acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. **Journal of Food Protection**, **61(1)**: 41-46, 1998.
- PORALLA, K.; KÖNIG, W.A. The occurrence of  $\omega$ -cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic *Bacillus*. **FEMS Microbiological Letters**, n.16, p.303-306, 1983.
- PREVEDI, P.; COLLA, F.; VICINI, E. Characterization of *Alicyclobacillus*, a sporeforming thermophilic acidophilic bacterium. **Industria Conserve**, n.70, p.128-132, 1995.
- PREVOST, G.; JAULHAC, B.; PIEMONT, Y. DNA fingerprinting by pulsed-field electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, **30** (4): 967-973, 1992.
- PRIEST, F.G.; AUSTIN, B. (Eds.) Numerical taxonomy. In: **Modern Bacterial Taxonomy**. (2 ed.) London: Chapman & Hall, 1993. p.14-48.
- RAYNEY, F.; FRITZE, D.; STACKEBRANDT, E., The phylogenic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. **FEMS microbiology Letters**. 115: 205-212. 1994.

- RASMUSSEN, H.N.; OLSEN, J.E.; RASMUSSEN, O.F. RAPD analysis of *Yersinia enterocolitica*. **Lett. Appl. Microbiol.**, **19**: 359-362, 1994.
- SAULNIER, P.; BOURNIEX, C.; PRÉVOST, G.; ANDREMONT, A. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, **31** (4): 982-985, 1993.
- SHIDA, O. Proposal for two new genera *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. **Int. J. System. Bacteriol.** **46**: 936-946, 1996.
- SILVA, F.; GIBBS, P.; VIEIRA, M. Thermal inactivation of *A. acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. **International Journal of Food Microbiology**, **51**: 985-103, 1999.
- SPLITTSTOESSER, D.; LEE, C.; CHUREY, J. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, **18**(9): 585-587, 1998.
- SPLITTSTOESSER, D.F. & CHUREY, J.J. Unique spoilage organisms of musts and wines. In: **Wine spoilage microbiology conference**, 1996.
- SPLITTSTOESSER, J.D.; CHUREY, J.; LEE, C. Growth characteristics of sporeforming bacilli isolated from fruit juices. **Journal of Food Protection**, n.57, p.1080-1083, 1994.
- STEPHAN, R.; SCHRAFT, H.; UNTERMANN, F. Characterization of *Bacillus licheniformis* with the RAPD technique (randomly amplified polymorphic DNA). **Lett. Appl. Microbiol.**, **18**: 260-263, 1994.
- STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in food processing**. Academic Press, London, 1973.

- TSEN, H.Y.; CHEN, T.R. Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **37**: 685-690, 1992.
- UCHINO, F.; DOI, S. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. **Journal of Agric. Biological Chemistry**, n.31, p.817-822, 1967.
- VAN BELKUM, A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. **Clin. Microbiol. Rev.**, **7**(2): 174-184, 1994.
- VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington, D.C. American Public Health Association. 1992, 1219 p.
- WALLS, I. & CHUYATE, R. *Alicyclobacillus* – Historical, Perspective and Preliminary characterization Study. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, **18**(8): 499-503, 1998.
- WALLS, I. & CHUYATE, R. Spoilage of fruit juices by *A. acidoterrestris*. **Food Australia** 52 (7): 286-289, 2000a.
- WALLS, I. & CHUYATE, R. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. **Journal of AOAC Internacional**, **83**(5): 1115-1120, 2000b.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Ac. Res.**, **18** (24): 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFASLKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Ac. Res.**, **18** (22): 6531-6535, 1990.
- WILSON, I.G.; COOPER, J.E.; GILMOUR, A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain

- reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entC* and the termonuclease gene *nuc*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57** (6): 1793-1798, 1991.
- WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK Jr., P.; FOX, G.E.; DEINHARD, G.; PORALLA, K. Comparative sequence analysis on the 16S rRNA-(rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. **Int. J. Systematic Bacteriology**, **42**(2): 263-269, 1992.
- WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK, P.; FOX, G. PCR Amplification of 16S rRNA from lyophilized cell cultures facilitates studies in molecular systematics. **Current Microbiology**, n.21, p.325-327, 1990.
- YAMAZAKI, K.; KAWAI, N.; SHIMANO, H. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *A. acidoterrestris* spores. **Letters in Applied Microbiology**, **25**: 153-156, 1997a.
- YAMAZAKI, K. ; OKUBO,T.;INOUE,N.;SHINANO,H. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid identification of the spoilage bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**:**61** (6) **1016-1018**.1997b.
- YAMAZAKI, K.; TEDUKA, H.; SHINANO, H. Isolation and Identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. **Bioscie. Biotech. Biochem.**, n.60, p.543-545, 1996.
- YOUNG, K.A.; POWER, E.G.M.; DRYDEN, M.S.; PHILLIPS, I. RAPD typing of clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. **Lett. Appl. Microbiol.**, **18**: 86-89, 1994.

ZACARCHENCO, P.; LEITÃO, M.; DESTRO, M. Ocorrência de *B. sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 20 (3):363-368.2000.

## 8. ANEXO 1

Isolado	Origem	Aspecto	Microscopia	Odor característico: (adstringente)
1 +	E	Colônia creme opaca, Diâmetro 3-4mm, bordas arredondadas	Bastonetes com esporos subterminais e dilatação do esporângio, bastonetes em paralelo	+
2 +	E	Colônia creme plana, Diâmetro 3-4mm, bordas arredondadas	Idem EI1, com cadeias de 2 ou mais bastonetes	+
3	E	Típica (EI1 e EI2)	Idem EI2	+
4	E	Típica (EI1 e EI2)		+
5	EI7	Idem EI1	Idem EI1	+
6	EI8	Idem EI1	Idem EI1	+
7 +	EII1	Colônia creme opaca, bordas arredondadas e irregulares	Bastonetes com cadeias de 2 elementos, esporângio dilatado, esporo cilíndrico quando livres e refringentes	+
8	EII3	Idem EII1	Idem EII1	+
9	EII5	Idem EII1	Idem EII1	+
10	EII7	Idem EII1	Idem EII1	+
11	EII8	Idem EII1	Idem EII1	+
12	EII9	Idem EII1	Idem EII1	+
13	EII10	Idem EII1	Idem EII1	+
14 +	EIII1	Idem EI1 e EII1	Idem EI1 e EII1	+
15 +	EIII2	Colônia Diâmetro 1-2mm, escura, bordas irregulares	Típica: esporângio dilatado, bastonetes em paralelo, esporos cilíndricos, esporos livres refringentes	menos intenso
16	EIII3	Idem EI1 e EII1	Idem EI1 e EII1	+
17	EIII4	Idem EI1 e EII1	Idem EI1 e EII1	+
18	EIII5	Idem EI1 e EII1	Idem EI1 e EII1	+
19	EIII6	Idem EI1 e EII1	Idem EI1 e EII1	+
20	EIII7	Idem EI1 e EII1	Idem EI1 e EII1	+
21	EIII8	Idem EI1 e EII1	Idem EI1 e EII1	+
22	EIII9	Idem EI1 e EII1	Idem EI1 e EII1	+
23	EIII10	Idem EI1 e EII1	Idem EI1 e EII1	+
24	EIV1	Idem EI1 e EII1	Idem EI1 e EII1	+
25* +	EIV2	Típica, creme, rugosa, Diâmetro 3-4mm, bordas irregulares, opaca	Esporo maior, localização mais central, bastonete mais fino. Esporângio com pouca dilatação, diferente da E1	+
26*	EIV3	Idem EIV2	Idem EIV2	+
27 +	EIV4	Idem EI1	Idem EI1	+

28	EIV5	Idem EI1	Idem EI1	+
29	EIV6	Idem EI1	Idem EI1	+
30*	EIV7	Idem EIV2	Idem EIV2	+
31*	EIV8	Idem EIV2	Idem EIV2	+
32	EIV9	Idem EI1	Idem EI1	+
33	EIV10	Idem EI1	Idem EI1	+
34* +	EV1	Crescimento de 1-2mm, cor bastante escura	Idem EIV2	+
35 +	EV2	Idem EV1	Idem EI1	+
36	EV3	Idem EI1	Idem EI1	+
37*	EV4	Idem EIV2	Idem EIV2	+
38	EV5	Idem EI1	Idem EI1	+
39	EV6	Idem EI1	Idem EI1	+
40	EV7	Idem EI1	Idem EI1	+
41	EV8	Idem EI1	Idem EI1	+
42	EV9	Idem EI1	Idem EI1: Esporos subterminais, esporângio dilatado, bastonetes em paralelo	+
43	EV10	Idem EI1	Idem EI1	+
44	FI1	Idem EI1	Idem EI1	+
45	FI2	Idem EI1	Idem EI1	+
46*	FI3	Diâmetro 1-2mm, cor escura	Esporo maior e localização central	+
47	FI4	Idem EI1	Idem EI1	+
48	FI5	Idem EI1	Idem EI1	+
49	FI6	Idem EI1	Idem EI1	+
50	FI7	Idem EI1	Idem EI1	+
51	FI8	Idem EI1	Idem EI1	+
52	FI9	Idem EI1	Idem EI1	+
53	FI10	Idem EI1	Idem EI1	+
54	FII1	Idem EI1	Idem EI1	+
55	FII3	Idem EI1	Idem EI1	+
56	FII4	Idem EI1	Idem EI1	+
57	FII6	Idem EI1	Idem EI1	+
58+	FII9	Idem EI1	Idem EI1	+
59+	FIII1	Idem EI1	Idem EI1	+
60	FIII3	Idem EI1	Idem EI1	+
61	FIII4	Idem EI1	Idem EI1	+
62	FIII5	Idem EI1	Idem EI1	+
63	FIII6	Idem EI1	Idem EI1	+
64	FIII8	Idem EI1	Idem EI1	+
65	FIII10	Idem EI1	Idem EI1	+

66	FIV1	Idem EI1	Idem EI1	+
67	FIV2	Cor creme escura, Diâmetro 1-2mm	Idem EI1	+
68	FIV3	Idem EI1	Idem EI1	+
69	FIV5	Idem EI1	Idem EI1	+
70	FIV6	Idem EI1	Idem EI1	+
71	FIV7	Idem EI1	Idem EI1	+
72	FIV8	Idem EI1	Idem EI1	menos intenso
73	FIV9	Idem EI1	Idem EI1	+
74	FIV10	Idem EI1	Idem EI1	+
75	FV1	Idem EI1	Idem EI1	+
76	FV3	Idem EI1	Idem EI1	+
77	FV4	Idem EI1	Idem EI1	+
78	FV6	Idem EI1	Idem EI1	+
79	FV7	Idem EI1	Idem EI1	+
80	FV8	Idem EI1	Idem EI1	+
81*	FV9	Atípico: Diâmetro 1-2mm, morfologia diferente, cor marrom	esporo maior, localização mais central no esporângio	+
82*	FV10	Idem FV9	Idem FV9	+
83* +	GI9	Idem FV9	Idem FV9	+
84	GI10	Idem EI1	Idem EI1	intenso
85 +	II1	Idem EI1	Idem EI1	+
86	III5	Idem EI1	Idem EI1	+
87 +	JIV6	Idem EI1	Idem EI1	+
88 +	JV5	Idem EI1	Idem EI1	+
89	DI1	Idem EI1	Idem EI1	+
90 +	DI2	Idem EI1	Idem EI1	+

\*Cepas que apresentaram esporos maiores e localização central no esporângio.

+ Cepas submetidas ao RAPD.

## 9. ANEXO 2

Os meios de cultura usados na pesquisa estão indicados a seguir:

Meio BAM (*Bacillus acidocaldarius* médium) , de Darland & Brock (1971)

### Solução A:

CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O.....0,25g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.....0,50g

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>.....0,20g

KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>.....3,0 g

Extrato de levedura.....1,0 g

Solução Elementos traços.....1,0ml

Água destilada.....q.s.p.100ml(para meio líquido)

q.s.p. 500ml(para meio sólido)

Ajustar o p H para 4,0 com a solução de 1N de ácido sulfúrico ou 1 N de NaOH. Autoclavar a 121°Cpor 15 min.

### **Solução B**

Glicose.....5,0 g

Agar.....20,0g

Água destilada.....500ml

Autoclavar a 121°C por 15 min.

Devido ao pH bastante baixo, a solução A não deve ser autoclavada com a solução B. Portanto esteriliza-se separadamente a solução A e B. Combina-se as solução A com a B( esta deve estar fundida), Pinhatti, 1999.

### **Solução de Elementos Traços (Farrand, 1983)**

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ .....0,66g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0,18g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....0,16g

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....0,02g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ .....0,18g

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.....0,10g

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O.....0,30g

Água destilada.....1000ml

Autoclavar a solução e estocar sob refrigeração.

**Diluyente para *Alicyclobacillus*** (Deinhard, 1987)

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.....1,0 g

NaCl..... 8,0g

Água destilada.....1,0L

Ajustar o pH com ácido sulfúrico, em 4,5