

AVALIAÇÃO DA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO INOXIDÁVEL POR *ALICYCLOBACILLUS* SPP. EM SUCO DE LARANJA RECONSTITUÍDO

Vicky Cristine Bragante Thumaz (PIBIC/CNPq), Benício Alves de Abreu Filho (Orientador), e-mail: thumazv@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas da Saúde/Maringá, PR.

Ciência e Tecnologia de Alimentos, Microbiologia de alimentos

Palavras-chave: *Alicyclobacillus* spp., suco concentrado de laranja, biofilmes

Resumo:

Alicyclobacillus spp. são microrganismos aeróbicos, Gram-positivos, acidotermorresistentes e formadores de esporos. Estes microrganismos podem estar presentes em indústria processadora de suco de laranja através de biofilmes em superfícies que contatam diretamente com o suco, como o aço inoxidável. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de formação e adesão de biofilmes em superfície de aço inoxidável por células vegetativas e esporos de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus acidiphilus* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja reconstituído. Todas as cepas e esporos analisados apresentaram formação de biofilme com 24 horas de contato. Este estudo demonstra que células vegetativas e esporos por *Alicyclobacillus* spp. que contaminam o produto final pode ser originário de biofilmes formados na superfície de aço inoxidável durante o processamento industrial.

Introdução

O Brasil é o maior produtor de laranja e exportador mundial de suco de laranja, tendo como destaque o suco concentrado e congelado. No ano de 2013 a exportação brasileira de suco de laranja foi de 520 mil toneladas por safra. Dessa forma, a manutenção da qualidade dos sucos exportados é de vital importância para a permanência do Brasil nesse ranking (CITRUSBR, 2014). Apesar do meio ácido encontrado no suco, alguns microrganismos possuem capacidade de adaptação, como as bactérias acidotermorresistentes. Em destaque, *Alicyclobaccillus* spp. microrganismos formadores de esporos, capazes de sobreviverem a etapas do processamento térmico, podendo germinar e crescer, alterando as características sensoriais do alimento (SILVA e GIBBS, 2001). Estes microrganismos podem estar presentes na indústria de alimentos através de biofilmes, capazes de produzirem uma matriz extracelular que conduz uma adesão irreversível (SAUER, 2003). Entretanto, até o momento, não se tem conhecimento das espécies de *A. acidocaldarius* e *A. acidiphilus* serem

formadoras de biofilmes em superfície de aço inoxidável. Logo, o conhecimento do comportamento de sobrevivência destas bactérias pode ajudar no desenvolvimento de medidas de controle e eliminação dos mesmos nos ambientes de produção de alimentos.

Materiais e métodos

Cepas bacterianas

Foram utilizadas cepas de *A. acidocaldarius* 0298^T, *A. acidiphilus* 0247^T e *A. acidoterrestris* 0244^T, que estão depositados na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA / UNICAMP. As cepas foram ativadas em caldo BAT (caldo *Bacillus acidoterrestris*) por 24 h a 45 °C, sendo posteriormente cultivadas em ágar BAT por 24 h a 45 °C e estocadas a 4 °C para os ensaios posteriores.

Preparo dos cupons de aço inoxidável

Foram utilizados cupons de aço inoxidável AISI 304, (quadrados de 8 mm x 8 mm x 1 mm). Antes de cada ensaio, os cupons foram lavados com detergente neutro, enxaguados com água destilada, imersos em álcool 70% (v/v) por 1 h, enxaguados novamente e esterelizados a 121 °C por 15 minutos.

Preparo do meio de cultivo

O suco de laranja concentrado foi cedido por uma indústria da região noroeste do estado do Paraná. Reconstituído em água estéril para 11 °Brix, e utilizado como meio de cultivo. Após a incubação das cepas em caldo BAT, pH 4,0, foram realizadas as diluições seriadas para obtenção de suspensão de aproximadamente 1×10^5 UFC/mL. Cada cupom foi colocado em microtubo contendo 900 µL de suco de laranja e 100 µL da suspensão e incubados a diferentes temperaturas para 0244^T (28 °C e 45 °C), 0247^T (25 °C e 45 °C) e 0298^T (45 °C e 60 °C). As análises foram realizadas após 0, 24, 72 e 120 h de cultivo.

Determinação do número de células aderidas

Para cada tempo e temperatura de incubação, cada cupom foi transferido para um microtubo contendo 1 mL de solução salina (85%), por 1 minuto em repouso (para retirada das células planctônicas), transferido novamente para um microtubo contendo a solução salina e submetido à agitação por 5 minutos (para desprendimento das células sésseis), foi realizado o plaqueamento em ágar BAT (45 °C / 24 h). Para contagem de esporos, os mesmos cupons foram submetidos a um choque térmico a 80 °C por 10

minutos, seguido de plaqueamento em gotas de 20 µL em meio BAT e posteriormente incubados a 45 °C por 24 horas.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após 5 dias de formação de incubação, os cupons foram tratados com cocodilato e glutaraldeído 2,5% para fixação, seguido de desidratação com álcool etílico, ponto crítico com CO₂ e metalização com ouro. Os cupons foram observados em MEV (Quanta 250 FEI).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e os valores das médias foram comparados por teste de Tukey para os tempos e teste t-Student para as temperaturas, ambos a $p < 0,05$. A análise estatística foi conduzida utilizando o programa SISVAR versão 5.3.

Resultados e Discussão

Tabela 1. Contagem \pm DP de células sésseis (log UFC/cm²) de *Alicyclobacillus* spp. Comparação das temperaturas e tempos de contato.

Cepas	0244 ^T				0247 ^T				0298 ^T			
	28 °C		45 °C		25 °C		45 °C		45 °C		60 °C	
T °C	Cv	E	Cv	E	Cv	E	Cv	E	Cv	E	Cv	E
Tempo (h)												
24	3,81 \pm 0,01 ^{ab}	<3 ^b	4,22 \pm 0,03 ^a	<3 ^a	3,72 \pm 0,53 ^{ab}	3,39 \pm 0,06 ^{ab}	3,88 \pm 0,55 ^{ab}	<3 ^b	4,07 \pm 1,56 ^{ab}	3,39 \pm 0,06 ^{ab}	3,39 \pm 0,06 ^{ab}	<3 ^b
72	3,49 \pm 0,06 ^{ab}	3,19 \pm 0,06 ^{ab}	3,78 \pm 0,50 ^{ab}	4,12 \pm 0,18 ^{ab}	4,15 \pm 1,26 ^{ab}	3,55 \pm 0,12 ^{ab}	3,39 \pm 0,06 ^{ab}	<3 ^b	4,08 \pm 0,99 ^{ab}	3,75 \pm 0,05 ^{ab}	<3 ^b	<3 ^b
120	3,29 \pm 0,00 ^{ab}	<3 ^b	3,29 \pm 0,00 ^{ab}	3,29 \pm 0,00 ^{ab}	4,06 \pm 1,31 ^{ab}	3,29 \pm 0,00 ^{ab}	4,48 \pm 0,52 ^{ab}	4,39 \pm 0,06 ^{ab}	4,06 \pm 0,33 ^{ab}	3,39 \pm 0,06 ^{ab}	3,62 \pm 0,67 ^{ab}	<3 ^b

Diferentes letras minúsculas entre colunas representam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey. Diferentes letras maiúsculas entre linhas representam diferença significativa de acordo com o método t-Student. Ambos com ($p < 0,05$)

*Limite de detecção do método = 3,0 log₁₀ UFC/cm². Desvio padrão não estabelecido.

A. acidoterrestis na temperatura de 45 °C obteve maior quantidade de células vegetativas sésseis (4,22 UFC/cm²) a 24 horas de contato do que a 28 °C. Este fato pode ser explicado devido a menor temperatura não ser considerada ideal para crescimento de *A. Acidoterrestis*. Além disso, as temperaturas de 28 °C e 45 °C, não apresentaram contagens de esporos a 24 / 120 h (contagem abaixo do limite de detecção do método; <3 log UFC/cm²).

A temperatura e o tempo de contato também influenciaram as demais cepas. *A. acidiphilus* apresentou contagens de células vegetativas sésseis nas temperaturas de 25 °C e 45 °C a 24 h de contato (3,72 e 3,88 log UFC/cm²), respectivamente. De acordo com Matsubara et. al (2002) a faixa de temperatura da espécie é entre 20 e 55 °C, tendo como temperatura ótima 55 °C. A temperatura de 25 °C, foi selecionada a fim de representar a menor temperatura de crescimento da espécie, apresentou formação de biofilmes. Com relação aos esporos na produção de biofilme, na temperatura de 45 °C

em relação a temperatura de 25 °C, a 120 h de contato obteve-se maior contagem.

A. acidocaldarius em 24 horas já apresentou formação de biofilme de células vegetativas em ambas as temperaturas de 45 °C e 60 °C (4,07 e 3,39 UFC/cm²), respectivamente. Além disso, não apresentou formação de esporos no biofilme na temperatura de 60 °C (<3 log UFC/cm²).

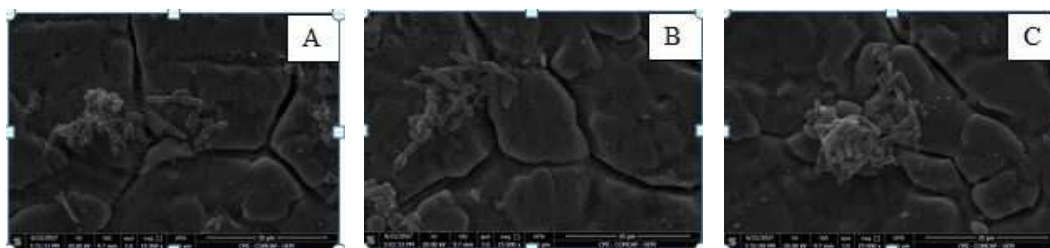


Figura 1: Imagens da microscopia eletrônica de varredura do aço inoxidável, após incubação com *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus* e *A. acidocaldarius*, respectivamente a 45 °C por 5 dias.

Conclusões

No presente estudo, houve formação de biofilme de células vegetativas no aço inoxidável por *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus* e *A. acidoterrestris* no tempo de 24 horas, em pelo menos uma temperatura avaliada. Com relação aos esporos na produção de biofilme, a cepa *A. acidiphilus* 0247^T, na temperatura de 45 °C obteve maior contagem (4,39 log UFC/cm²) em relação as demais cepas.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

Referências

CITRUSBR – **Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos**. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/consumo/suco-de-laranja-detalhado-264758-1.asp>. Acesso: 28. Mar.2017.

SILVA, F. V. M.; GIBBS, P. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. **Food Science and Technology**. v. 12, p. 68 – 74, 2001.

SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome Biology**. V.4, 2003.

MATSUBARA, H.; GOTO, K.; MATSUBARA, T.; MOCHIDA, K.; IWAKI, M.; NIWAL, M.; YAMASATO, K. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, ω-alicyclic fatty acidcontaining bacterium isolated from acidic beverages. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**.v. 52, 2002.