

## AVALIAÇÃO DA ESPORULAÇÃO DE *Alicyclobacillus acidoterrestris* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Cecília Pellacani Gardiolo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Benício Alves de Abreu Filho (Orientador), e-mail: baafilho@uem.br.

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

### Ciência e Tecnologia de Alimentos, Microbiologia de Alimentos

**Palavras-chave:** esporos, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, suco de laranja.

#### Resumo:

O *Alicyclobacillus spp.* é uma bactéria esporulada, que sobrevive a meios ácidos e temperaturas altas, e que frequentemente está associada à deterioração de sucos de laranja reconstituídos, causando sabor e odor desagradável no produto. Acredita-se que a maior fonte de contaminação deste microrganismo em sucos ocorra a partir da colheita da fruta, de modo que a fruta inevitavelmente carregue células vegetativas e esporos até o ambiente de processamento. Em condições favoráveis, os esporos germinam, aumentando a concentração suficiente desse microrganismo no produto para produzir compostos aromáticos desagradáveis. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar o processo de esporulação de *A. acidoterrestris* em diferentes meios de cultivo, incluindo o suco de laranja reconstituído. Para isso a cepa *Alicyclobacillus acidoterrestris* CBMAI 0244 foi inoculada em diferentes meios de cultivo com pH 4,0 (BAT, K ágar, YSG e suco de laranja reconstituído) a 45 °C por até 120 h. Nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h. Os meios de cultivo foram submetidos a choque térmico para germinação (80 °C por 10 minutos), realizadas diluições seriadas, plaqueamento em ágar BAT e incubação a 45 °C por 24 h com o intuito de quantificar os esporos em cada tempo avaliado. Em 24h, houve crescimento significativo de esporos em todos os meios de cultivo, e o meio BAT apresentou um ambiente mais favorável para esporulação do mesmo.

#### Introdução

*Alicyclobacillus spp.* é uma bactéria que tem causado grande preocupação e prejuízos no setor de suco de laranja concentrado e congelado, devido a sua capacidade de formar esporos, permanecendo ao longo das etapas de processamento do suco de laranja, além da sua característica deteriorante, causando sabor e odor desagradável ao produto.

*Alicyclobacillus spp.* são bactérias Gram-positivas que contêm ácidos graxos cíclicos como principal componente da membrana celular, são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, se multiplicam na faixa de pH entre 2,0 a 6,0 e na

faixa de temperatura de 20 a 70 °C (Lee et al., 2010). Formador de esporos, os mesmos são metabolicamente inativos e podem permanecer sob a forma dormente, onde em condições favoráveis, os mesmos são capazes de germinar e se tornarem células vegetativas novamente.

A destruição ou prevenção da germinação de esporos é de extrema importância durante o processamento de alimentos, uma vez que esporos não germinados não causam a destruição dos alimentos (Ray, 2003).

O tratamento térmico aplicado no processamento de sucos é capaz de eliminar células vegetativas, entretanto, os esporos são capazes de sobreviver a pasteurização. Devido a deterioração causada *A. acidoterrestris* em produtos ácidos, se faz necessário estudos sobre o seu comportamento bem como seu processo de esporulação em alimentos.

## Materiais e métodos

### 1. Cepa

A cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CBMAI 0244 utilizada, foi obtida no Laboratório de Microbiologia de Água, Ambiente e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, foi adquirida da Coleção Brasileira de Micro-organismo de Ambiente e Indústria (CBMAI) localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA / UNICAMP.

A cepa foi cultivada em caldo BAT por um período de 24 h a 45 °C, em pH 4,0 sendo posteriormente plaqueada em ágar BAT e incubadas por 24 h. Após, as placas contendo as colônias de *A. acidoterrestris* foram estocadas a 4 °C para serem utilizadas no preparo do inóculo nos ensaios posteriores.

### 2. Meios de cultivo para esporulação

Para avaliar a esporulação, os meios de culturas foram preparados de acordo com o procedimento indicado pela Associação Brasileira de Citricultores, com padronização do pH para 4,0, (Farrand et al., 1983).

A esporulação de *A. acidoterrestris* foi avaliada também no suco de laranja, o qual obtido comercialmente na concentração de 65 °Brix e reconstituído para 11 °Brix, para avaliar e constatar a ausência de *Alicyclobacillus* spp.

### 3. Avaliação da esporulação através dos diferentes meios de cultivo

A cepa foi ativada em caldo BAT a 45 °C por 24 h, em seguida plaqueada através do método de tapete para cada um dos meios de cultivo avaliados (BAT, K ágar, YSG) e inoculada também no suco de laranja reconstituído. O suco e as placas contendo o microrganismo foram incubados a 45 °C por até 120 h. Nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 h, o cultivo foi coletado das placas através de raspagem, colocados em tubos contendo água estéril e homogêneos. Em seguida foi realizada uma diluição seriada e plaqueamento em ágar BAT, para a quantificação de células vegetativas presentes. Posteriormente o material coletado foi centrifugado a 10.000 rpm por 3 minutos e lavado três vezes com água destilada esterilizada, para

remoção de matéria orgânica e células viáveis, restando apenas os esporos. Estes meios foram submetidos a choque térmico (80 °C por 10 minutos), realizadas as diluições seriadas, plaqueamento em ágar BAT e incubação a 45 °C por 24 h para quantificar os esporos em cada tempo avaliado.

## Resultados e Discussão

A Figura 1 demonstra os resultados da esporulação do *A. acidoterrestris* nos meios avaliados (BAT, K ágar, YSG e suco reconstituído), no tempo de incubação de 24, 48, 72, 96 e 120 horas

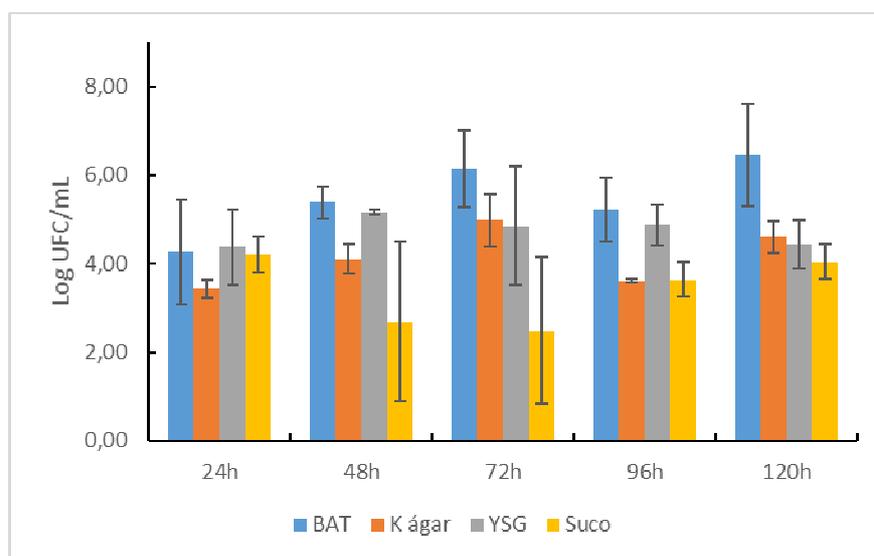


Figura 1. Esporulação do *Alicyclobacillus acidoterrestris* 0244 nos meios BAT, K ágar, YSG e no suco de laranja.

A Figura 2 demonstra o resultado da célula vegetativa do *A. acidoterrestris* para os meios avaliados.

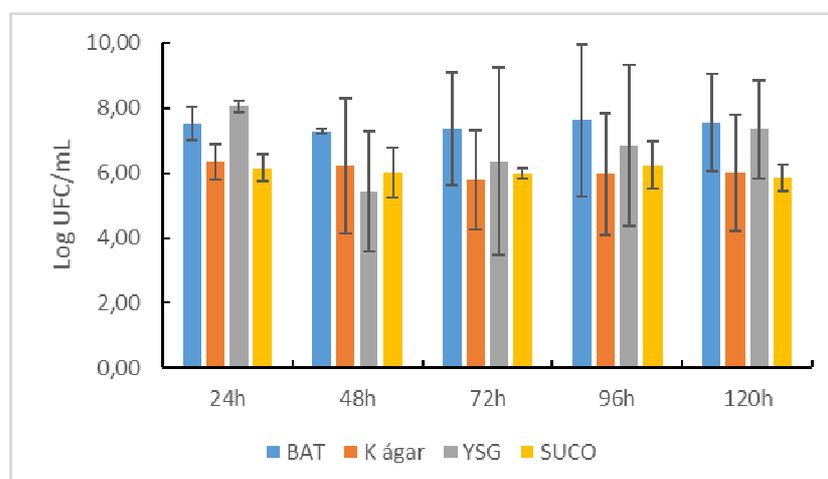


Figura 2. Crescimento da célula vegetativa do *Alicyclobacillus acidoterrestris* 0244 nos meios BAT, K ágar, YSG e suco de laranja.

Os resultados demonstraram que com apenas 24 horas de cultivo o crescimento bacteriano atingiu nível de esporulação superior a 50% nos quatro meios de cultura avaliados.

No suco de laranja reconstituído, a esporulação atingiu um nível de 50%, ou seja o suco favoreceu a esporulação do microorganismo. Ao longo das 120 h avaliadas observou-se que o nível de esporulação para os meios YSG e K ágar manteve-se na mesma concentração. No meio BAT houve um favorecimento da esporulação com o aumento do tempo de incubação.

## Conclusões

Este resultado destaca a importância de se avaliar o comportamento de esporulação e buscar alternativas para enumerar e controlar a contaminação do processo industrial de suco de laranja por *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Uma vez presente no processamento, a célula consegue chegar a um alto nível de esporulação em apenas 24 h, estes esporos podem resistir a todas as etapas de processamento aplicados ao suco concentrado, e germinar no suco de laranja reconstituído, causando deterioração no produto final e perdas econômicas pelas indústrias.

## Agradecimentos

Agradeço a CAPS, CNPQ e ao meu orientador, pelo incentivo à ciência e pela oportunidade.

## Referências

- Farrand, S. G., Linton, J. D., Stephenson, R. J. & MacCarthy, W. V. (1983). **The use of response surface analysis to study growth of *Bacillus acidocaldarius* throughout the growth range of temperature and pH.** Microbiology, v.135, n.4, p.135: 272.
- Lee, S. Y., Ryu, S. R. & Kang, D. H. (2010). **Treatment with chlorous acid to inhibit spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in aqueous suspension and on apples.** Letters Applied Microbiology, 51, 164-169.
- Ray, B. (2003). **Fundamental Food Microbiology**, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 625 p.