

## AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *ALICYCLOBACILLUS* SPP. ISOLADOS DO PROCESSO INDUSTRIAL EM SUCO DE LARANJA RECONSTITUÍDO

Mariana Ramaldi Franzão<sup>a</sup> (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Márcia Maria dos Anjos Szczerepa<sup>b</sup> (Coorientadora), Jéssica Lima de Menezes<sup>b</sup>, Benício Alves de Abreu Filho<sup>c</sup> (Orientador), e-mail: baafilho@uem.br.

<sup>a</sup>Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

<sup>b</sup>Universidade Estadual de Maringá / Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos/Maringá, PR.

<sup>c</sup>Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR.

### Ciência e Tecnologia de Alimentos: Microbiologia de Alimentos.

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

### Resumo:

*Alicyclobacillus* spp. são bactérias termoacidofílicas formadoras de esporos responsáveis pela deterioração de alimentos ácidos. Sua presença vem gerando problemas para a indústria de sucos e bebidas devido à resistência de seus esporos, que sobrevivem à pasteurização, causando odor e sabor desagradáveis, e consequente perda do produto. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a capacidade germinativa de esporos de *Alicyclobacillus* spp. isolados do processamento industrial de suco de laranja concentrado em caldo BAT e suco de laranja reconstituído nas temperaturas de 5, 28 e 45 °C e tempos de incubação de 4, 24 e 48 horas cujos resultados mostram que, dentre as espécies estudadas, a espécie *A. acidiphilus* apresentou maior resistência à baixas temperaturas enquanto a espécie *A. acidoterrestris* apresentou maior resistência à altas temperaturas.

### Introdução

Bactérias do gênero *Alicyclobacillus* têm condições ideais de crescimento em ambientes quentes, ácidos e com poucos nutrientes, produzindo esporos com a capacidade de sobreviver à pasteurização típica da indústria. A germinação destes esporos origina células vegetativas que produzem substâncias capazes de alterar a qualidade de produtos cítricos, causando leve turbidez e/ou formação de sedimentos, além de odor e sabor alterados. Acredita-se que frutas frescas contaminadas introduzidas durante o processamento, sem a limpeza adequada são a principal forma de contaminação (Parish, 2005; Steyn et al., 2011; Ciuffreda et al., 2015). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a capacidade germinativa de esporos de

*Alicyclobacillus* spp. isolados do processamento industrial de suco de laranja concentrado em caldo BAT e suco de laranja reconstituído nas temperaturas de 5, 28 e 45 °C e tempos de incubação de 4, 24 e 48 horas.

## Materiais e métodos

### Cepas

Foram utilizadas as espécies de referência *A. acidoterrestris* 0244<sup>T</sup>, *A. hesperidum* 0246<sup>T</sup>, *A. acidiphilus* 0247<sup>T</sup> e *A. cycloheptanicus* 0297<sup>T</sup> da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA / UNICAMP.

### Obtenção dos esporos

As cepas foram ativadas em 3 mL de caldo BAT a 45 °C por 24 horas, em seguida uma alíquota de foi adicionada a outro tubo com 3 mL de caldo BAT (*Bacillus acidoterrestris* broth) e incubada novamente. Após 24 horas a amostra foi coletada através de swab estéril e inoculada pelo método de tapete em placas de Petri contendo ágar YSG (Yeast Starch Glucose Agar). As placas foram incubadas a 45 °C por 10 dias, para a esporulação das células. Após este período, os esporos foram coletados em tubos Eppendorf com água estéril, realizada a raspagem na superfície da placa, seguido por centrifugação a 12000 rpm por 8 minutos, sobrenadante descartado, pellet ressuspenso em água estéril e centrifugado novamente, repetindo esse procedimento três por vezes. Ao final, o pellet foi ressuspenso em 3 mL de água estéril, realizadas diluições seriadas seguidas de choque térmico (80 °C/10 minutos) e plaqueamento em ágar YSG com incubação a 45 °C por 24 horas para a contagem, a fim de verificar a concentração de esporos em cada tubo (Sokołowska et al., 2012).

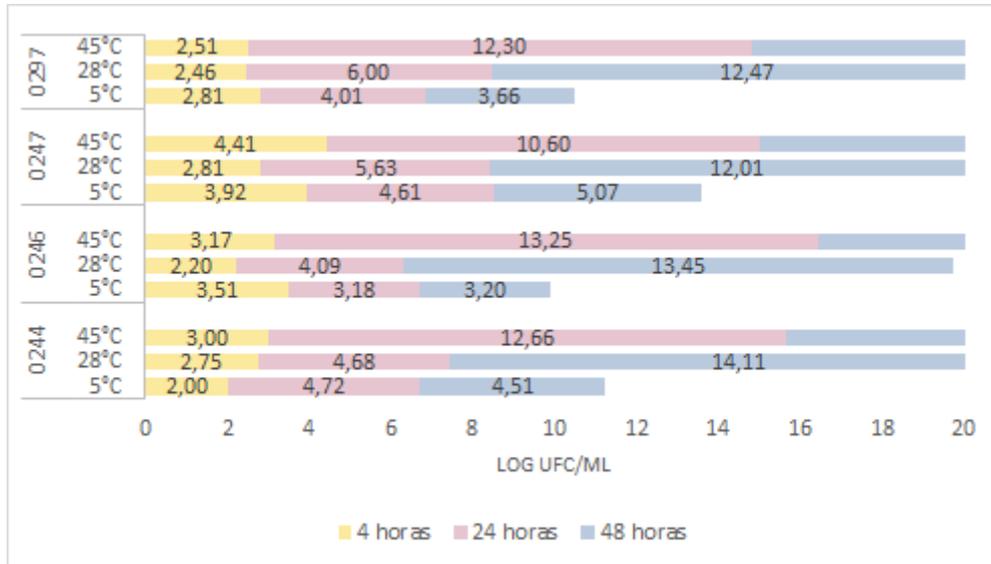
### Avaliação da germinação dos esporos

Os esporos foram inoculados em placas de 96 poços contendo 100 µL caldo BAT ou 100 µL de suco de laranja reconstituído a aproximadamente 11 °Brix, na concentração de 2 log UFC/mL, aplicado choque térmico (80 °C/10 minutos) e incubados nas temperaturas de 45 °C (temperatura ótimo do microrganismo), 28 °C (temperatura ambiente) e 5 °C (temperatura de refrigeração do suco pasteurizado). Após o período de 4, 24 e 48 horas, uma alíquota foi retirada e realizada a diluição seriada e plaqueamento em ágar YSG para verificar a quantidade de esporos germinados em cada temperatura e tempo de incubação.

## Resultados e Discussão

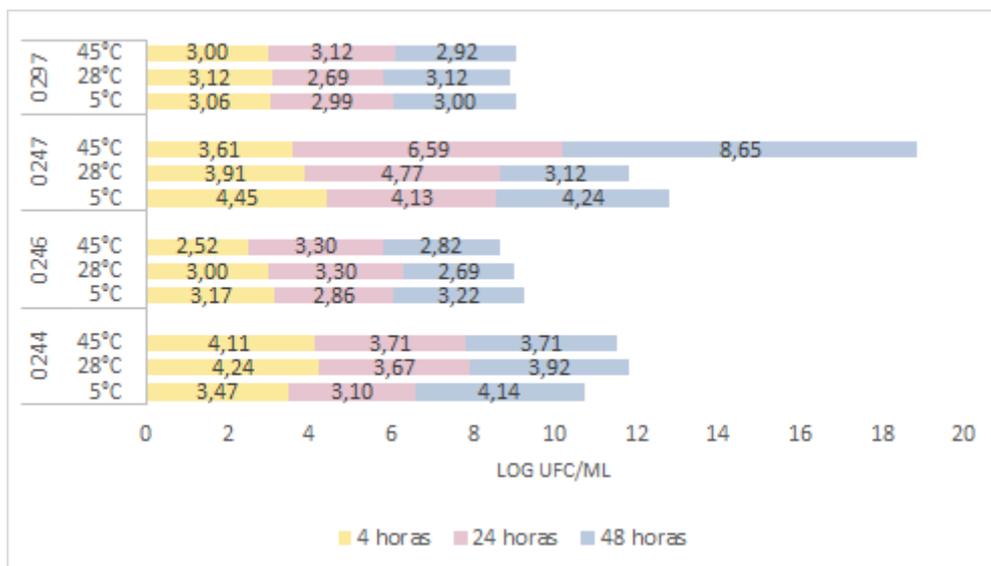
Para o caldo BAT, observou-se que, em 4 horas de incubação, a espécie *A. acidiphilus* (0247<sup>T</sup>) apresentou maior germinação de esporos, independente da temperatura. Em 24 horas, todas as espécies apresentaram germinação semelhante. E em 48 horas, a mesma espécie *A. acidiphilus* (0247<sup>T</sup>) apresentou decaimento a partir dos 28 °C, enquanto que a espécie *A.*

*acidoterrestis* (0244<sup>T</sup>) passou a apresentar maior germinação, como mostra figura 1.



**Figura 1** – Germinação de esporos da espécie *Alicyclobacillus* spp. nas temperaturas de 5, 28 e 45 °C após 4, 24 e 48 horas de incubação no caldo BAT.

Para o suco de laranja concentrado, observou-se que, em 24 horas de incubação, a espécie *A. acidiphilus* (0247<sup>T</sup>) apresentou maior germinação de esporos independente da temperatura, e em 5 °C para 4 e 48 horas, seguida da espécie *A. acidoterrestis* (0244<sup>T</sup>), que apresentou maior germinação nas demais temperaturas, como mostra a figura 2.



**Figura 2** – Germinação de esporos da espécie *Alicyclobacillus* spp. nas temperaturas de 5, 28 e 45 °C após 4, 24 e 48 horas de incubação no suco de laranja concentrado.

Para indústria, a ausência de *Alicyclobacillus* spp. é um requisito de qualidade, sendo a sua presença investigada através da quantificação de esporos. No entanto, até o momento pouco se sabe como ocorre o processo de esporulação e germinação desta bactéria, nem o tempo necessário ou quais condições afetam a cinética bacteriana para a esporulação e sua germinação.

## Conclusões

Os resultados demonstram a relevância de se estudar a esporulação e germinação das espécies de *Alicyclobacillus*, confirmando a sua permanência, mesmo após pasteurização e refrigeração, sendo a espécie *A. acidiphilus* mais resistente a temperaturas mais baixas, e a espécie *A. acidoterrestris*, mais resistentes a temperaturas mais altas. As espécies *A. hesperidum* e *A. cycloheptanicus* apresentaram baixa capacidade germinativa, tanto no caldo BAT quanto no suco de laranja concentrado.

## Agradecimentos

A equipe do Laboratório de Microbiologia de Água, Ambiente e Alimentos, UEM e CNPq pela oportunidade.

## Referências

Ciuffreda E. et al. ***Alicyclobacillus* spp.: New Insights on Ecology and Preserving Food Quality through New Approaches**. Microorganisms 3, p. 625 – 640, 2015.

Mickey E. Parish. **Spoilage of Juices and Beverages by *Alicyclobacillus* spp.** Microbiology of Fruits and Vegetables, 2005.

Sokołowska, B. et al. **The combined effect of high pressure and nisin or lysosyme on the inactivation *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice**. High Pressure Research, 32, p.119 –127, 2012.

Steyn C. E. et al. **Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment — A review**. International Journal of Food microbiology 147, p. 1 – 11, 2011.