



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

**Avaliação da eficácia de saneantes frente a  
bactérias ácido-termorresistentes isoladas  
do processamento de sucos de laranja**

Maria Inácia S. Stach Farah

Orientador: Dr. Gilson Paulo Manfio

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
1. BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

F221a Farah, Maria Inácia Simões Stach  
Avaliação da eficácia de saneantes frente a bactérias ácido-  
termorresistentes isoladas do processamento de sucos de laranja / Maria  
Inácia Simões Stach Farah. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Gilson Paulo Manfio  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Suco de laranja concentrado congelado. 2.Desinfecção e  
desinfetantes. 3.Alimentos – Microbiologia. 4.Suco de laranja –  
Deterioração. I.Manfio, Gilson Paulo. II.Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

# Índice

<b>Resumo .....</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>ix</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
2.1 Bactérias ácido-termofílicas associadas à deterioração de sucos de frutas ácidas 4	
2.2 <i>Alicyclobacillus</i> spp. e contaminação de sucos de frutas.....	5
2.3 Pontos críticos de contaminação na indústria de suco de laranja .....	9
2.4 Controle de bactérias ácido-termotolerantes no processo industrial.....	10
2.5 Saneantes e desinfetantes para indústrias de alimentos .....	13
2.5.1 Quaternário de amônio .....	14
2.5.2 Compostos clorados .....	15
2.5.3 Ácido peracético (AP) .....	16
<b>3 Objetivos .....</b>	<b>18</b>
<b>4 Material e Métodos.....</b>	<b>19</b>
4.1 Linhagens microbianas, meios de cultivo e soluções.....	19
4.2 Ensaios preliminares de eficácia de saneantes para determinação das faixas de atividade frente a linhagens referência.....	22
4.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de saneantes frente as linhagens-referência na forma esporulada e vegetativa .....	23
4.4 Avaliação da eficácia de diferentes sanitizantes frente a linhagens de ATSB potencialmente deteriogênicas isoladas de amostras de campo e fábrica.....	24
<b>5 Resultados e Discussão.....</b>	<b>26</b>
5.1 Levantamento e seleção de ATSB da Coleção de Culturas Tropical para o estudo 26	
5.2 Ensaio preliminar de redução decimal de ATSB nas condições de uso empregadas na indústria de suco de laranja .....	26
5.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória de diferentes moléculas frente as linhagens-referência de <i>Alicyclobacillus</i> na forma esporulada e vegetativa.....	31
5.4 Avaliação da eficácia de diferentes saneantes no controle e/ou eliminação de ATSB potencialmente deteriogênicos isolados do campo, processo industrial e suco 33	
<b>6 Conclusões.....</b>	<b>42</b>
<b>7 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>44</b>

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Gilson Paulo Manfio (Orientador)

---

Dra. Lara Durães Sette (Titular)

---

Dra. Silvia Yuko Eguchi (Titular)

---

Dr. Vanderlei Perez Canhos (Suplente)

Dedico e agradeço,

meus pais Lucy e Douglas, pela minha vida, dedicação e carinho sempre que precisei e meu marido e grande amigo Hafiz, por ser um grande companheiro e incentivador em todos os momentos.

## **Agradecimentos**

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

À Fundação André Tosello e a Bayer S.A pela infra-estrutura cedida.

À FAPESP pelo apoio financeiro nos primeiros meses de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos e a Dra. Lara Durães Sette pelo apoio, correções e sugestões.

Um agradecimento especial:

Ao Gilson pelo incentivo, pelo apoio, por estar sempre presente com suas sugestões e seus conhecimentos e pela orientação do trabalho.

À Silvia pela ajuda, sugestões e parceria de trabalho.

Aos amigos Fabiana e Benício pelas palavras sempre positivas e otimistas.

Aos amigos Jean Marc Vesselle e Roberto Griebel, por tornar possível a conclusão deste trabalho.

Às Professoras Dra. Helena de Godoy e Dra. Hélia H. Sato pela dedicação e orientação.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

Muito obrigada!!!

## Resumo

As bactérias do gênero *Alicyclobacillus*, organismos esporulados ácido-fílico-termofílicos com elevada termoresistência (*Acidothermophilic sporulating bacteria* - ATSB), são capazes de sobreviver ao processo usual de pasteurização do suco de laranja e de crescer em sucos reconstituídos, sendo uma preocupação constante das indústrias de sucos concentrados ao redor do mundo. Com o intuito de estudar sanitizantes compatíveis com a utilização na indústria de alimentos, capazes de reduzir ou eliminar a forma vegetativa e/ou esporulada destes isolados, foi avaliada a eficácia de quatro compostos de ampla utilização: ácido peracético (AP), dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>), hipoclorito de sódio (NaOCl) e quaternário de amônio (QUAT).

Os produtos de formulação comercial foram testados frente as linhagens-referência de três espécies de *Alicyclobacillus* (*Alicyclobacillus acidophilus* DSM 14558<sup>T</sup>, *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498<sup>T</sup> e DSM 3922 e *Alicyclobacillus cycloheptanicus* DSM 4006<sup>T</sup>) isoladas de produtos alimentícios e 33 isolados, potencialmente deteriorogênicos, provenientes de vários pontos do processo produtivo de indústrias de suco de laranja da região Sudeste do Brasil. O objetivo final foi avaliar a eficácia dos diferentes compostos frente a esporos e células vegetativas, e determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e tempo de contato (*time kill*) para orientar a utilização destes compostos no controle de ATSB na indústria. Os ensaios foram realizados nas concentrações de uso e tempos de contato sugeridos para uso industrial, com o intuito de avaliar a eficácia dos produtos sob condições econômica e tecnicamente viáveis de aplicação (custo de saneante e tempo de contato no processo industrial).

Nas condições de ensaio utilizadas, os valores CMI de AP e NaOCl não foram diferentes nos ensaios com células vegetativas ou esporos das linhagens-referência. Para ClO<sub>2</sub> e QUAT, os valores de CMI foram maiores para células vegetativas na maioria das linhagens testadas.

Nos ensaios de *time kill* realizados nas condições de uso na indústria, AP 150 ppm e ClO<sub>2</sub> 10 ppm apresentaram redução da população inicial de células vegetativas e esporos inferior a 40%. Ensaios de *time kill* realizados com *pools* de esporos de isolados de campo, processo e suco resultaram em redução entre 90 a 99% para os quatro compostos testados.

Os resultados obtidos sugerem que os quatro compostos testados apresentam ação bactericida e ou bacteriostática podendo auxiliar no controle e ou diminuição da proliferação de ATSB, estes agentes não foram eficazes para se obter a redução logarítmica requerida (5 logs) e, portanto, não são adequados para utilização como agentes de sanitização.



## Abstract

Bacteria from the genus *Alicyclobacillus* are sporulated acidothermophilic heat resistant microorganisms (ATSB). These bacteria have the ability to survive the usual pasteurization process applied in the production of concentrated orange juice, and may also grow in the reconstituted juices, being a constant concern of the orange juice industry all over the world. In the current study, we evaluated the efficacy of four sanitizers largely used in the food industry in order to determine reduction or elimination of ATSB: peracetic acid (PAA), chlorine dioxide ( $\text{ClO}_2$ ), sodium hypochlorite ( $\text{NaOCl}$ ), and quaternarium ammonium (QAC). The commercially formulated products were tested against type strains of three species of *Alicyclobacillus* (*Alicyclobacillus acidophilus* DSM 14558<sup>T</sup>, *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498<sup>T</sup> and DSM 3922 e *Alicyclobacillus cycloheptanicus* DSM 4006<sup>T</sup>) isolated from food products and also 33 strains isolated from various points of the industrial process from factories located in the southeast Brazil. Spores and vegetative cells were assayed in order to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and the time kill parameters for using these compounds in the control of ATSB in industry. Concentration range and contact times suggested for industrial applications were selected to reflect industrial usage. MIC values of PAA and  $\text{NaOCl}$  were not different for either vegetative cells or spores of the type strains. For  $\text{ClO}_2$  and QAC, MIC values were higher for vegetative cells of most of the strains tested. Time kill was performed according to industrial parameters, that is, 150 ppm PAA and 10 ppm  $\text{ClO}_2$ , with less than 40% reduction of the initial population of vegetative cells and spores. Analysis of time kill done using a pool of spores from cultures isolated from farm, process and juice demonstrated a reduction between 90 and 99% for all four products tested. These results suggest that all four products may kill ATSB spores. They have bactericide and/or bacteriostatic action and can help in a proliferation control of ATSB, the agents did not achieve the minimum of 5 logs required, and, thus, were not adequate to be used as sanitizing.

## 1 Introdução

A indústria de suco de laranja brasileira é atualmente responsável por aproximadamente 30% do volume de suco de laranja concentrado congelado (*frozen concentrated orange juice*, FCOJ) comercializado no mundo. Desta forma, a exportação de sucos concentrados de laranja contribui significativamente para a balança comercial do país, além do processo de cultivo e produção gerarem um grande número de empregos e renda nas regiões produtoras. Em 2000/2001 o Brasil chegou a atingir a marca de 1.234.274 toneladas de suco de laranja concentrado exportados (<http://www.abecitrus.com.br>).

Assim, a qualidade dos produtos citrícolas é fundamental para o contínuo crescimento do setor, influenciando na competitividade do Brasil no cenário internacional. A qualidade inadequada dos sucos e demais subprodutos de processamento da laranja, incluindo, os óleos essenciais, essências e polpa, em qualquer uma das empresas produtoras e/ou exportadoras, comprometem a imagem do país como um todo, acarretando sérios prejuízos ao mercado presente e futuro.

O suco concentrado de laranja possui pH ao redor de 3,0, baixa atividade de água, teor de açúcar elevado (65° Brix) e baixo potencial de oxigênio dissolvido. Este produto é submetido a um tratamento térmico na fase final do processamento, constituindo, assim, um conjunto de fatores que eliminam a grande maioria dos organismos patogênicos durante o processo e o não crescimento de microrganismos deteriorogênicos no produto final.

Microrganismos contaminantes de sucos processados tradicionalmente monitorados por exigência da legislação incluíam bolores, leveduras e algumas poucas bactérias de importância médico-sanitária (HATCHER *et al.*, 1992). Na Europa, na década de 80, foi isolada uma espécie de *Bacillus* acidofílico em suco de maçã, que foi identificada como um novo tipo de bactéria deteriorogênica de suco de frutas, formadora de esporos e ácido-termo resistente (CERNY, 1984).

Este microrganismo foi depois reclassificado em um novo gênero e denominado *Alicyclobacillus acidoterrestris* (DEINHARD, 1987; WISOTZKEY *et al.*, 1992).

A sigla ATSB foi cunhada para representar o grupo de bactérias capazes de sobreviver e crescer em condições ácidas e de temperatura elevada (EGUCHI *et al.*, 2001a). As ATSB não são patogênicas (SILVA & GIBBS, 2001) e tem sido detectada em vários episódios de deterioração de bebidas ácidas em diferentes países (PETTIPHER *et al.*, 1997). Os esporos destas bactérias, além de possuírem resistência à pasteurização nas condições de tratamento normalmente aplicadas aos sucos de fruta ácidos, podem germinar e causar a deterioração do produto final reconstituído, caso este seja armazenado sob condições de temperatura elevada (EGUCHI *et al.*, 2001c).

As alterações de sabor e odor do suco fazem com que a comercialização destes seja inviável. Episódios de contaminação podem comprometer a imagem do produto em uma escala internacional, independente do fabricante, e comprometer a comercialização, como foi verificado nos episódios de contaminação de sucos ocorridos no verão de 1994-95 na Europa (EGUCHI *et al.*, 2001a).

Devido à ocorrência amplamente disseminada de esporos e células vegetativas de ATSB na superfície da própria laranja em fruta colhida no campo e no ambiente de indústria, principalmente nas águas de condensação (água *taste*) recicladas utilizadas na lavagem das frutas e equipamentos, e muitas vezes na diluição do próprio suco concentrado (EGUCHI *et al.*, 2001b), se torna fundamental monitorar e controlar o nível de contaminação nas amostras durante o processo e equipamentos da indústria, visando evitar a contaminação do suco processado por ATSB.

Devido à sua importância estratégica como *commodity* para o país e visando contribuir com a qualidade do suco de laranja brasileiro, foi idealizado um projeto de pesquisa com o objetivo de avaliar agentes

sanitizantes para ATSB compatíveis para utilização na indústria de alimento, segundo a Portaria 15 do Ministério da Saúde, publicada em 23 de Agosto de 1988 (Ministério da Saúde, 1988).

Assim, o controle e/ou eliminação eficaz da contaminação por ATSBs no início do processo de fabricação de sucos e nos equipamentos associados podem contribuir para a diminuição da população microbiana na linha de processamento e, conseqüentemente, na melhoria do produto final.

## **2 Revisão Bibliográfica**

A análise microbiológica de produtos alimentícios industrializados, como é o caso de sucos concentrados de laranja, envolve a detecção de contaminantes específicos e potenciais deteriorogênicos, como bactérias lácticas, bolores e leveduras (HATCHER *et al.*, 1992).

Devido às suas características físico-químicas, incluindo pH ao redor de 3,0, baixa atividade de água, teor de açúcar elevado (65° Brix) e baixo potencial de oxigênio dissolvido, o suco concentrado de laranja não é um substrato adequado para o desenvolvimento da grande maioria dos microrganismos deteriorogênicos comumente associados aos alimentos. Contudo, estas mesmas características, associadas ao processamento industrial do suco, podem selecionar os microrganismos que são capazes de sobreviver aos tratamentos térmicos empregados e de crescer em baixos valores de pH.

No caso de sucos de laranja concentrado congelado, armazenado sob baixas temperaturas (-18° C), a ação deteriorogênica dos microrganismos é inibida. Entretanto, quando o suco concentrado (65° Brix) é reconstituído com água, ficando com uma concentração de 11° Brix, o produto fica susceptível à eventual contaminação e à ação deteriorogênica dos microrganismos.

Após sua reconstituição, o suco é pasteurizado e as formas dormentes de bactérias (esporos) encontram condições adequadas para

germinação e crescimento, o que pode, em determinadas condições, levar à deterioração do produto (EGUCHI *et al.*, 1999). A deterioração pode ocorrer de diversas formas, incluindo a degradação de componentes do produto, como carboidratos e vitaminas, produção de odores, sabores ou coloração indesejáveis, e alterações de pH e textura (UBOLDI EIROA *et al.*, 1984).

## **2.1 Bactérias ácido-termofílicas associadas à deterioração de sucos de frutas ácidas**

As espécies de bactérias deteriogênicas freqüentemente associadas aos sucos de frutas processados (alimentos ácidos pH < 4,5) incluem microrganismos pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e bactérias acetogênicas (MURDOCK & HATCHER, 1975). A maioria desses organismos é acidofílico estrito ou acidotolerante, termotolerante ou termofílico, tendo como característica comum elevada resistência à temperatura.

Os *Alicyclobacillus* foram considerados, recentemente, organismos-alvo na avaliação da qualidade de produtos ácidos termoprocessados, sendo associados à deterioração de sucos de frutas, bebidas acidificadas e água isotônica em diversas regiões do mundo (YAMAZAKI *et al.*, 1996). Trabalhos iniciais, como o de DEINHARD (1987), relatam o isolamento destes organismos em sucos de maçã na Alemanha. No Brasil, os trabalhos de EGUCHI *et al.* (2001a,b,c) demonstraram o isolamento de *Alicyclobacillus* de vários substratos e etapas do processamento industrial de suco de laranja no Estado de São Paulo.

Estudos mais recentes incluem o isolamento de linhagens de bactérias esporuladas acidotermofílicas com características similares às de *A. acidoterrestris* de sucos de frutas não-deteriorados na Itália (PREVEDI *et al.*, 1995), de amostras de bebida ácida e bebida isotônica deteriorada no Japão (YAMAZAKI *et al.*, 1996) e de amostras não

deterioradas de sucos de frutas e de tomate enlatado (WEBSTER *et al.*, 1996).

A participação da ATSB na deterioração de sucos de laranja concentrados foi uma descoberta relativamente recente, trazendo a necessidade de se conhecer mais profundamente o comportamento deste grupo de microrganismos e de se estudar as possíveis formas de controlar ou eliminar as contaminações, seja na sua origem (solo, água, etc.) e/ou nas etapas de industrialização dos sucos ácidos (SPLITTSTOESSER, 1994).

A presença de ATSB é indesejável devido à produção de *off-flavor* em produtos acabados, afetando as características organolépticas do suco (CERNY, 1984). As características de deterioração são a presença de um sabor e odor desagradáveis, o aumento da turbidez do produto e a formação de uma sedimento branco no fundo da embalagem (EGUCHI *et al.*, 2000a).

## **2.2 *Alicyclobacillus* spp. e contaminação de sucos de frutas**

Os *Alicyclobacillus* são microrganismos heterotróficos saprófitos e têm sido isolados de diferentes habitats geotérmicos e não geotérmicos. Os habitats geotérmicos são representados por águas e sedimentos de fontes termais (temperaturas superiores a 50°C), sedimentos de fundo de córregos e riachos quentes (temperaturas em torno de 100°C), solos úmidos em zonas de ocorrência de fumarolas (regiões vulcânicas) e fontes quentes submarinas (regiões de ilhas vulcânicas e zonas de atividade vulcânica no piso oceânico). Outros substratos, não geotérmicos, como solos, compostagem orgânica, esterco e alimentos que recebem tratamento térmico, também são fontes naturais para o isolamento de *Alicyclobacillus* (EGUCHI *et al.*, 2000a).

A espécie *A. acidocaldarius* está associada a habitats geotérmicos (fontes termais) aquáticos ou terrestres. A sua ocorrência nesses habitats foi relatada por vários autores em diversas partes do mundo,

incluindo Japão (UCHINO & DOI, 1967), E.U.A. (DARLAND & BROCK, 1971), Itália e Rússia (LOGINOVA *et al.*, 1978).

*Alicyclobacillus acidoterrestris* e *Alicyclobacillus cycloheptanicus* foram isolados de diferentes tipos de solo (HIPPCHEM *et al.*, 1981; DEINHARD *et al.*, 1987). Esse fato, de que organismos acidofílicos obrigatórios sejam encontrados em ambientes considerados de pH neutros, pode ser explicado pela existência de micro-habitats ácidos no substrato, como na superfície de grãos de areia ou nas áreas próximas às raízes das plantas. Segundo HIPPCHEM *et al.*, (1981) os *Alicyclobacillus* estão amplamente distribuídos nos solos e a sua detecção depende do refinamento das metodologias de cultivo e de isolamento, possivelmente relacionados com o requerimento da presença de compostos minerais específicos.

A identificação de *Alicyclobacillus* está baseada nas características morfológicas das células e colônias, crescimento sob diferentes condições de temperatura e pH, testes de utilização de fonte de carbono e ensaios bioquímicos tradicionais e testes quimiotaxonômicos. Particularmente a análise dos ácidos graxos celulares (FAMES) proporciona informação importante para diferenciar *Alicyclobacillus* spp. de outras espécies de bacilos acidotermofílicos (DEINHARD, 1987; BERKELEY & ALI, 1994).

Até 1992, as três espécies acidotermofílicas de *Alicyclobacillus* foram classificadas no gênero *Bacillus* e nomeadas *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* e *Bacillus cycloheptanicus*. Contudo, a presença ácidos graxos cíclicos, como  $\omega$ -alíciclo contendo ciclohexil ou cicloheptil, como principais componentes da membrana celular, diferenciou estas espécies das outras espécies do gênero *Bacillus*. Ainda, análises fenotípicas e moleculares demonstraram a heterogeneidade de vários grupos do gênero *Bacillus*, sugerindo que este poderia ser dividido em três ou mais diferentes gêneros (PRIEST *et al.*, 1981; STAKEBRANDT *et al.*, 1987; WISOLTZKEY *et al.*, 1990; ASH

*et al.*, 1991; DE BARTOLOMEO *et al.*, 1991; WHITE *et al.*, 1993). Análise comparativa na seqüência de RNA ribossomal 16S e perfis de ácidos graxos da membrana celular levaram à reclassificação de *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* e *B. cycloheptanicus* no gênero *Alicyclobacillus* (WISOTZKEY *et al.*, 1992).

Em relação à contaminação de sucos ácidos, CERNY *et al.* (1984) foram os primeiros a isolar um bacilo acidofílico a partir de suco pasteurizado de maçã deteriorado, que apresentou capacidade de crescimento em temperaturas na faixa de 26 a 55° C e pH entre de 2,5 e 6,0. Seus esporos possuem resistência térmica extremamente elevada, podendo sobreviver à pasteurização industrial e germinar em condições de baixo pH. Tal microrganismo foi classificado como *Bacillus acidoterrestris* (DEINHARD, 1987), sendo reclassificado, em 1992, no gênero *Alicyclobacillus* (WISOTZKEY *et al.*, 1992).

Não há nenhum outro relato de deterioração causada por *Alicyclobacillus* até 1994-1995. A ocorrência desses bacilos em sucos de frutas e no suco de laranja concentrado congelado (FCOJ) ganhou importância após episódios envolvendo sucos embalados na Europa, que apresentaram deterioração, coincidindo com períodos de verões muito quentes nos anos de 1994 e 1995 e processos *hot-fill* (PINHATTI *et al.*, 1997).

Porém, a incidência de *Alicyclobacillus* não está diretamente associada à deterioração dos sucos e sua presença nem sempre é detectada na forma de alterações no produto. A detecção de *Alicyclobacillus* em sucos de frutas não deteriorados (PREVEDI *et al.*, 1995) sugere que a deterioração seja incidental, requerendo condições adequadas para seu desenvolvimento.

No entanto, cabe salientar que *Alicyclobacillus acidoterrestris* é um microrganismo potencialmente deteriorogênico. As características da deterioração causada por ATSB (EGUCHI *et al.*, 2001a) são:



- a presença de sabor e de odor desagradáveis, embora muitas vezes, o odor produzido pela deterioração seja pouco perceptível;
- não há formação de gás;
- pouca ou nenhuma alteração do pH;
- pode, em certos casos, causar aumento da turbidez do produto e a formação de um sedimento branco no fundo da embalagem.

Uma das principais causas do aparecimento de odor e sabor desagradáveis (*off-flavor*) é a formação do composto 2,6-dibromofenol, na ordem de partes por trilhão (ppt), bem como, traços de 2-metoxifenol (guaiacol) em sucos de frutas e bebidas (BORLINGGHAUS & ENGEL, 1997; BROWN, 1996).

Em 1994, SPLITTSTOESSER *et al.* isolaram linhagens de bacilos acidofílicos a partir de suco de maçã industrializado e de uma bebida de maçã e groselha envasadas a quente. Os sucos apresentavam odor desagradável, não acusavam formação de gás e eram levemente turvos. As linhagens pesquisadas apresentaram características de acidofilia semelhantes às de *B. acidocaldarius* descritos por DARLAND & BROCK (1971) e capacidade de crescimento em suco de maçã, mas, surpreendentemente, um dos isolados não cresceu em suco de laranja.

McINTYRE *et al.* (1995) recuperaram bacilos esporulados acidofílicos de sucos que foram reconstituídos a partir do concentrado e pasteurizados pelo sistema *hot-fill hold* (envase a quente). Neste estudo a deterioração foi caracterizada, mais uma vez, pela produção de odores desagradáveis e crescimento visível. Contudo, os autores não concluíram a identificação das linhagens isoladas.

*Alicyclobacillus acidoterrestris* (DEINHARD, 1987; WISOTZKEY *et al.*, 1992; WEBSTER *et al.*, 1996) tem sido associado com a deterioração incidental de sucos no Reino Unido e Alemanha. Este organismo é resistente à pasteurização, capaz de crescer em vasta faixa de

temperatura, e pode produzir o guaiacol e outros compostos. Contudo existe pouca informação disponível sobre a incidência e níveis de *A. acidoterrestris* em sucos concentrados e produtos finais (PETTIPHER *et al.*, 1997). Em um relato no Japão, *Alicyclobacillus acidoterrestris* foi isolado de bebidas ácidas deterioradas (YAMAZAKI *et al.*, 1996) e causou deterioração do tipo *flat-sour*, sendo capaz de sobreviver em bebidas ácidas. Semelhante bactéria acidotermofílica e formadora de esporo foi isolada em bebida ácida nos U.S.A. (SPLITTSTOESSER *et al.*, 1994; McINTYRE *et al.*, 1995).

A deterioração de suco de frutas por *Alicyclobacillus acidoterrestris* é caracterizada pelo odor anti-séptico atribuído ao guaiacol. ORR *et al.*, (2000) verificaram o limiar do guaiacol no suco de maçã por análise sensorial e estimaram a população de *A. acidoterrestris* e o tempo de incubação a 21°C e 37°C necessários para a determinação do guaiacol. Neste estudo, o conteúdo de guaiacol no suco de maçã não correlacionou-se com o número de células da bactéria no suco.

### **2.3 Pontos críticos de contaminação na indústria de suco de laranja**

A lavagem das frutas que entram no processo é primordial, pois afeta diretamente o nível de ATSB no suco e também contribui para a introdução contínua de contaminantes ao sistema, sendo um foco de contaminação. Porém, o uso de cloro para o controle microbiológico da fruta na etapa de lavagem não apresenta eficiência comprovada sobre os ATSB.

A primeira fase do processamento do suco (entrada, extrator, centrífuga) não é propícia para um crescimento intenso de ATSB, desde que a temperatura do sistema seja inferior a 30°C. Desta forma, procedimentos de higiene adequados deverão eliminar a instalação de focos de ATSB. As etapas subsequentes, que são realizadas sob gradativo aumento de temperatura, podem propiciar a germinação e

crescimento de ATSB, criando focos de contaminação no processo (EGUCHI *et al.*, 2001a).

Condições climáticas influenciam o desenvolvimento de ATSB. Climas mais secos (índice pluviométrico baixo) propiciam sua disseminação com a poeira e com as chuvas, o índice de contaminação é reduzido, pois as frutas são "lavadas", ou seja, resíduos do solo presentes na superfície das frutas e folhas são lixiviados, diminuindo assim a contaminação por ATSB (EGUCHI *et al.*, 2000a).

#### **2.4 Controle de bactérias ácido-termotolerantes no processo industrial**

Os fatores mais importantes no controle de ATSB no processo industrial são: origem e qualidade da água utilizada na indústria, sistema de lavagem dos frutos, limpeza e assepsia das instalações e a existência de focos de proliferação de contaminação.

Alguns fatores, como o Brix e adição de óleos essenciais, não estão associados à qualidade microbiológica da fruta em processamento, mas podem representar uma forma de introdução de propágulos ao produto final. A contaminação também pode ocorrer em tubulações e instalações em contato com o suco, devido a existência de um ou mais focos de contaminação. Muitas vezes, as etapas de pasteurização/evaporação não são eficazes para a eliminação dos esporos de ATSB (EGUCHI *et al.*, 2000c).

As águas da etapa de lavagem dos frutos e as que são recicladas na produção podem afetar a enumeração de *Alicyclobacillus* do produto final, uma vez que o contato pode ocorrer na fase inicial do processo. Qualquer introdução de ATSB nesta fase influi no processo como um todo, pois o contaminante não só é carregado no suco, mas também pode se instalar na linha de processamento e tubulações, originando fontes contínuas de contaminação. Esporos de *Alicyclobacillus* podem

estar presentes em todos os pontos de coleta da linha de produção do suco concentrado de laranja (EGUCHI *et al.*, 2000b).

A resistência térmica de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, também foi investigada por MURAKAMI *et al.*, (1998), com testes em tampão citrato, tampão fosfato e pH, a resistência termal dos esporos de *A. acidoterrestris* foi pouco afetada pela variação de pH e calor.

KOMITOPOULOU *et al.*, (1999), verificaram o crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* nos sucos de laranja, uva, maçã com uma população bacteriana ente  $10^4$ - $10^5$  UFC/mL e uma produção de sabor adstringente. O tempo de redução decimal foi determinado a 80, 90 e 95°C em cada suco e confirmada a resistência ao calor dos esporos acima da condição normal de pasteurização dos sucos. Com a presença de nisina, substância estável a 100° C por 10 minutos que possui atividade tanto na célula vegetativa como em esporos e sua ação ocorre após o processo à quente, o valor D decresceu por volta de 40% e o MIC para a nisina frente aos esporos numa temperatura de 25°C foi somente de 5 unidades internacionais (UI)/mL. Os resultados indicam que o emprego da nisina tem um potencial vantajoso no controle destes microrganismos nos sucos de frutas.

A alta resistência de esporos de *Alicyclobacillus* em suco de laranja foi verificada por EIROA *et al.*, (1999), na qual a cultura pura de suspensão de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498 foi submetida a diferentes tratamentos térmicos (60°C por 60 min, 60°C por 30 min, 70°C por 20 min, 80°C por 10 min, 80°C por 30 min e em fervura por 5 min) para determinar a melhor condição de ativação dos esporos do suco de laranja concentrado de 11 diferentes fornecedores. Foi avaliada a presença de esporos acidotermofílicos pela técnica do número mais provável, utilizando o *Bacillus acidocaldarius*, inoculado em caldo e incubado a 44°C por cinco dias, após uma ativação dos esporos. Das amostras de suco de laranja examinadas, 14,7% foram positivas para *Alicyclobacillus*. Os resultados demonstraram a ocorrência de

*Alicyclobacillus* em suco de laranja e a alta resistência ao calor dos esporos, que podem sobreviver aos tratamentos térmicos normalmente usados no processamento de suco de laranja nas indústrias.

YAMAZAKI *et al.*, (2000) utilizaram a nisina como inibidor do crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em bebidas ácidas. O crescimento da bactéria foi inibido pela adição de 25 a 50 UI mL<sup>-1</sup> de nisina em bebidas de laranja e frutas mistas, mas não foi inibido quando adicionado 600 UI mL<sup>-1</sup> em bebida de maçã. Baseado nestes resultados, os autores sugerem que se pode empregar nisina na prevenção da deterioração de bebidas ácidas causadas por este microrganismo, exceto em bebidas ácidas de maçã.

SHEARER *et al.* (2000) utilizaram a pressão, temperatura média e produtos químicos com objetivo de inibir o crescimento microbiano ou inativar os esporos de *Bacillus* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* em alimentos num sistema modelo de ágar. O tratamento combinado com laurato sacarose, alta pressão hidrostática e pouco calor foi avaliado, resultando nas reduções decimais na ordem de 3 a 5,5 log<sub>10</sub> UFC/mL numa população inicial de 10<sup>6</sup> UFC/mL de *Bacillus subtilis* no leite, *Bacillus cereus* na carne, *Bacillus coagulans* no tomate (pH 4,5), *Alicyclobacillus* sp. em suco de tomate (pH 4,5) e *Alicyclobacillus* sp. em suco de maçã. O efeito inibitório observado nos esporos do *Bacillus* e *Alicyclobacillus* pela combinação de tratamento em pressão, pouco calor e laurato de sacarose parece ser promissor na aplicação em alimentos cujas alternativas tradicionais de tratamento e de alta temperatura não podem ser aplicados.

Orr *et al.*, (2000) reportaram a eficácia de desinfetantes em esporos de *A. acidoterrestris*. Estes resultados apresentaram reduções de 2,2; 0,4 e 0,1 log no número de esporos viáveis de uma mistura de cinco linhagens de *A. acidoterrestris*, onde os esporos foram adicionados em 200 ppm de cloro, 500 ppm de clorito de sódio acidificado e 0,2% de solução de peróxido de hidrogênio respectivamente, por 10 minutos,

quando tratadas com 1000 ppm de cloro e 4% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtiveram uma redução superior a 5 logs.

Resultados preliminares obtidos revelam que os *Alicyclobacillus* são resistentes ao tratamento por cloração, necessitando de dosagens muito elevadas de cloro para a sua inativação. Este fato, associado à extrema termorresistência e termofilia, tem se instalado como um problema tecnológico muito grande, em especial no processamento de sucos. Sucos de laranja, por exemplo, não toleram tratamento térmico severo, devido à perda das suas características organolépticas (CERNY, 1984).

## **2.5 Saneantes e desinfetantes para indústrias de alimentos**

Os saneantes são agentes que reduzem o número de microrganismos contaminantes de ambientes inanimados para o nível de segurança requerido. Estes compostos são geralmente usados em superfície em contato com alimentos e aceitos como produtos de enxágüe. Existem duas classes de sanitizantes, segundo definição da EPA (Environmental Protection Agency):

- Sanitizantes que não possuem contato direto com a superfície do alimento: tem de apresentar uma redução de 99,9% dos microrganismos ou 3 logs após o tempo de contato de 5 minutos.
- Sanitizantes usados em contato direto com a superfície do alimento: tem de apresentar 99,999% dos microrganismos ou 5 logs após 30 segundos.

Os desinfetantes, agente químico que mata as formas vegetativas, mas não necessariamente as formas esporuladas, não são definidos em termos de percentagem ou log de redução específico como os sanitizantes. (<http://www.cfsan.fda.gov>).

O FDA (Food and Drug Administration, USA) tem permitido o uso de 6 principais classes de saneantes para uso em contato direto com alimentos: compostos contendo cloro, compostos contendo iodo,

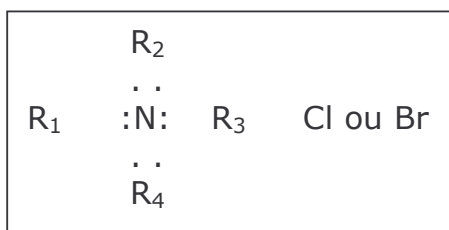
saneantes de quaternário de amônio, saneantes de ácido aniônico saneantes de ácido carboxílico e compostos de peroxiácido.

No Brasil os princípios ativos autorizados pelo Ministério da Saúde para utilização como saneantes em indústrias de alimentos, segundo Portaria no. 15 de 23 de Agosto de 1988 são: quaternário de amônio, compostos orgânicos e inorgânicos liberadores de cloro ativo e iodo e seus derivados.

Os produtos mais usados na indústria de sucos de frutas têm sido peróxido de hidrogênio e dióxido de cloro, este último obtido quase sempre na própria empresa.

### 2.5.1 Quaternário de amônio

Os compostos quaternários de amônio, também conhecidos como Quats, possuem 4 grupos orgânicos ( $R_1, R_2, R_3$  e  $R_4$ ) como alquil, metil, benzil e cetilbenzil e estão ligados a um átomo de nitrogênio que produz a carga positiva da molécula (cátion) sendo então o radical orgânico deste composto e o cloro ou bromo são usualmente o ânion (TORDER, 1993).



O mecanismo de ação não é muito bem conhecido, mas pode ser devido ao envolvimento do composto na membrana externa da célula causando uma falha na parede da membrana e conseqüentemente o rompimento da mesma e liberação das organelas e enzimas de inibição. Uma outra hipótese seria a desnaturação das proteínas celulares e ruptura da membrana celular.

O quaternário de amônio forma um filme bacteriostático depois de aplicado sobre a superfície. Como tem ação bacteriostática estes compostos são seletivos na destruição de vários compostos. Os quats não matam os esporos das bactérias, mas podem inibir seu crescimento (MARRIOT, 1999).

Os quats têm eficácia contra uma grande variedade de microrganismos, incluindo leveduras e fungos, em concentrações de 5 a 10 mg/L são efetivos para bactérias Gram-positivas e na concentração de 50 a 100 mg/L para bactérias Gram-negativas (PAULUS, 1993).

### **2.5.2 Compostos clorados**

Cloro líquido, hipocloritos, cloramina inorgânica e orgânica e dióxido de cloro funcionam como saneantes e tem atividades microbicidas variáveis.

Os compostos clorados têm vários modos de ação, dependendo do composto usado: quebra da síntese protéica, descarboxilase oxidativa de aminoácidos para nitritos e aldeídos, reações com ácidos nucleicos, purinas e piridimidinas, desbalanceamento do metabolismo pela perda de enzimas chave, alteração na permeabilidade celular, entre outros.

Compostos liberadores de cloro são conhecidos por estimular a liberação de esporos e subseqüentemente inativar esta germinação (TORDER, 1993).

#### **2.5.2.1 Hipoclorito de sódio**

Os hipocloritos são os mais utilizados na forma de cloro, o hipoclorito de sódio é o que tem maior aplicação (TORDER, 1993).

Os esporos bacterianos são mais resistentes que células vegetativas para hipocloritos, o tempo requerido para reduzir 90% da população microbiana pode variar de 7 segundos a mais de 20 minutos (ODLAUG, 1981). A concentração de cloro livre necessária para inativar



esporos de bactérias (1000 ppm) é 10 a 1000 vezes mais elevado do que o requerido para células vegetativas (0,6 a 13 ppm) (MARRIOTT,1999).

### 2.5.2.2 Dióxido de cloro

O dióxido de cloro tem uma atividade microbiana maior que os outros compostos clorados (PAULUS, 1993), possui amplo espectro microbiano como os outros compostos clorados e comumente é gerado pela reação (TORDER, 1993):



**Tabela 1:** Redução bacteriana com dióxido de cloro.

Microrganismos	ClO <sub>2</sub> (ppm)	Tempo de contato	% de redução
<i>S. aureus</i>	1	60 segundos	99,999
<i>E.coli</i>	0,15	5 minutos	99,9
	0,25	60 segundos	>99,999
<i>S. faecalis</i>	1	15 segundos	>99,999
<i>Lac.brevis</i>	0,15	5 minutos	99,9
	1	5 minutos	>99,999
<i>Ps. Aeruginosa</i>	1	60 segundos	>99,999

### 2.5.3 Ácido peracético (AP)

O ácido peracético, também chamado de peróxido de ácido acético ou ácido peroxiacético, representa uma nova classe de saneantes e foi introduzido no mercado dos E.U.A na década de 80. É um potente agente antimicrobiano, sua atividade é rápida em baixas concentrações

contra um amplo espectro de microrganismos, tem ação esporicida em baixas temperaturas e na presença de matéria orgânica.

O ácido peracético tem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sua ação antimicrobiana pode ocorrer pela desnaturação protéica e ruptura da permeabilidade da membrana celular. É um sanitizante de grande interesse para processo da indústria de alimentos devido ao seu resíduo ser somente água, oxigênio, ácido acético, hipoclorito e ácido sulfúrico diluído sendo facilmente biodegradável. (BLOCK, 2000).

**Tabela 2:** Efeito da concentração de ácido peracético em esporos<sup>a</sup>

Concentração (%)	0,01	0,02	0,03	0,05	0,2
Redução (log)	<1	1	2	4	5

<sup>a</sup> *Bacillus subtilis* ATCC 9372, exposto por 30 minutos a 20°. C , pH 3; (Block, 2000)

### 3 Objetivos

O projeto tem como objetivo estudar a resistência de ATSB (bactérias esporuladas ácido-termofílicas) frente a agentes sanitizantes empregados na indústria de alimentos.

Baseado nos princípios ativos autorizados pelo FDA e Ministério da Saúde no Brasil para uso na indústria de alimentos, e mais utilizados nas indústrias de suco de laranja brasileiras, optamos por trabalhar com 4 produtos: ácido peracético, dióxido de cloro, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio.

Foram utilizadas 33 linhagens de ATSBs isoladas no projeto desenvolvido pela Fundação André Tosello e ABECitrus (Eguchi *et al.*, 2001a,b,c), provenientes de pomares cítricos e etapas do processamento industrial em diferentes regiões do Estado de São Paulo.

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- Avaliar as condições de tempo de contato e concentração de ativo utilizadas pelas indústrias de suco de laranja frente as linhagens referência de *Alicyclobacillus* relacionadas a sucos de laranja e isolados potencialmente deteriorogênicos originários de amostras de campo e fábrica;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória das diferentes moléculas para as linhagens referência de *Alicyclobacillus* na sua forma esporulada e vegetativa;
- Avaliar a eficácia das diferentes moléculas no controle e/ou eliminação dos esporos das linhagens de ATSB potencialmente deteriorogênicas originárias de amostras de campo e fábrica e das as linhagens referência de *Alicyclobacillus*.

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Linhagens microbianas, meios de cultivo e soluções

As linhagens de ATSB obtidas na Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello e ABECitrus (Eguchi *et al.*, 2001a,b,c) e dados de origem de isolamento encontram-se listadas na Tabela 3.

As linhagens-referência das diferentes espécies de ATSB associadas a sucos de laranja foram obtidas junto à DSMZ e compreendem as espécies:

- *Alicyclobacillus acidophilus* DSM 14558<sup>T</sup>;
- *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498<sup>T</sup>;
- *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922;
- *Alicyclobacillus cycloheptanicus* DSM 4006<sup>T</sup>.

Suspensões padronizadas de esporos foram preparadas e mantidas sob congelamento a -20° C para serem utilizadas como inóculo nos ensaios de eficácia. A partir de cultura de células em placa de meio BAT (DEINHARD *et al.*, 1987), com o auxílio de uma alça de semeadura foram coletadas pelo menos cinco colônias isoladas, as quais foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio BAT. A suspensão foi incubada a 43° C por 72 horas, ou até que o nível de esporulação de aproximadamente 80% das células fosse observado após avaliação em microscópio de contraste de fase. O cultivo foi transferido para um tubo Eppendorf, centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto e o precipitado lavado 3 vezes com água destilada esterilizada. O material foi suspenso em 1 mL de água destilada esterilizada e estocado a 4° C. A contagem da concentração de esporos foi realizada por plaqueamento de diluições seriadas (espalhamento com auxílio de alça de Drigalski) ativadas por choque térmico (80° C por 10 minutos, em banho-maria) e incubadas a 43° C por 24-48 horas.

**Tabela 3.** Isolados de ATSB selecionados para realização dos ensaios de sanitização e dados de origem.

Código CCT*	Código do isolado no estudo ABECitrus	Ponto de isolamento
<b>Isolados de amostras de campo (pomares)</b>		
7315	10fc2	fruta do chão
7316	10fs3	fruta da sacola
7317	10s6	solo
7349	12s7vH (B)	solo
7236	2fc4v v	fruta do chão - variedade Valência
7352	2fc8v v	fruta do chão - variedade Valência
7353	2fs5vH (A)	fruta da sacola - variedade Hamlin
7354	2fs5vH(B)	fruta da sacola - variedade Hamlin
7244	2fs8vH	fruta da sacola - variedade Hamlin
<b>Isolados de amostras do processo industrial</b>		
7208	1a/1	água condensada
7301	1fac/5	fruta após cloração - região norte
7191	1fac3	fruta após cloração - região norte
7192	1fdc3	fruta depois da cloração
7275	3ap2	água de pulverização
7186	5a2	água do sistema de lavação
7319	7a3	água de lavação
7339	8a1	água de lavação
7311	8a4	água de lavação
7200	9aa3	água amarela
7326	9fasL1	fruta após sistema de lavação
<b>Isolados de amostras de suco de laranja</b>		
6279	n.d.	suco tanque
6276	n.d.	água taste (usada na correção de Brix)
7187	2st3	suco antes das adições
7304	5st3	suco no tanque antes das adições
7227	1sp6 (P)	suco após pasteurização (repetição)
7272	3sp5	suco após pasteurização
7230	6sta4 (G)	suco tanque após as adições - região sul
7346	9st3	suco no tanque antes das adições
7267	3sp7	suco após pasteurização
7332	9sta1	suco do tanque após adições

\*CCT= Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Campinas, SP

O meio de cultivo utilizado foi o Meio BAT (DEINHARD *et al.*, 1987), cuja composição encontra-se descrita abaixo.

#### **Solução A: meio base**

CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O .....	0,25 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O .....	0,50 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3,0 g
Extrato de levedura (Difco) .....	1,0 g
Glicose .....	5,0 g
Solução de elementos traços (B) .....	1 mL
Água destilada p/ meio líquido .....	q.s.p. 1 L
Para meio sólido q.s.p. 500 mL + 500 mL Solução C	

O meio foi ajustado para pH 4,0 com solução 1 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou 1 N NaOH.

#### **Solução B: elementos traço (FARRAND *et al.*, 1983)**

CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O .....	0,66 g
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O .....	0,18 g
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O .....	0,16 g
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O .....	0,02 g
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O .....	0,18 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,10 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O .....	0,30 g
Água destilada.....	q.s.p. 1 L

Foi esterilizado por filtração.

#### **Solução C: ágar 1,5% (para meio sólido)**

Ágar (Difco) .....	15 g
Água destilada.....	500 mL

Para a preparação de meio BAT sólido, foram esterilizadas separadamente as soluções A, B e C. Foram misturadas as soluções A e B após autoclavagem. Para o meio sólido, foi adicionada a solução C (ágar 1,5%) ainda quente e vertido nas placas rapidamente.

#### **4.2 Ensaio preliminar de eficácia de saneantes para determinação das faixas de atividade frente a linhagem referência**

A avaliação preliminar de eficácia de saneantes selecionados frente aos isolados de amostras de suco do projeto AbeCitrus e a linhagem-referência *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498<sup>T</sup> com os sanitizantes ácido peracético a 150 ppm e 200 ppm (ativo) e dióxido de cloro a 10 ppm (ativo) foi realizado com tempo de contato de 15 segundos.

O teste foi feito em microplacas Costar de 96 poços (Costar 3595). Foram adicionados 100 µL da solução padronizada de esporos e 50 µL da solução teste de saneantes em cada poço da placa, utilizando uma micropipeta multicanal. Após o tempo de contato de 15 segundos, foram transferidos 100 µL do poço teste para uma nova placa com capacidade para 2 mL, contendo 900 µL do respectivo neutralizante (tiosulfato de sódio 0,2% para ácido peracético e 0,6% para dióxido de cloro). A homogeneização foi feita com o auxílio da micropipeta e as diluições foram realizadas na mesma placa.

As diluições foram transferidas para placa de Petri contendo meio BAT e espalhadas com alça de Drigalski para possibilitar a contagem de células vegetativas. Depois de retirada as alíquotas para plaqueamento e detecção das células vegetativas, a placa de diluição foi lacrada e submetida a um choque térmico (80° C/10 min) para eliminação de células vegetativas e ativação de esporos. Após o choque térmico, alíquotas das diluições foram transferidas seguindo o protocolo já descrito para detecção de células vegetativas.

As placas foram incubadas à 43° C por 72 horas e após este período foram feitas, as leituras das placas com resultados expressos em UFC/mL e avaliação da redução decimal dos testes usando a seguinte fórmula:

$$\text{RD (Redução decimal)} = \log N - \log N_0$$

onde N= contagem em UFC da população microbiana final (após contato) e N<sub>0</sub> = contagem em UFC da população microbiana inicial.

#### **4.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de saneantes frente as linhagens-refêrencia na forma esporulada e vegetativa**

A avaliação de CMI dos quatro saneantes mais utilizados na indústria de sucos e aprovados pelo FDA e Ministério da Saúde foi realizada para determinação da concentração mínima inibitória frente às linhagens de referencia de quatro espécies de ATSB associados à contaminação de sucos, na forma vegetativa e na forma de esporos. Os compostos avaliados foram: ácido peracético, dióxido de cloro 10 ppm, hipoclorito de sódio e quaternário de amônio. Linhagens-referência utilizadas na determinação:

- *Alicyclobacillus acidophilus* DSM 14558<sup>T</sup>;
- *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498<sup>T</sup>;
- *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922;
- *Alicyclobacillus cycloheptanicus* DSM 4006<sup>T</sup>.

Foram preparadas soluções-estoque com as seguintes concentrações:

- ácido peracético 15.000 ppm;
- dióxido de cloro 10 ppm do ingrediente ativo;
- hipoclorito de sódio 20.000 ppm;
- quaternário de amônio 50.000 ppm.

Os microrganismos testados foram repicados em 5 mL de caldo BAT e incubados a 43° C por 24 horas. O teste foi feito em microplacas (*Mega Titer Plate*) de 96 poços com capacidade de 2 mL por poço. Para o teste, foi transferido 50 µL do cultivo de 24 horas para 150 µL do



respectivo meio fresco que foi distribuído nos poços, sendo que o 1º poço recebeu 900 µL e os seguintes 500µL cada. No 1º poço, foi adicionado 100 µL da solução saneante (solução 10 vezes concentrada com relação à concentração de avaliação do 1º. poço), homogeneizado, 500 µL foram transferidos para o 2º poço, e assim sucessivamente, até o último poço.

Foram preparadas duas placas com o mesmo inóculo e solução teste, uma das placas foi submetida ao choque térmico (80°C/10 min) para a determinação da CME (concentração mínima esporicida) e a outra placa que não sofreu choque térmico foi utilizada para a determinação da CMB (concentração mínima bactericida) para células vegetativas. As placas, após tratamento foram incubadas a 43°C por 24 horas.

Após o período de incubação, 20 µL da solução teste de cada concentração foram transferidos para a superfície de uma placa de Petri contendo o meio de BAT, espalhados e incubado a 43°C. Após 24 horas, foi observado crescimento negativo ou positivo de cada teste.

#### **4.4 Avaliação da eficácia de diferentes sanitizantes frente a linhagens de ATSB potencialmente deteriogênicas isoladas de amostras de campo e fábrica**

A avaliação de 33 isolados potencialmente deteriogênicos e das linhagens-referência na forma esporulada foi realizada frente aos saneantes em estudo visando à determinação da concentração e tempo de ação para o controle de ATSB nas indústrias de sucos.

Após a avaliação dos resultados dos ensaios descritos em 4.2, foi decidido o uso dos saneantes nas seguintes concentrações e tempos:

- ácido peracético: 150, 250 e 500 ppm;
- quaternário de amônio: 100 e 200 ppm;
- hipoclorito de sódio 1000 e 2000 ppm;
- dióxido de cloro: 10 ppm;
- tempos de contato: 15, 30 e 60 segundos, 2, 5 e 10 minutos.

Foram distribuídos 9 mL de cada solução teste (duplicata) em tubos de ensaio esterilizado, em seguida foi adicionado 1 mL da suspensão padronizada de esporos. Em cada tempo de contato estabelecido foi transferido 1mL do tubo teste para 9 mL de neutralizante (solução de tiosulfato de sódio 0,2% para ácido peracético ou 0,6% para dióxido de cloro e hipoclorito de sódio; Caldo Lethen, Difco, para quaternário de amônio).

Após este procedimento, o tubo foi homogeneizado e diluições seriadas foram feitas. Os tubos das diluições foram submetidos ao choque térmico (80° C/10 min) e 0,1 mL de cada diluição foi semeada em placa de Petri contendo meio BAT e espalhadas com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 43° C e após 72 horas foram feitas as leituras.

## **5 Resultados e Discussão**

### **5.1 Levantamento e seleção de ATSB da Coleção de Culturas Tropical para o estudo**

Foram selecionadas 33 linhagens de ATSB (Tabela 3), pertencentes ao acervo da Coleção de Culturas Tropical (CCT), provenientes de 3 indústrias citrícolas e 3 laranjais do Estado de São Paulo, incluindo isolados de diferentes pontos do processamento da fruta e do suco. Os critérios de seleção para as linhagens do ensaio foram: isolados de suco em diferentes pontos de processo, esporulação nas condições de cultivo em laboratório, capacidade de crescer nos meios seletivos para bactérias termo-acidofílicas.

### **5.2 Ensaio preliminar de redução decimal de ATSB nas condições de uso empregadas na indústria de suco de laranja**

Para estes ensaios, foram escolhidos os isolados ATSB a partir do suco por serem as linhagens que se encontram presentes desde o início do processo até o produto final. Os saneantes selecionados são indicados para uso na lavagem das frutas, ponto onde ocorre maior incidência de ATSB, e tempo de contato de 15 segundos. Estes critérios foram seguidos segundo indicação de novos estudos nas indústrias de suco.

Os resultados obtidos pela avaliação da eficácia de agentes sanitizantes (ácido peracético e dióxido de cloro) empregados na indústria de sucos, que foram testados nas concentrações de 100 e 200 ppm para ácido peracético e de 10 ppm para o dióxido de cloro encontram-se expressos na Tabela 4 e 5.

**Tabela 4.** Resultados do teste de eficácia de saneantes selecionados frente aos esporos de ATSB isolados de suco de laranja (tempo de contato = 15 s).

Isolados	Pop.Inicial (UFC/mL)	Ácido peracético*		Dióxido de cloro* 10 ppm
		150 ppm	200 ppm	
6279	$5,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$ (0,32)	$1,6 \times 10^6$ (0,47)	$1,5 \times 10^6$ (0,44)
7187	$1,3 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$ (0,53)	$1,2 \times 10^6$ (-0,03)	$1,2 \times 10^6$ (-0,04)
7304	$2,6 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$ (0,11)	$8,6 \times 10^6$ (0,51)	$2,1 \times 10^6$ (-0,08)
7227	$1,1 \times 10^6$	$9,4 \times 10^5$ (-0,07)	$1,9 \times 10^6$ (0,24)	$1,6 \times 10^6$ (0,15)
7272	$2,0 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$ (-0,33)	$2,3 \times 10^6$ (0,06)	$2,0 \times 10^6$ (0,01)
7230	$3,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$ (0,09)	$3,6 \times 10^6$ (0,08)	$2,7 \times 10^6$ (-0,05)
7346	$2,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$ (0,03)	$1,4 \times 10^6$ (-0,15)	$2,0 \times 10^6$ (-0,04)
7267	$3,2 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$ (0,24)	$2,1 \times 10^6$ (-0,18)	$1,0 \times 10^6$ (-0,50)
7332	$2,3 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$ (0,08)	$4,1 \times 10^4$ (0,24)	$7,6 \times 10^3$ (-0,48)
A. <i>acidoterrestis</i> DSM 2498 <sup>T</sup>	$5,9 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$ (-0,15)	$4,2 \times 10^4$ (-0,14)	$1,3 \times 10^4$ (-0,67)

\*Resultados expressos em Unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e valor de RD (redução decimal).

**Tabela 5.** Resultados do teste de eficácia de sanenates selecionados frente às células vegetativas de ATSB isolados de suco de laranja (tempo de contato = 15 s).

Isolados	População Inicial (UFC/mL)	Ácido peracético*		Dióxido de cloro*
		150 ppm	200 ppm	
6279	$5,4 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$ (-0,01)	$6,7 \times 10^5$ (0,10)	$2,2 \times 10^6$ (0,61)
7187	$4,9 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$ (0,90)	$3,6 \times 10^5$ (-0,12)	$1,1 \times 10^6$ (0,35)
7304	$2,9 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$ (0,18)	$2,5 \times 10^6$ (-0,06)	$1,0 \times 10^7$ (0,56)
7227	$1,9 \times 10^6$	$4,4 \times 10^5$ (-0,62)	$1,7 \times 10^6$ (-0,02)	$1,6 \times 10^6$ (-0,07)
7272	$1,6 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$ (0,10)	$1,6 \times 10^6$ (-0,01)	$2,7 \times 10^6$ (0,2)
7230	$2,2 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$ (0,21)	$2,8 \times 10^6$ (0,10)	$7,4 \times 10^6$ (0,52)
7346	$2,4 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$ (-0,42)	$1,8 \times 10^6$ (-0,11)	$2,9 \times 10^6$ (0,07)
7267	$6,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$ (-0,50)	$3,0 \times 10^6$ (-0,31)	$1,1 \times 10^7$ (0,25)
7332	$1,3 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$ (-0,20)	$1,2 \times 10^4$ (-0,02)	$1,0 \times 10^4$ (-0,11)
A. <i>acidoterrestris</i> DSM 2498 <sup>T</sup>	$4,4 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$ (0)	$4,1 \times 10^4$ (-0,03)	$1,6 \times 10^4$ (-0,43)

\*Resultados expressos em Unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e valor de RD (redução decimal).

**Tabela 6.** Resultados em percentagem do teste de eficácia de saneantes selecionados frente aos esporos e às células vegetativas de ATSB isolados de suco de laranja (tempo de contato = 15 s).

Isolados		Ácido peracético*		Dióxido de cloro*
		150 ppm	200 ppm	10 ppm
6279	CV	<50%	<50%	<50%
	E	<50%	<50%	<50%
7187	CV	<50%	<50%	<50%
	E	<50%	<50%	<50%
7304	CV	<50%	<50%	<50%
	E	<50%	<50%	<50%
7227	CV	<b>76,2%</b>	<50%	<50%
	E	<50%	<50%	<50%
7272	CV	<50%	<50%	<50%
	E	<b>53,4%</b>	<50%	<50%
7230	CV	<50%	<50%	<50%
	E	<50%	<50%	<50%
7346	CV	<b>62,6%</b>	<50%	<50%
	E	<50%	<50%	<50%
7267	CV	68,9%	<50%	<50%
	E	51,2%	<50%	<b>68,5%</b>
7332	CV	<50%	<50%	<50%
	E	<50%	<50%	<b>67,2%</b>
A. <i>acidoterrestris</i> DSM 2498 <sup>T</sup>	CV	<50%	<50%	<b>63,4%</b>
	E	<50%	<50%	<b>78,7%</b>

Apesar dos resultados obtidos não demonstrarem redução microbiana significativa na presença de ácido peracético a 150 e 200 ppm de ativo ou dióxido de cloro a 10 ppm de ativo, com 15 segundos de contato, para todos os isolados e a linhagem-referência *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498<sup>T</sup>, tanto na forma vegetativa como na forma de esporos, observamos que os compostos possuem atividade microbiana que controla a proliferação.

Embora a eficácia de sanitização desejada não ter sido obtida, podemos observar nos resultados de redução decimal que, nos ensaios realizados com o ácido peracético a 200 ppm, 70% dos testes com esporos apresentam maior resistência ao composto que as células vegetativas, enquanto que, na presença de dióxido de cloro, 90% das células vegetativas apresentaram maior resistência ao composto quando comparadas aos testes com esporos.

Os parâmetros de realização dos ensaios foram selecionados com o intuito de verificar a eficácia de sanitização em um dos processos utilizados atualmente na indústria de sucos, ou seja, a lavagem das frutas para entrada no processo. Porém, quando estas condições foram avaliadas em condições laboratoriais, observamos que não se obtêm a eficácia de sanitização desejada.

Frente aos resultados obtidos, houve a necessidade de determinar a concentração mínima inibitória para os saneantes selecionados frente às linhagens-referência de *Alicyclobacillus*, visando a avaliação de eficácia com concentrações e tempos de contato maiores para os saneantes, apesar de serem valores acima do normalmente praticado pela indústria (15 segundos).

### 5.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória de diferentes moléculas frente as linhagens-referência de *Alicyclobacillus* na forma esporulada e vegetativa.

Baseado nos resultados do item 5.2. observamos a necessidade de determinar a concentração mínima inibitória para as linhagens-referência de *Alicyclobacillus*, uma vez que estes dados não foram encontrados na literatura disponível sobre compostos antimicrobianos e bactérias deste gênero. Os resultados destes ensaios estão expressos em concentração de ingrediente ativo em ppm (Tabela 7).

**Tabela 7.** Resultados de MIC frente a linhagens-referência de *Alicyclobacillus* associadas à contaminação de suco de laranja.

Saneantes	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM 3922		<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> DSM 4006 <sup>T</sup>		<i>Alicyclobacillus acidophilus</i> DSM 14558 <sup>T</sup>		<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM 2498 <sup>T</sup>	
	CMB*	CME**	CMB	CME	CMB	CME	CMB	CME
Ácido peracético	>1500	187,5	93,75	93,75	93,75	93,75	93,75	93,75
Dióxido de cloro	>10	2,5	10	5	2,5	5	10	>10
Quaternário de amônio	<2,44	19,53	4,88	<2,44	9,77	<2,44	9,77	9,77
Hipoclorito de sódio	500	500	500	500	500	500	1000	1000

\*CMB = concentração mínima bactericida. \*\*CME = concentração mínima esporicida.

Podemos observar que os valores de CMI do ácido peracético para a maioria das linhagens-referência foi 93,75 ppm, não apresentando diferença de valores entre as células vegetativas e esporos. Para a linhagem-referência DSM 3922, o valor para células vegetativas foi maior do que 1500 ppm e para esporos de 187,5 ppm, indicando uma maior resistência desta linhagem para o ácido peracético quando comparada com as demais linhagens *Alicyclobacillus* estudadas.



Os valores de CMI para dióxido de cloro apresentaram valor superior ou igual a 10 ppm para a maioria das linhagens-referência na sua forma vegetativa, exceto para a linhagem-referência DSM 14558<sup>T</sup> que obteve o valor de 2,5 ppm, indicando que esta linhagem apresenta na sua forma vegetativa uma maior susceptibilidade ao dióxido de cloro do que as outras linhagens avaliadas. Os valores de CMI para dióxido de cloro frente a forma esporuladas das linhagens referencia DSM 3922 e DSM 4006<sup>T</sup>, apresentaram valores de 2,5 e 5 ppm respectivamente, indicando que a forma vegetativa para estas duas linhagens são mais resistentes quando comparadas com suas formas esporuladas, e para as linhagens DSM 14558<sup>T</sup> e DSM 2498<sup>T</sup> com os valores de 5 e superior a 10 ppm respectivamente, tiveram um comportamento esperado em sua forma esporulada sendo mais resistente ao dióxido de cloro que as células vegetativas.

Para o quaternário de amônio a linhagem-referência DSM 2498<sup>T</sup> não obteve diferença entre os valores para as células vegetativas e esporos de CMI 9,77 ppm, as linhagens DSM 4006<sup>T</sup> e DSM 14558<sup>T</sup> apresentaram valores de CME (<2,44 ppm) inferiores aos CMB (4,88 e 9,77 ppm respectivamente), indicando assim que as linhagens na sua forma vegetativa são mais resistentes do que quando na sua forma esporulada. Para a linhagem DSM 3922 o valor de CME de 19,53 ppm foi o mais elevado, indicando que para a forma esporulada esta linhagem é a mais susceptível para quaternário de amônio quando comparada com as demais linhagens de *Alicyclobacillus* estudadas

Os valores de CMI para o hipoclorito de sódio foram de 500 ppm, para células vegetativas quanto esporos, exceto para a linhagem DSM 2498<sup>T</sup> que apresentou uma CMI de 1000 ppm para células vegetativas e esporos.

#### **5.4 Avaliação da eficácia de diferentes saneantes no controle e/ou eliminação de ATSB potencialmente deteriorogênicos isolados do campo, processo industrial e suco**

Como foi observado nos resultados do ensaio 5.2 e na determinação da CMI no item 5.3 que o comportamento dos ATSB não apresenta a redução esperada frente aos compostos de sanitização em 15 segundos e os valores de CMI são variados, foi elaborado este experimento com o intuito de averiguar a eficácia das linhagens isoladas de cada setor do processo produtivo e somente na forma de esporos, por serem consideradas a forma mais resistente dos organismos capazes de sobreviver à pasteurização e que ocorrem no suco acabado. Estes resultados são expressos nas Tabelas 6 a 8. O mesmo ensaio foi também realizado utilizando um *pool* das linhagens-referência (Tabela 11).

**Tabela 8.** Resultados do teste de eficácia frente ao *pool* de isolados de campo.

Tempo/ concentração	Ácido peracético			Quaternário de amônio		Hipoclorito de sódio		ClO <sub>2</sub>
	(ppm)	150	250	500	100	200	1000	
<b>15 seg</b>	3,8x10 <sup>5</sup> (-0,39)	3,8x10 <sup>5</sup> (-0,39)	3,1x10 <sup>5</sup> (-0,48)	4,9x10 <sup>5</sup> (-0,28)	2,4x10 <sup>5</sup> (-0,59)	3,0x10 <sup>5</sup> (-0,50)	3,1x10 <sup>5</sup> (-0,48)	1,7x10 <sup>5</sup> (-0,74)
<b>30 seg</b>	2,9x10 <sup>5</sup> (-0,51)	6,3x10 <sup>5</sup> (-0,17)	3,1x10 <sup>5</sup> (-0,48)	2,8x10 <sup>5</sup> (-0,53)	6,2x10 <sup>5</sup> (-0,18)	1,8x10 <sup>5</sup> (-0,72)	5,2x10 <sup>5</sup> (-0,26)	3,2x10 <sup>5</sup> (-0,47)
<b>60 seg</b>	1,4x10 <sup>5</sup> (-0,83)	2,8x10 <sup>5</sup> (-0,53)	2,0x10 <sup>5</sup> (-0,67)	3,1x10 <sup>5</sup> (-0,48)	4,2x10 <sup>5</sup> (-0,35)	2,6x10 <sup>5</sup> (-0,56)	4,6x10 <sup>5</sup> (-0,31)	2,1x10 <sup>5</sup> (-0,65)
<b>2 min</b>	3,1x10 <sup>5</sup> (-0,48)	6,9x10 <sup>5</sup> (-0,13)	3,0x10 <sup>5</sup> (-0,50)	3,1x10 <sup>5</sup> (-0,48)	5,3x10 <sup>5</sup> (-0,25)	8,8x10 <sup>4</sup> (-1,03)	3,4x10 <sup>5</sup> (-0,44)	2,8x10 <sup>5</sup> (-0,53)
<b>5 min</b>	4,8x10 <sup>5</sup> (-0,29)	4,7x10 <sup>5</sup> (-0,30)	2,6x10 <sup>5</sup> (-0,56)	2,2x10 <sup>5</sup> (-0,63)	4,7x10 <sup>5</sup> (-0,30)	3,9x10 <sup>5</sup> (-0,38)	3,8x10 <sup>5</sup> (-0,39)	5,3x10 <sup>5</sup> (-0,25)
<b>10 min</b>	3,1x10 <sup>5</sup> (-0,48)	2,5x10 <sup>5</sup> (-0,58)	3,6x10 <sup>5</sup> (-0,42)	1,8x10 <sup>4</sup> (-1,72)	3,8x10 <sup>5</sup> (-0,39)	4,5x10 <sup>5</sup> (-0,32)	3,5x10 <sup>5</sup> (-0,43)	2,7x10 <sup>5</sup> (-0,54)

\*População inicial: 9,4x10<sup>5</sup> UFC/mL.

\*Resultados expressos em Unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e valor de RD (redução decimal).

**Tabela 9.** Resultados do teste de eficácia frente ao *pool* de isolados de processo industrial.

Tempo/ concentração	Ácido peracético			Quaternário de amônio		Hipoclorito de sódio		ClO <sub>2</sub>
	(ppm)	150	250	500	100	200	1000	
<b>15 seg</b>	1,7x10 <sup>3</sup> (-1,95)	1,5x10 <sup>3</sup> (-2,00)	8,0x10 <sup>2</sup> (-2,27)	1,5x10 <sup>3</sup> (-2,00)	1,4x10 <sup>3</sup> (-2,03)	1,3x10 <sup>3</sup> (-2,06)	1,1x10 <sup>3</sup> (-2,13)	2,2x10 <sup>3</sup> (-1,83)
<b>30 seg</b>	1,8x10 <sup>3</sup> (-1,92)	1,8x10 <sup>3</sup> (-1,92)	7,5x10 <sup>2</sup> (-2,30)	1,0x10 <sup>2</sup> (-3,18)	3,4x10 <sup>3</sup> (-1,64)	1,2x10 <sup>3</sup> (-2,10)	1,2x10 <sup>3</sup> (-2,10)	1,5x10 <sup>3</sup> (-2,00)
<b>60 seg</b>	1,3x10 <sup>3</sup> (-2,06)	1,2x10 <sup>3</sup> (-2,10)	7,5x10 <sup>2</sup> (-2,30)	1,3x10 <sup>3</sup> (-2,06)	1,2x10 <sup>3</sup> (-2,10)	1,3x10 <sup>3</sup> (-2,06)	7,5x10 <sup>2</sup> (-2,30)	1,0x10 <sup>3</sup> (-2,18)
<b>2 min</b>	1,5x10 <sup>3</sup> (-2,00)	4,5x10 <sup>2</sup> (-2,52)	1,4x10 <sup>3</sup> (-2,03)	1,7x10 <sup>3</sup> (-1,95)	1,7x10 <sup>3</sup> (-1,95)	1,5x10 <sup>3</sup> (-2,00)	1,1x10 <sup>3</sup> (-2,13)	1,2x10 <sup>3</sup> (-2,10)
<b>5 min</b>	1,2x10 <sup>3</sup> (-2,10)	9,5x10 <sup>2</sup> (-2,20)	1,2x10 <sup>3</sup> (-2,10)	5,5x10 <sup>2</sup> (-2,44)	1,0x10 <sup>3</sup> (-2,18)	1,5x10 <sup>3</sup> (-2,00)	1,3x10 <sup>3</sup> (-2,06)	1,3x10 <sup>3</sup> (-2,06)
<b>10 min</b>	2,1x10 <sup>3</sup> (-1,85)	1,3x10 <sup>3</sup> (-2,06)	1,2x10 <sup>2</sup> (-2,10)	5,5x10 <sup>2</sup> (-2,44)	1,4x10 <sup>3</sup> (-2,03)	1,0x10 <sup>2</sup> (-2,18)	9,0x10 <sup>2</sup> (-2,22)	9,0x10 <sup>2</sup> (-2,22)

\*População inicial: 1,5x10<sup>5</sup> UFC/mL.

\*Resultados expressos em Unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e valor de RD (redução decimal).

**Tabela 10.** Resultados do teste de eficácia frente ao *pool* de isolados de SUCOS.

Tempo/ concentração	Ácido peracético			Quaternário de amônio		Hipoclorito de sódio		ClO <sub>2</sub>
	(ppm)	150	250	500	100	200	1000	
<b>15 seg</b>	3,0x10 <sup>5</sup> (-0,24)	2,1x10 <sup>5</sup> (-0,39)	1,4x10 <sup>5</sup> (-0,57)	1,3x10 <sup>5</sup> (-0,60)	2,5x10 <sup>5</sup> (-0,32)	2,5x10 <sup>3</sup> (-2,32)	3,3x10 <sup>5</sup> (-0,20)	3,3x10 <sup>5</sup> (-0,20)
<b>30 seg</b>	1,4x10 <sup>5</sup> (-0,57)	1,3x10 <sup>3</sup> (-2,60)	1,6x10 <sup>5</sup> (-0,51)	3,2x10 <sup>6</sup> (-0,21)	2,1x10 <sup>5</sup> (-0,39)	2,5x10 <sup>5</sup> (-0,32)	8,0x10 <sup>4</sup> (-0,81)	1,4x10 <sup>5</sup> (-0,57)
<b>60 seg</b>	1,9x10 <sup>5</sup> (-0,44)	9,6x10 <sup>4</sup> (-0,73)	7,0x10 <sup>4</sup> (-0,87)	1,2x10 <sup>5</sup> (-0,64)	1,3x10 <sup>3</sup> (-0,60)	2,3x10 <sup>4</sup> (-1,35)	2,7x10 <sup>5</sup> (-0,28)	1,6x10 <sup>5</sup> (-0,51)
<b>2 min</b>	2,1x10 <sup>5</sup> (-0,39)	2,4x10 <sup>5</sup> (-0,34)	7,0x10 <sup>5</sup> (-0,13)	9,9x10 <sup>3</sup> (-1,72)	6,0x10 <sup>4</sup> (-0,94)	1,8x10 <sup>5</sup> (-0,46)	1,9x10 <sup>5</sup> (-0,44)	2,9x10 <sup>4</sup> (-1,25)
<b>5 min</b>	3,5x10 <sup>4</sup> (-1,17)	1,0x10 <sup>5</sup> (-0,72)	5,0x10 <sup>5</sup> (-0,02)	2,5x10 <sup>3</sup> (-2,32)	1,0x10 <sup>5</sup> (-0,72)	1,7x10 <sup>4</sup> (-1,49)	3,5x10 <sup>4</sup> (-1,17)	1,4x10 <sup>5</sup> (-0,57)
<b>10 min</b>	3,2x10 <sup>5</sup> (-0,21)	5,5x10 <sup>4</sup> (-0,98)	2,5x10 <sup>4</sup> (-0,79)	2,7x10 <sup>3</sup> (-2,28)	5,0x10 <sup>4</sup> (-1,02)	2,6x10 <sup>5</sup> (-0,30)	5,0x10 <sup>4</sup> (-1,02)	2,4x10 <sup>4</sup> (-1,34)

\*População inicial: 5,2x10<sup>5</sup> UFC/mL.

\*Resultados expressos em Unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e valor de RD (redução decimal).

**Tabela 11.** Resultados do teste de eficácia frente ao *pool* das linhagens-referência.

Tempo/ concentração	Ácido peracético			Quaternário de amônio		Hipoclorito de sódio		ClO <sub>2</sub>
	(ppm)	150	250	500	100	200	1000	
<b>15 seg</b>	2,9x10 <sup>5</sup> (-0,43)	8,0x10 <sup>3</sup> (-1,99)	2,6x10 <sup>5</sup> (-0,48)	1,9x10 <sup>5</sup> (-0,61)	2,0x10 <sup>5</sup> (-0,59)	1,1x10 <sup>5</sup> (-0,85)	7,0x10 <sup>4</sup> (-1,05)	1,5x10 <sup>5</sup> (-0,72)
<b>30 seg</b>	2,6x10 <sup>4</sup> (-1,48)	6,6x10 <sup>3</sup> (-2,07)	5,5x10 <sup>4</sup> (-1,15)	1,0x10 <sup>5</sup> (-0,89)	1,7x10 <sup>5</sup> (-0,66)	1,3x10 <sup>4</sup> (-1,78)	2,8x10 <sup>5</sup> (-0,44)	1,5x10 <sup>4</sup> (-1,72)
<b>60 seg</b>	1,7x10 <sup>4</sup> (-1,66)	7,1x10 <sup>3</sup> (-2,04)	7,4x10 <sup>3</sup> (-2,02)	8,0x10 <sup>4</sup> (-0,99)	1,1x10 <sup>4</sup> (-1,85)	9,1x10 <sup>3</sup> (-1,93)	6,5x10 <sup>4</sup> (-1,08)	2,0x10 <sup>4</sup> (-1,59)
<b>2 min</b>	1,0x10 <sup>5</sup> (-0,89)	7,7x10 <sup>3</sup> (-2,01)	4,0x10 <sup>3</sup> (-2,29)	6,0x10 <sup>4</sup> (-1,11)	1,5x10 <sup>4</sup> (-1,72)	4,0x10 <sup>4</sup> (-1,29)	2,5x10 <sup>4</sup> (-1,02)	1,4x10 <sup>4</sup> (-1,75)
<b>5 min</b>	2,1x10 <sup>4</sup> (-1,57)	5,7x10 <sup>3</sup> (-2,14)	3,5x10 <sup>3</sup> (-2,35)	2,0x10 <sup>4</sup> (-1,59)	7,0x10 <sup>4</sup> (-1,05)	6,5x10 <sup>4</sup> (-1,08)	2,3x10 <sup>4</sup> (-1,53)	1,2x10 <sup>4</sup> (-1,81)
<b>10 min</b>	1,6x10 <sup>4</sup> (-1,69)	5,0x10 <sup>3</sup> (-2,19)	5,1x10 <sup>3</sup> (-2,18)	1,9x10 <sup>5</sup> (-0,61)	3,3x10 <sup>5</sup> (-0,37)	1,5x10 <sup>4</sup> (-1,72)	2,5x10 <sup>4</sup> (-1,49)	1,9x10 <sup>5</sup> (-0,61)

\*População inicial: 7,8x10<sup>5</sup> UFC/mL

\*Resultados expressos em Unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e valor de RD (redução decimal).

**Tabela 12.** Percentual dos *pools* avaliados frente às condições de análises.

Tempo/ concentração	Ácido peracético			Quaternário de amônio		Hipoclorito de sódio		ClO <sub>2</sub>
	(ppm)	150	250	500	100	200	1000	
<b>ISOLADOS DO CAMPO</b>								
<b>15 seg</b>	59,6	59,6	67,0	<50	74,5	68,1	67,0	81,9
<b>30 seg</b>	69,2	<50	67,0	70,2	<50	80,8	<50	65,9
<b>60 seg</b>	85,1	70,2	78,7	67,0	55,3	72,3	51,1	77,7
<b>2 min</b>	67,0	<50	68,1	67,0	<50	90,6	63,8	70,2
<b>5 min</b>	<50	50,0	72,3	76,6	50,0	58,5	59,6	<50
<b>10 min</b>	67,0	73,4	61,7	98,1	59,6	52,1	62,8	71,3
<b>ISOLADOS DA INDÚSTRIA</b>								
<b>15 seg</b>	98,9	99,0	99,5	99,0	99,1	99,1	99,3	98,5
<b>30 seg</b>	98,8	98,8	99,5	99,9	97,7	99,2	99,2	99,0
<b>60 seg</b>	99,1	99,2	99,5	99,1	99,2	99,1	99,5	99,3
<b>2 min</b>	99,0	99,7	99,1	98,9	98,9	99,0	99,3	99,2
<b>5 min</b>	99,2	99,4	99,2	99,6	99,3	99,0	99,1	99,1
<b>10 min</b>	98,6	99,1	99,2	99,6	99,1	99,3	99,4	99,4
<b>ISOLADOS DO SUÇO</b>								
<b>15 seg</b>	<50	59,6	73,1	75,0	51,9	99,5	<50	<50
<b>30 seg</b>	73,1	99,7	69,2	<50	59,6	51,9	84,6	73,1
<b>60 seg</b>	63,5	81,5	86,5	76,9	75,0	95,6	<50	69,2
<b>2 min</b>	59,6	53,8	<50	98,1	88,5	65,4	63,5	94,4
<b>5 min</b>	93,3	80,8	<50	99,5	80,8	96,7	93,3	73,1
<b>10 min</b>	<50	89,4	83,6	99,5	90,4	50,0	90,4	95,4

**Tabela 12.** Continuação

Tempo/ concentração	Ácido peracético			Quaternário de amônio		Hipoclorito de sódio		ClO <sub>2</sub>
	(ppm)	150	250	500	100	200	1000	
<b>LINHAGENS-REFERÊNCIA</b>								
<b>15 seg</b>	62,8	98,9	66,7	75,6	74,4	85,9	91,0	80,8
<b>30 seg</b>	96,7	99,1	92,9	87,2	78,2	98,3	64,1	98,1
<b>60 seg</b>	97,8	99,1	99,1	89,7	98,6	98,8	91,7	97,4
<b>2 min</b>	87,2	99,0	99,5	92,3	98,1	94,9	90,4	98,2
<b>5 min</b>	97,3	99,3	99,5	97,4	91,0	91,7	97,0	98,5
<b>10 min</b>	97,9	99,4	99,3	75,6	57,7	98,1	96,8	75,6

Frente aos resultados obtidos observamos que para os compostos testados no *pool* de isolados de campo indicaram uma redução inferior a 90% de eficácia, demonstrando um controle na proliferação destes isolados, mas não sendo demonstrada a ação sanitizante (Tabelas 8 e 12).

Para os isolados de processo industrial, os resultados para o ácido peracético demonstraram uma redução superior a 99% após 60 segundos de contato, na concentração de 250 ppm, e a mesma redução de 99% após 15 segundos para 500 ppm, na concentração de 150 ppm, sendo observada uma ação bacteriostática apenas, uma vez que a redução decresceu no tempo de 10 minutos para o *pool* dos isolados de processo industrial em estudo. Ainda, com os isolados de processo industrial, o hipoclorito de sódio apresentou redução superior a 99% em todos os tempos de contato nas concentrações de 1000 e 2000 ppm, enquanto que o dióxido de cloro apresentou redução superior a 99% em todos os tempos estabelecidos, exceto para 15 segundos. Para estes dois últimos compostos podemos dizer que possuem ação bactericida nas condições do estudo. O quaternário de amônio apresentou redução



de 99,9% em 30 segundos na concentração de 100 ppm, porém este valor não foi mantido e os resultados para as concentrações testadas de 100 e 200 ppm apresentaram redução superior a 95%, apesar dos valores obtidos terem variado na faixa de redução de 95 a 99,7%. Assim, podemos indicar este composto como bactericida nas condições de estudo, uma vez que a população microbiana não retomou seu crescimento com o passar do tempo de contato de 10 minutos (Tabelas 9 e 12).

Os isolados de suco apresentaram resultados de redução pontuais como pode ser observado na Tabela 12. O ácido peracético apresentou redução maior que 99% no tempo de contato de 30 segundos na concentração de 250 ppm, porém, em todos os ensaios seguintes, obtiveram-se valores inferiores a 80%. Os testes com quaternário de amônio apresentaram redução superior a 99% após 5 minutos na concentração de 100 ppm, sugerindo o início da ação bactericida após este período, mas para a concentração de 200 ppm do mesmo composto, todas as reduções foram inferiores a 80%, exceto no tempo de contato de 10 minutos.

Para hipoclorito de sódio, os isolados de suco apresentaram redução superior a 99% no tempo de contato de 15 segundos na concentração de 1000 ppm, mas valores inferiores a 99% nos outros tempos estabelecidos e para a concentração de 2000 ppm. O dióxido de cloro também apresentou valores muito variáveis, com redução superior a 90% no tempo de contato de dois e 10 minutos para a concentração de 10 ppm (Tabelas 10 e 12).

Para o *pool* de linhagens-referência, os resultados de eficácia para ácido peracético foram superiores a 99% após 30 e 60 segundos, nas concentrações de 250 e 500 ppm, respectivamente. Para quaternário de amônio a 200 ppm, observou-se redução superior a 90% após 60 segundos, porém a redução foi menor para tempos superiores, indicando apenas ação bacteriostática. Para hipoclorito de sódio, foi

observada redução superior a 90% após 2 minutos para as duas concentrações testadas e para o dióxido de cloro, redução superior a 90% após 30 segundos, a qual não se manteve nos mesmos níveis até 10 minutos de contato, também indicando atividade bacteriostática (Tabelas 11 e 12).

Aparentemente, as linhagens isoladas do campo (selvagens) são mais resistentes ao tratamento antimicrobiano dos sanitizantes selecionados que as linhagens isoladas do processo e suco.

## 6 Conclusões

Nas condições de aplicação atualmente utilizadas na indústria de sucos concentrados de laranja para sanitização de ATSB, ou seja, nas etapas de lavagem das laranjas antes da moagem e na descontaminação de equipamentos utilizados no processo de produção, o ácido peracético, (concentrações de uso de 150 e 200 ppm de ativo) e dióxido de cloro (a 10 ppm de ativo), não foram eficazes na redução de ATSB com 15 segundos de contato, quando testados individualmente com isolados de suco de laranja e a linhagem-referência *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498<sup>T</sup>, tanto na forma vegetativa como na forma de esporos.

Nestes ensaios, também foi observado que não houve diferença significativa no nível de resistência de formas vegetativas e esporos dos isolados frente aos compostos acima citados.

Na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos diferentes compostos (ácido peracético, dióxido de cloro, hipoclorito de sódio e quaternário de amônio), realizada com as linhagens-referência *Alicyclobacillus acidophilus* DSM 14558<sup>T</sup>, *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498<sup>T</sup> e 3922, e *Alicyclobacillus cycloheptanicus* DSM 4006<sup>T</sup>, foi verificado que:

- As quatro linhagens-referência de *Alicyclobacillus* apresentaram valores de CMI diferenciados quando tratadas com dióxido de cloro e quaternário de amônio;
- Maior susceptibilidade dos esporos nas linhagens-referência DSM 4006<sup>T</sup> e DSM 3922 frente ao dióxido de cloro e nas linhagens DSM 4006<sup>T</sup> e DSM 14558<sup>T</sup> para quaternário de amônio.

Na avaliação da eficácia dos saneantes avaliados, o *pool* de esporos dos isolados de campo apresentou redução inferior a 90%. Porém, não foi observado o aumento na população microbiana testada, o que indica que estes compostos podem ser usados para controlar a

proliferação dos isolados, mas não possuem ação sanitizante. Resultados semelhantes foram verificados para o *pool* de isolados da indústria e de suco.

Os resultados também indicam que os isolados do processo industrial testados são relativamente mais sensíveis aos sanitizantes empregados que os isolados de campo e de suco, sugerindo a ocorrência de algum tipo de seleção durante as etapas de processamento industrial.

De modo geral, os resultados obtidos mostraram que populações de isolados de diferentes origens podem apresentar variabilidade quanto à sua resistência aos compostos avaliados, por este motivo é importante ter cautela no momento de definir as concentrações para a sanitização, novas investigações devem ser feitas para determinar a concentração mínima inibitória dos isolados de cada ponto do processo da indústria de sucos.

Frente aos resultados obtidos, podemos concluir que os compostos testados, ácido peracético, quaternário de amônio, hipoclorito de sódio e dióxido de cloro, possuem ação bacteriostática e ou bactericida e podem ser utilizados para auxiliar no controle ou na diminuição de bactérias ácido termo-tolerantes durante os processos que envolvem lavagem de frutas e equipamentos na indústria de sucos. Contudo, nas condições testadas, os resultados não suportam a indicação de uso destes produtos como sanitizantes.

## 7 Referências Bibliográficas

- ASH, C.; FARROW, J. A. E.; WALLBANKS, S. & COLLINS, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of genus *Bacillus* revealed by comparative analyses of small-subunit ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology** 13: 202-206.
- BERKELEY, R. C. W. & ALI, N. (1994). Classification and identification of endospore-forming bacteria. **Journal of Applied Bacteriology (Symp. Supl.)** 76: 1s-8s.
- BLOCK S.S. (2000). **Disinfection, Sterilization and Preservation**. 5<sup>a</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers. U.S.A.
- BORLINGHAUS, A. & ENGEL R. (1997). *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC): supplies, method development and validation. **Fruit Processing** 7: 1-5
- BROWN, K. L. (1996). 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**. pp 1-14.
- CERNY, G.; HENNLICH, W. & PORALLA, K. (1984). Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbers Z **Lebens Unters Forsch.** 179: 224-227.
- DARLAND, G. & BROCK, T. D. (1971). *Bacillus acidocaldarius* sp. nov. an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. **Journal of General Microbiology** 67: 9-15.
- DE BARTOLOMEO, A.; TROTTA, F.; LA ROSA, SALTALAMACCCHIA, G. & MASTRANDREA, V. (1991). Numerical analyses and DNA base composition of some thermophilic *Bacillus* species. **International Journal of Systematic Bacteriology** 41(4): 502-509.
- DEINHARD, G. (1987). ***Bacillus acidoterrestris* sp. nov. und *Bacillus cycloheptanicus* sp.nov. zwei neue acidophile Bacillus-Arten, die  $\omega$ -alicyclische Fettsäuren enthalten**. Tese (Doutorado). Universidade de Tübingen - Alemanha.
- DEINHARD, G.; SAAR, J.; KRISCHKE, W. & PORALLA, K. (1987). *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing  $\omega$ -cycloheptane fatty acids. **Systematic Applied Microbiology** 10: 68-73.
- EGUCHI, S. Y.; MANFIO, G. P.; PINHATTI, M. E. M.; AZUMA, E. H.; VARIANE, S. F.; CANHOS, V.P. & ABECitrus Technical Committee. (1999). Report of the Research Project - Ecological study of Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in the citrus industry.

- EGUCHI, S. Y.; MANFIO, G. P.; PINHATTI, M. E. M.; AZUMA, E. H.; VARIANE, S. F. & ABECitrus Technical Committee. (2001a). Report of the Research Project Part I – Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juice: detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices (2001). **Fruit Processing** 1/2001: 12-18.
- EGUCHI, S. Y.; MANFIO, G. P.; PINHATTI, M. E. M.; AZUMA, E. H.; VARIANE, S. F. & ABECitrus Technical Committee. (2001b). Report of the Research Project Part II – Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juice: detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices (2001). **Fruit Processing** 2/2001: 55-62.
- EGUCHI, S. Y.; MANFIO, G. P.; PINHATTI, M. E. M.; AZUMA, E. H.; VARIANE, S. F. & ABECitrus Technical Committee. (2001c). Report of the Research Project Part III – Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juice: detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices (2001). **Fruit Processing** 3/2001: 95-101.
- EIROA, M. N. U.; JUNQUEIRA, V. C. A, SCHMIDT, F. L. (1999). *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. **Journal of Food Protection** 62(8): 883-886.
- HACTER, w. S.; WEIHE, J. L.; SPLITTSTOESSER, D. F.; HILL, E.C. & PARISH, M.E. (1992). Fruit beverages. **Compendium for the microbiological examination of foods**. 3<sup>a</sup>. ed. American Public, Health Association, London.
- HIPPECHEN, B.; ROLL, A. & PORALLA, K. (1981). Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing  $\omega$ -cyclohexane fatty acids and hopanoids. **Archives of Microbiology** 129: 53-55.
- KOMITOPOULOU, E.; BOZIARISI, S.; DAVIES, E. A; DELVES-BROUGHTON, J. & ADAMS, M. R. (1999). *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by Nisin. **International Journal of Food Science and Tecnology** 34: 81-85.
- LOGINOVA, L. G.; KHRAPTSOVA, G. I.; EGOROVA, L. A. & BOGDANOVA, T. I. (1978). Acidophilic, obligate thermophilic bacterium *Bacillus acidocaldarius* isolated from hot springs and soil of Kusnashir island. **Microbiology** 47: 771-775.
- MARRIOTT N. G. (1999). Sanitizers. Cap. 8. In.: **Principles of food sanitation**. 4 ed. pp. 139-157. Kluwer Academic Publishers
- McINTYRE S.; IKAWA, J. Y.; PARKINSON, J.; HAGLUND J. & LEE, J. (1995). Characteristics of an acidophylic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. **Journal of Food Protection** 58: 319-321.

- Ministério da Saúde (1988). **Portaria no. 15, de 23 de Agosto de 1988, DOU de 05/09/1988 – Normas para registro do saneantes domissanitários com ação antimicrobiana.** Brasília.
- MURAKAMI M., TEDZUKA H. YAMAZAKI K. (1998). Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores.in different buffers and pH. **Food Microbiol** 15: 577-582.
- ODLAUG, T. E. (1981). Antimicrobial activity of halogens. **Journal Food Protection** 44: 608-613.
- ORR, R. V.; SHEWFELT, R. L.; HUANG, C. J.; TEFERA, S. & BEUCHAT, L. R. (2000). Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus 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.
- PAULUS W. (1993). **Microbiocides for the Protection of Materials.** 1º. ed. Chapman & Hall. London.
- PETTIPHER, G. L.; OSMUNDSON, M. E. & MURPHY, J.M. (1997). Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and taint in fruit juice and fruit containing drinks. **Letters in Applied Microbiology** 24: 185-189.
- PINHATTI, M. E. M.; VARIANE, S.; EGUCHI, S. Y. & MANFIO, G. P. (1997). Detection of acidithermophilic bacilli in industrialized fruit juices. **Fruit Processing** 7: 350-353.
- PREVEDI, P.; COLLA, F. & VICINI, E. (1995).Characterization of *Alicyclobacillus*, a sporeforming thermophilic acidophilic bacterium. **Industrial Conserve** 70: 128-132.
- PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M. & TODD, C. (1981). The Genus *Bacillus*: A numerical analysis. In: BERKELEY, R. C. W. & GOODFELLOW, M. (eds.). **The aerobic endospore-forming bacteria: classification and identification.** 2nd Ed. Academic Press, London. pp. 91-104.
- SHEARER, A. E. H.; DUNNE C. P.; SYKES A. & HOOVER D. G. (2000). Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemicals preservatives, and mild heat. **Journal of Food Protection** (63): 1503-1510.
- SILVA, F.V.M. & GIBBS, P. (2001). *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. **Trends in Food Science and technology** (12): 68-74.
- SPLITTSTOESSER, D. F.; CHUREY, J. J. & LEE, C. Y. (1994). Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. **Journal of Food Protection** 57(12): 1080-1083.

- STACKEBRANDT, E.; WOLFGANG, L.; WEIZE-GER, M.; DORN, S.; MCGILL, T.; FOX, G.; WOESE, C.; SCHUBERT, W. & SCHELEIFER, K. (1987). Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round spore-forming relatives. **Journal of General Microbiology** 133: 2523-2529.
- TORDER J.A (1993). **Sanitation in food processing**. 2 Ed. Academic Press, USA
- UCHINO, F. & DOI, S. (1967). Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. **Journal of Agriculture and Biological Chemistry** 31: 817-822.
- WEBSTER, J. A; WALLS, I.; McDOWELL, C. I.; NEWBAUER, J. J. & HUBNER, R.J. (1996). Use of normalized ribotyping to describe acidophilic, sporeformers, isolated from fruits and fruit juices. Annals of the 96<sup>th</sup>. General meeting of the **American Society for Microbiology**, New Orleans LA, May, 1996.
- WHITE, D.; SHARP, R. J. & PRIEST, F. G. (1993). A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from a wide geographic area. **Antonie van Leeuwenhoek** 64: 357-386.
- WISOTZKEY, J. D.; JURTSUK, P. & FOX, G. (1990). PCR Amplification of 16S rRNA from lyophilized cell cultures facilitates studies in molecular systematics. **Current Microbiology** 21: 325-327.
- WISOTZKEY, J. D.; JURTSUK, P.; FOX, G.; DEINHARD G. & PORALLA, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus *Alicyclobacillus* gen.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology** 42(2): 263-269.
- YAMAZAKI K., TEDUKA H. & SHINANO H. (1996). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** 60: 543-545.
- YAMAZAKI K., MURAKAMI M., KAWAI Y., INOUE N. & MATSUDA T. (2000). Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. **Food Microbiology** 17: 315-320.