



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

**Caracterização taxonômica de linhagens de
Alicyclobacillus spp. isoladas na indústria
de suco concentrado de laranja**

PARECER

Benício Alves de Abreu Filho

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Benício Alves de Abreu Filho**, aprovado pela Comissão Julgadora em 29 de agosto de 2005.

Campinas, 29 de agosto de 2005.

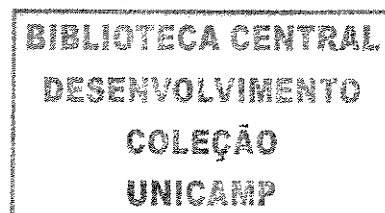
Orientador: Dr. Gilson Paulo Manfio

Co-orientador: Dra. Valéria Maia de Oliveira


Dr. Gilson Paulo Manfio
Presidente da Banca

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

2005



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Ab86c
V	EX
TOMBO BC/	65883
PROC.	16-0.00086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	05/10/05
Nº CPD	

Bib ID 366384

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

Ab86c Abreu Filho, Benício Alves de
Caracterização taxonômica de linhagens de *Alicyclobacillus* spp. isolados na indústria de suco concentrado de laranja / Benício Alves de Abreu Filho. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Gilson Paulo Manfio
Co-orientador: Valéria Maia de Oliveira
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Alicyclobacillus*. 2. Suco de laranja. 3. Biodeterioração. 4. Taxonomia polifásica. 5. Termófilos. I. Manfio, Gilson Paulo. II. Oliveira, Valéria Maia de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Characterization taxonomic of strains of *Alicyclobacillus* spp. isolated in the industry of concentrate juice of orange.

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Alicyclobacillus*, Orange juice, Biodeterioration, Polyphasic taxonomy, Thermophiles

Titulação: Doutor em Ciências de Alimentos

Banca examinadora: Gilson Paulo Manfio

Fabiana Fantinatti-Garboggini

Lara Durães Sette

Silvia Yuko Eguchi

Marta Cristina Teixeira Duarte

Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Abreu Filho, Benicio Alves de

Caracterização taxonômica de linhagens de *Alicyclobacillus* spp. isoladas na indústria de suco concentrado de laranja.

Errata

1. Página 6, item 3.1, primeiro parágrafo, onde se lê "desses organismos", substituir por "e dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*".
2. Página 6, item 3.1, terceiro parágrafo, onde se lê "até 1994-1995", substituir por "até 1994".
3. Página 7, terceiro parágrafo, suprimir a palavra "achatada".
4. Página 10, segundo parágrafo, substituir "inviável" por "viável".
5. Página 13, segunda linha, após "à presença", acrescentar "como componente principal".
6. Página 20, última linha, onde se lê "em glicerol", substituir por "em meio de cultura com glicerol".
7. Página 31, terceiro parágrafo, após "fabricantes", acrescentar "(Amersham Biosciences)".
8. Página 34, penúltima linha, acrescentar "(estrados)" após a palavra "pallets".
9. Página 37, segunda linha, acrescentar "após 48 h" depois da palavra "alíciclobacilos".
10. Página 44, terceiro parágrafo, onde se lê *Hae* III, *Hha* I e *Msp* I, leia-se apenas "*Hae* III". Onde se lê "11", substituir por "7".
11. Página 45, na figura e na legenda da Figura 6, substituir as letras C, D, F, A, K, L e E por 5, 6, 7, 1, 9, 10 e 8, respectivamente.
12. Página 46, substituir a Tabela 8 existente pela Tabela 8 citada neste Anexo.
13. Página 47, segundo parágrafo, após o número "0293", acrescentar "representativo na Tabela 10".
14. Página 48, quarto parágrafo, onde se lê "*A. pomorum*", substituir por "*A. pomorum-like*".
15. Página 59, rodapé da tabela, onde se lê "n.d. = não característico", substituir por "n.d. = não determinado".
16. Página 60, última linha, após a palavra "ARDRA", acrescentar as palavras "da região espaçadora".
17. Página 61, terceiro parágrafo, onde se lê "amostras identificadas como *A. pomorum-like*", substituir por "amostra identificada como *A. pomorum-like* (CBMAI 0279)".

Tabela 8. Perfis de ARDRA obtidos para as linhagens de *Alicyclobacillus* spp. estudadas.

Linhagem representativa do padrão	Origem	Hha I	Msp I	Hae III	Grupo
CBMAI 0289	Suco concentrado, antes das adições, NSC-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0292	Suco concentrado, após adições, NSC-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0291	Suco concentrado, antes das adições, NSC-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0294	Suco concentrado, NSC-Sul	1	4	4	B
CBMAI 0293	Água taste (usada no enxágüe final de tanques e correção de Brix), NSC-Sul	2	5	5	C
CBMAI 0288	Suco fresco, entrada evaporador, NSC-Sul	3	2	1	D
CBMAI 0282	Suco concentrado, antes das adições, F-Centro	3	2	2	E
CBMAI 0284	Suco concentrado, após adições, FBo-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0273	Polpa finisher, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0267	Suco concentrado, após pasteurização, FP-Norte	1	1	1	A
CBMAI 0268	Suco concentrado, após pasteurização, FP-Norte	1	1	1	A
CBMAI 0286	Suco concentrado, após adições, F-Centro	1	1	1	A
CBMAI 0276	Polpa finisher, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0275	Polpa finisher, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0270	Suco concentrado, antes das adições, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0285	Suco concentrado, após adições, FBo-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0272	Polpa finisher, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0280	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro	1	1	1	A
CBMAI 0271	Suco concentrado, antes das adições, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0274	Suco fresco, entrada do evaporador, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0290	Suco concentrado, após as adições, NSC-Sul	1	4	7	F
CBMAI 0281	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro	1	1	1	A
CBMAI 0269	Suco concentrado, antes das adições, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0283	Suco concentrado, após adições, FBo-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0295	Suco concentrado, SJ-Norte	1	4	7	F
CBMAI 0278	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro	3	2	1	D
CBMAI 0296	Suco concentrado, antes das adições, SJ-Norte	1	1	1	A
CBMAI 0277	Suco fresco, entrada do evaporador, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0279	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro	3	2	2	E
CBMAI 0287	Suco concentrado, após adições, SJ-Norte	1	1	1	A
CBMAI 0245	Solo, Antártica	2	7	7	I
CBMAI 0297	Solo	5	8	1	J
CBMAI 0244	Solo	1	1	1	A
CBMAI 0247	Bebidas ácidas Japão	6	9	9	K
CBMAI 0246	Solo sulfatário, Ilha San Miguel, Açores	7	10	10	L
CBMAI 0298	Solo	2	5	5	C
CBMAI 0299	Erva de chá, Japão	8	2	12	M

Abreu Filho, Benício Alves de

Caracterização taxonômica de linhagens de *Alicyclobacillus* spp. isoladas na indústria de suco concentrado de laranja.

Errata

1. Página 6, item 3.1, primeiro parágrafo, onde se lê "desses organismos", substituir por "e dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*".
2. Página 6, item 3.1, terceiro parágrafo, onde se lê "até 1994-1995", substituir por "até 1994".
3. Página 7, terceiro parágrafo, suprimir a palavra "achatada".
4. Página 10, segundo parágrafo, substituir "inviável" por "viável".
5. Página 13, segunda linha, após "à presença", acrescentar "como componente principal".
6. Página 20, última linha, onde se lê "em glicerol", substituir por "em meio de cultura com glicerol".
7. Página 31, terceiro parágrafo, após "fabricantes", acrescentar "(Amersham Biosciences)".
8. Página 34, penúltima linha, acrescentar "(estrados)" após a palavra "pallets".
9. Página 37, segunda linha, acrescentar "após 48 h" depois da palavra "alíciclobacilos".
10. Página 44, terceiro parágrafo, onde se lê *Hae* III, *Hha* I e *Msp* I, leia-se apenas "*Hae* III". Onde se lê "11, substituir por 7".
11. Página 45, na figura e na legenda da Figura 6, substituir as letras C, D, F, A, K, L e E por 5, 6, 7, 1, 9, 10 e 8, respectivamente.
12. Página 46, substituir a Tabela 8 existente pela Tabela 8 citada neste Anexo.
13. Página 47, segundo parágrafo, após o número "0293", acrescentar "representativo na Tabela 10".
14. Página 48, quarto parágrafo, onde se lê "*A. pomorum*", substituir por "*A. pomorum-like*".
15. Página 59, rodapé da tabela, onde se lê "n.d. = não característico", substituir por "n.d. = não determinado".
16. Página 60, última linha, após a palavra "ARDRA", acrescentar as palavras "da região espaçadora".
17. Página 61, terceiro parágrafo, onde se lê "amostras identificadas como *A. pomorum-like*", substituir por "amostra identificada como *A. pomorum-like* (CBMAI 0279)".

Tabela 8. Perfis de ARDRA obtidos para as linhagens de *Alicyclobacillus* spp. estudadas.

Linhagem representativa do padrão	Origem	Hha I	Msp I	Hae III	Grupo
CBMAI 0289	Suco concentrado, antes das adições, NSC-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0292	Suco concentrado, após adições, NSC-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0291	Suco concentrado, antes das adições, NSC-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0294	Suco concentrado, NSC-Sul	1	4	4	B
CBMAI 0293	Água taste (usada no enxágüe final de tanques e correção de Brix), NSC-Sul	2	5	5	C
CBMAI 0288	Suco fresco, entrada evaporador, NSC-Sul	3	2	1	D
CBMAI 0282	Suco concentrado, antes das adições, F-Centro	3	2	2	E
CBMAI 0284	Suco concentrado, após adições, FBo-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0273	Polpa finisher, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0267	Suco concentrado, após pasteurização, FP-Norte	1	1	1	A
CBMAI 0268	Suco concentrado, após pasteurização, FP-Norte	1	1	1	A
CBMAI 0286	Suco concentrado, após adições, F-Centro	1	1	1	A
CBMAI 0276	Polpa finisher, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0275	Polpa finisher, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0270	Suco concentrado, antes das adições, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0285	Suco concentrado, após adições, FBo-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0272	Polpa finisher, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0280	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro	1	1	1	A
CBMAI 0271	Suco concentrado, antes das adições, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0274	Suco fresco, entrada do evaporador, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0290	Suco concentrado, após as adições, NSC-Sul	1	4	7	F
CBMAI 0281	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro	1	1	1	A
CBMAI 0269	Suco concentrado, antes das adições, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0283	Suco concentrado, após adições, FBo-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0295	Suco concentrado, SJ-Norte	1	4	7	F
CBMAI 0278	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro	3	2	1	D
CBMAI 0296	Suco concentrado, antes das adições, SJ-Norte	1	1	1	A
CBMAI 0277	Suco fresco, entrada do evaporador, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0279	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro	3	2	2	E
CBMAI 0287	Suco concentrado, após adições, SJ-Norte	1	1	1	A
CBMAI 0245	Solo, Antártica	2	7	7	I
CBMAI 0297	Solo	5	8	1	J
CBMAI 0244	Solo	1	1	1	A
CBMAI 0247	Bebidas ácidas Japão	6	9	9	K
CBMAI 0246	Solo sulfatário, Ilha San Miguel, Açores	7	10	10	L
CBMAI 0298	Solo	2	5	5	C
CBMAI 0299	Erva de chá, Japão	8	2	2	M

Dedicatória

Agradecimento e dedicação

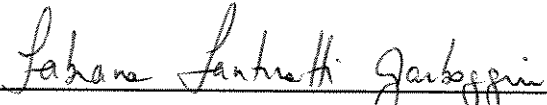
A Deus, causa primária de tudo e pela minha vida, aos amigos espirituais pelo auxílio, proteção e equilíbrio em todas as jornadas da minha vida.

À Tânia, belo amor, querida esposa, dedicada, incentivadora e grande amiga em todos os momentos, ao Vitor e Marcela, pela alegria de tê-los como filhos...

Aos meus pais (*in memoriam*), Benício e Catarina Lourdes, pelos ensinamentos, amor e carinho dedicados a nossa família.

Banca Examinadora


Dr. Gilson Paulo Manfio (Orientador)


Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini (Membro)


Dra. Lara Durães Sette (Membro)


Dra. Marta Teixeira Duarte (Membro)


Dra. Silvia Yuko Eguchi (Membro)


Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano (Membro)

Agradecimentos

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, à Universidade Estadual de Maringá e aos professores da disciplina Microbiologia pela possibilidade da realização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa recebida durante o desenvolvimento deste trabalho, à FAPESP e CNPq, pelo apoio ao desenvolvimento do projeto por meio dos equipamentos e infra-estrutura instalados nos laboratórios do CPQBA/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos, pelo aceite de orientação na fase inicial dos trabalhos.

Um agradecimento especial:

Ao Gilson, pela orientação, sabedoria, sugestões e direcionamento ao longo dos trabalhos.

À Valéria, pela orientação, dedicação, paciência nos ensinamentos, querida amiga que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

À Marta Cristina Teixeira Duarte pela possibilidade de utilizar o laboratório da Divisão Microbiologia do CPQBA/UNICAMP durante a parte inicial dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Itamar Soares de Mello, pela utilização do seu laboratório de pesquisa EMBAPA/Jaguariúna, na etapa das análises quimiotaxonômicas.

Ao Adilson Sartoratto, do laboratório de química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA/UNICAMP, pela colaboração nas análises dos ácidos graxos.

À querida amiga Fabiana, pela valiosa colaboração nos experimentos, com palavras sempre incentivadoras.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!!

Índice

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	viii
Resumo.....	x
Abstract	xi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos	3
3. Revisão Bibliográfica	5
3.1. Bactérias ácido-termofílicas associadas à deterioração de sucos de frutas ácidas.....	6
3.2. Diversidade, ocorrência e caracterização taxonômica de <i>Alicyclobacillus</i> spp.	11
4. Material e Métodos.....	20
4.1. Linhagens microbianas, métodos de manutenção em laboratório e preparação de soluções padronizadas de esporos.....	20
4.2. Ensaios de crescimento de aliciclobacilos em amostras de suco de laranja reconstituído	23
4.3. Caracterização fenotípica dos isolados	24
4.4. Análise da composição de ácidos graxos	27
4.5. Análise de restrição da região espaçadora DNA 16S-23S	30
4.6. Seqüenciamento e análise filogenética de DNAr 16S	32
5. Resultados e Discussão.....	34
5.1. Ensaios de proliferação/deterioração de suco reconstituído de laranja.....	34
5.2. Caracterização fenotípica de aliciclobacilos no sistema API 50CH.....	39
5.3. Caracterização molecular usando o método ARDRA	44
5.4. Caracterização do padrão de ácidos graxos celulares	48
5.5. Análise filogenética de seqüências de DNAr 16S	52
5.6. Identificação polifásica e considerações sobre a diversidade de aliciclobacilos isolados de amostras de fábricas de suco laranja	57
6. Conclusões.....	60
7. Referências Bibliográficas.....	62
8. Anexos.....	72

Lista de Figuras

Figura 1.	Esquema geral de desenvolvimento do projeto	4
Figura 2.	Estruturas dos principais ácidos graxos omega-cíclico de <i>Alicyclobacillus</i> spp.	13
Figura 3.	Ensaio de deterioração de amostras de suco de laranja reconstituído inoculados com diferentes linhagens de <i>Alicyclobacillus</i> spp.	25
Figura 4.	Aspecto característico de colônias de <i>Alicyclobacillus</i> spp.(CBMAI 0291) na superfície de meio BAT	25
Figura 5.	Perfil de utilização de carboidratos de <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> DSM 446 ^T no sistema API 50CH	41
Figura 6.	Padrões de ARDRA de fragmentos de região espaçadora rDNA 16S-23S de linhagens de <i>Alicyclobacillus</i> spp. obtidos com <i>Hae</i> III	45
Figura 7.	Perfil de ácidos graxos de <i>Alicyclobacillus pomorum</i> CBMAI 0279	51
Figura 8.	Análise filogenética de seqüências de rDNA 16S de <i>Alicyclobacillus</i> isolados de sucos	53

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Padrões de ácidos graxos de membrana celular de diferentes espécies de <i>Alicyclobacillus</i> spp.	15
Tabela 2.	Características bioquímicas de espécies do gênero <i>Alicyclobacillus</i> spp.	18
Tabela 3.	Isolados de ATSB selecionados para realização dos experimentos de caracterização taxonômica e ensaios de biodeterioração	21
Tabela 4.	Fontes de carbono do sistema API 50 CH	26
Tabela 5.	Descrição da composição da reação de PCR do DNAr 16S	32
Tabela 6.	Resultados dos ensaios de deterioração de suco de laranja reconstituído inoculado com aliciclobacilos	37
Tabela 7.	Perfis de utilização de carboidratos por linhagens de aliciclobacilos no sistema API 50 CH	42
Tabela 8.	Perfis de ARDRA obtidos para as linhagens de <i>Alicyclobacillus</i> spp. estudadas	46
Tabela 9.	Padrões de ácidos graxos de membrana de diferentes isolados de <i>Alicyclobacillus</i> spp. analisados	50
Tabela 10	Identificação polifásica de aliciclobacilos isolados de amostras de fábricas de suco laranja	59

Resumo

Trinta linhagens de bactérias acidotermofílicas isoladas do processamento industrial de suco de laranja concentrado congelado (*Frozen Concentrated Orange Juice*, FCOJ) em diferentes regiões do estado de São Paulo foram estudadas, utilizando-se uma abordagem polifásica, a fim de se determinar a diversidade e potencial deteriogênico destas em processos de produção de FCOJ no país. A caracterização dos isolados envolveu a determinação da capacidade de crescimento e produção de odor em suco reconstituído, análises fenotípicas (padrão de utilização de carboidratos, sistema API 50 CH), quimiotaxonômicas (perfil de FAMES, sistema MIDI) e de caracterização molecular (ARDRA de região espaçadora DNAr 16S-23S com *Hae* III, *Hha* I e *Msp* I, e análise filogenética de DNAr 16S). Todos os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Alicyclobacillus* pelos padrões característicos de ácidos graxos. Diferentemente de relatos de literatura, foi confirmada a presença de omega-ciclohexil-C17:0 e omega-ciclohexil-C19:0 em amostras identificadas como *A. pomorum*. Das 30 amostras ambientais de aliciclobacilos analisadas, 21 foram capazes de se multiplicar em suco de laranja reconstituído após 24 ou 48 h de incubação a 45 °C, mas apenas 10 produziram odor característico de biodeterioração. Seis ribotipos de ARDRA foram obtidos para os isolados, permitindo a alocação destes nas espécies *A. acidocaldarius* e *A. acidoterrestris*, e em grupos relacionados a espécies válidas designados como *A. acidocaldarius-like* e *A. pomorum-like*.

Palavras-chave: *Alicyclobacillus*, ATSB, suco concentrado de laranja, biodeterioração, taxonomia polifásica

1. Introdução

Alicyclobacillus spp. são bactérias ácido-termofílicas formadoras de esporos que têm sido comumente isoladas de alimentos e bebidas ácidas termoprocessadas. Estes microrganismos são conhecidos na indústria pela sigla ATSB (*acid-thermophilic sporeforming bacteria*) e têm sido associados à deterioração de sucos de laranja reconstituídos, quando estes são inadequadamente armazenados sob temperaturas elevadas após pasteurização. Esporos de *Alicyclobacillus* apresentam elevada resistência térmica, o que pode possibilitar a sua sobrevivência durante os processos de concentração a alta temperatura e esterilização do suco por pasteurização empregados na indústria (LEE *et al.*, 2002).

A deterioração de suco de frutas por *Alicyclobacillus* é caracterizada pela produção de odor "anti-séptico", atribuído ao guaiacol, produzido durante o processo. Contudo, a capacidade biodeteriogênica não é uma característica presente em todas as linhagens isoladas na indústria (BORLINGHAUS & ENGEL, 1997; BROWN, 1996).

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. Na safra 2004/2005, o Brasil exportou 1.411.173 toneladas de suco de laranja concentrado congelado (ABECitrus 2005; <http://www.abecitrus.com.br/expormes.html>), representando uma parcela significativa da balança comercial do país. Ainda, o cultivo e produção geram um grande número de empregos e renda nas regiões produtoras. Desta forma, a exportação de sucos concentrados de laranja contribui significativamente para a balança comercial do país.

A qualidade dos produtos citrícolas é fundamental para o contínuo crescimento do setor, influenciando na competitividade do Brasil no cenário internacional. Assim a qualidade microbiológica inadequada dos sucos e demais sub-produtos 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, como foi verificado nos episódios de contaminação de sucos reconstituídos de laranja ocorridos no verão de 1994-95 na Europa (EGUCHI *et al.*, 2001a).

Microrganismos contaminantes de sucos processados tradicionalmente monitorados por exigência da legislação no Brasil incluíam bolores, leveduras e algumas poucas bactérias de importância médico-sanitária (HATCHER *et al.*, 1992). A detecção e identificação de ATSB requer a utilização de procedimentos complementares, incluindo análises de caracterização morfológica, bioquímica, quimiotaxonômica e/ou molecular. Recentemente, novas espécies foram descritas utilizando abordagens polifásicas, evidenciando uma grande diversidade de ATSB em diferentes tipos de substratos (GOTO *et al.*, 2003).

Neste sentido, conhecer a diversidade de ATSB contaminantes de suco concentrado de laranja (FCOJ), assim como aquelas presentes em diferentes etapas do processo de produção, é fundamental para a avaliação dos riscos microbiológicos envolvidos. O mapeamento desta diversidade nas principais áreas de produção no Brasil é particularmente interessante, uma vez que, tanto as principais regiões produtoras de laranja, como as principais fábricas, apresentam uma distribuição geográfica relativamente ampla, a qual engloba regiões com microclimas diferenciados, localizados principalmente no norte, noroeste e nordeste do Estado de São Paulo.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização de linhagens isoladas do processamento industrial de suco concentrado de laranja em diferentes regiões do Estado de São Paulo e a caracterização do potencial de deterioração destes em suco de laranja reconstituído. Para tal uma estratégia polifásica de estudo foi adotada (Figura 1), com o seguinte detalhamento:

- seleção de isolados de aliciclobacilos representativos de diferentes etapas de processamento industrial, oriundos de diferentes fábricas, em diferentes regiões produtoras do estado de São Paulo;
- determinação da capacidade de crescimento dos isolados em suco de laranja reconstituído e avaliação da biodeterioração do suco.
- caracterização fenotípica dos isolados através da determinação do padrão de utilização de carboidratos (sistema API 50 CH);
- caracterização quimiotaxonômica, através da determinação do perfil de ácidos graxos (sistema MIDI);
- determinação da variabilidade genômica de isolados de diferentes amostras coletadas, empregando-se o método de caracterização molecular de PCR-RFLP de fragmentos de região espaçadora de DNAr 16S-23S (ARDRA, *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*);
- identificação das espécies empregando seqüenciamento e análise filogenética de DNAr 16S das linhagens representativas dos grupos de ARDRA;

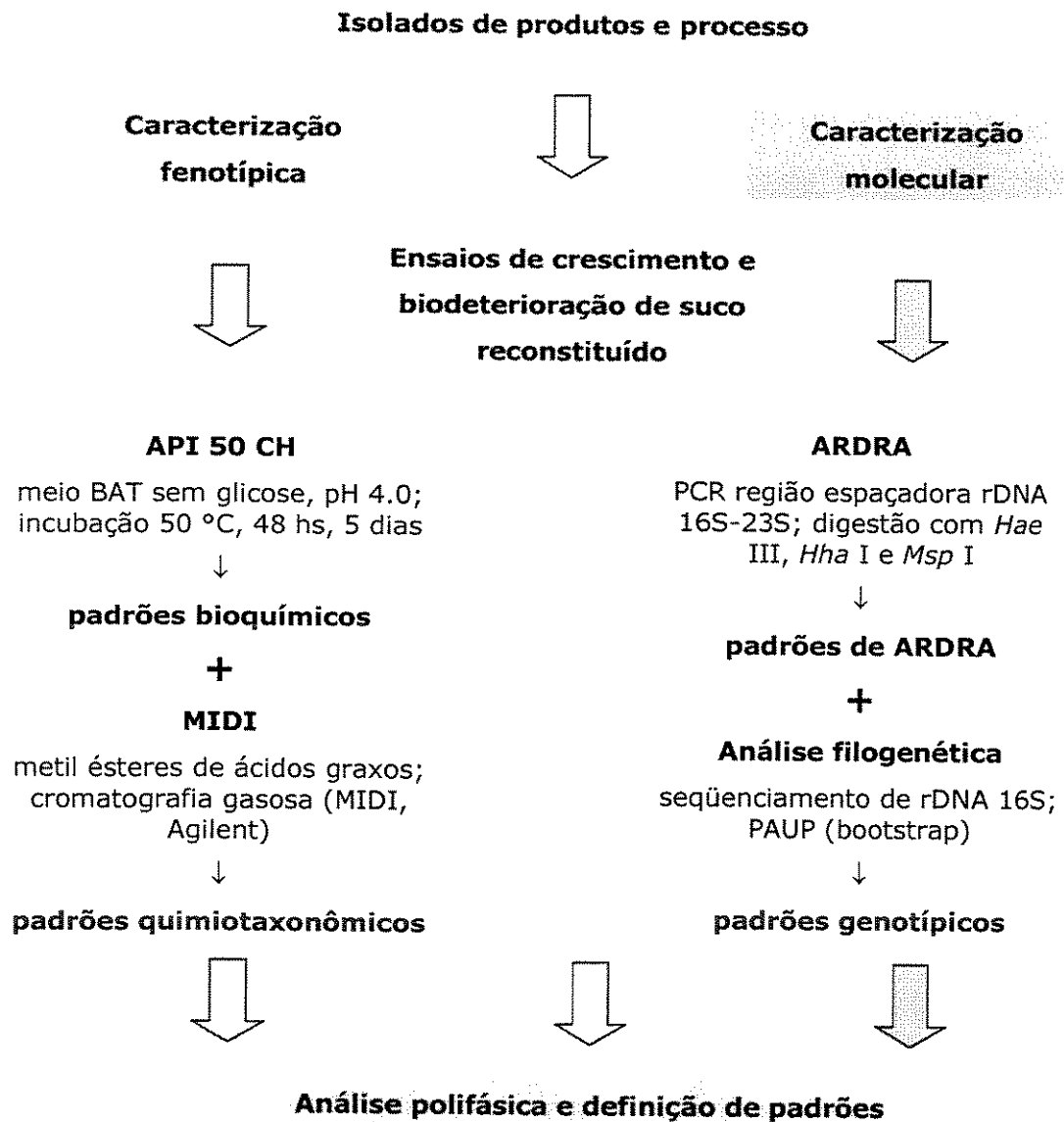


Figura 1. Esquema geral de desenvolvimento do projeto.

3. 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 deteriorogênicos potenciais, tal como bactérias lácticas, bolores e leveduras (HATCHER *et al.*, 1992). As características específicas do suco de laranja, incluindo pH entre 3,5 e 4,0, baixa atividade de água (A_w), elevada concentração de açúcares (66° Brix) e viscosidade, baixa capacidade de aeração e teor de oxigênio dissolvido reduzido, aliadas ao tratamento térmico que o produto sofre durante o processo de concentração, são fortes barreiras à sobrevivência e à posterior proliferação ou atividade metabólica dos principais microrganismos deteriorogênicos e/ou patogênicos que possam contaminar o suco.

No caso de sucos de laranja concentrados congelados (FCOJ), armazenados sob baixas temperaturas (-18 °C), a ação deteriorogênica dos microrganismos é totalmente inibida. Entretanto, quando o suco concentrado (66° Brix) é reconstituído com água na concentração de 11° Brix, o produto torna-se susceptível à eventual proliferação e ação deteriorogênica de microrganismos contaminantes.

Após sua reconstituição, o suco é pasteurizado e envazado, sendo que as formas dormentes de bactérias (esporos) podem ser ativadas neste processo e encontrar condições adequadas para germinação e crescimento na embalagem final, o que pode, em determinadas condições, levar à deterioração do produto (EGUCHI *et al.*, 2000). 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.*, 1989). Além disso, em produtos com

processamento UHT (*Ultra High Temperature*), em particular, a presença de microrganismos viáveis acima de valores especificados na legislação pode comprometer todo o lote de produção, uma vez que invalida a esterilidade comercial do produto (ANVISA, RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001).

3.1. Bactérias ácido-termofílicas associadas à deterioração de sucos de frutas ácidas

As espécies de bactérias deteriogênicas frequentemente associadas aos sucos de frutas ácidos ($\text{pH} < 4,5$) processados incluem microrganismos pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e bactérias acetogênicas (HATCHER *et al.*, 1992). A maioria desses organismos é acidofílico estrito ou acidotolerante, termotolerante ou termofílico, tendo como característica em comum uma elevada resistência à temperatura.

Poucos estudos sugerem que o isolamento do bacilo acidotermofílico esporulado do gênero *Alicycobacillus* esteja associado à deterioração do suco de laranja. CERNY *et al.* (1984) foram os primeiros a relatar a presença de *A. acidoterrestris* em amostras de suco de maçã, pH 3,15 deterioradas produzidas em 1982 as quais foram assepticamente pasteurizadas e embaladas em processamento industrial. Estes autores caracterizaram as linhagens isoladas e verificaram a sua capacidade de produzir alterações no sabor e no aroma do produto, germinar em valores baixos de pH e crescer em temperaturas que variam entre 26-55 °C. Seus esporos possuíam resistência térmica extremamente elevada, que possibilitavam a sobrevivência destes no processo de pasteurização industrial.

Não há nenhum outro relato de deterioração causada por *Alicyclobacillus* spp. até 1994-1995. A ocorrência desses bacilos em sucos de frutas e no suco de laranja concentrado congelado (FCOJ)

ganhou importância após episódios de deterioração envolvendo sucos embalados por processos *hot-fill* (envase a quente) na Europa, que, coincidiu com períodos de verões muito quentes nos anos de 1994 e 1995, (PINHATTI *et al.*, 1997).

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, sem 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*. Neste estudo a deterioração foi caracterizada, mais uma vez, pela produção de odores desagradáveis e crescimento de microrganismo através da turbidez. Contudo, os autores não concluíram a identificação das linhagens isoladas.

A. 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 um bacilo de forma achatada, formador de esporos ovais com localização central, terminal ou subterminal. As colônias são arredondadas, cremosas, brancas e opacas, com 3 a 5 mm de diâmetro após 5 dias de crescimento em meio K Agar, com pH entre 2,5 e 5,5 a uma temperatura de 35 °C. A reação com a coloração de Gram é positiva ou variável (WALLS & CHUYATE, 1998) Possui resistência à pasteurização, sendo capaz de crescer em vasta faixa de temperatura, podendo produzir o guaiaacol e outros compostos (WALLS & CHUYATE, 2000a, b).

Estudos variados demonstraram que a resistência térmica de esporos de *A. acidoterrestris* pode ser influenciada pela composição, presença de íons bivalentes (YAMAZAKI *et al.*, 1997), pH e ácidos orgânicos no meio de cultivo (PONTIUS *et al.*, 1998).

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, *A. acidoterrestris* foi isolado de bebidas ácidas deterioradas (YAMAZAKI *et al.*, 1996) e causou deterioração do tipo *flat-sour*. Nesta mesma época, uma bactéria acidotermofílica e formadora de esporo foi isolada em bebida ácida nos EUA (SPLITTSTOESSER *et al.*, 1994; McINTYRE *et al.*, 1995).

Novas espécies de aliciclobacilos foram recentemente isoladas e descritas em diferentes tipos de alimentos. GOTO *et al.* (2002) isolaram *A. herbarius* de flores secas de erva-de-chá. Este organismo é um bacilo Gram positivo, estritamente aeróbico, móvel e formador de esporos, semelhante à descrição morfológica das demais espécies do gênero. O crescimento ocorre em temperaturas de 35 a 65 °C em pH 4,5 a 5,0, mas não ocorre crescimento em pH 3,0 ou 6,5. O principal ácido graxo encontrado foi o ω -cicloheptil-C18:0. O conteúdo G+C no DNA é de 56,2 mol%.

MATSUBARA *et al.* (2002) encontraram bactérias ácido-termofílicas em bebidas ácidas que possuíam odor de guaiacol. Os autores propuseram uma nova espécie do gênero para os isolados, *A. acidiphilus*, baseado na análise do seqüenciamento 16S RNAr e caracterização fenotípica. A temperatura ideal para o crescimento foi de 50 °C e pH 3,0. Em estudo do crescimento da bactéria no suco de laranja incubado entre 40 a 50 °C, observou-se a produção do guaiacol.

GOTO *et al.* (2003) descreveram a espécie *A. pomorum*, os microrganismos foram isolados de uma mistura de sucos ácidos e os microrganismos possuíam características ácido-termofílicas e crescimento em temperaturas de 30 a 60°C, em meio de cultura BAM (meio *B. acidocaldarius*) entre pH 4,5 a 5,0. Através de estudo de ácido graxos de membrana constataram que as linhagens desta nova espécie não apresentaram ácidos graxos ω -cíclicos como componentes principais de membrana, o que era, até então, uma característica comum e necessária para as demais espécies do gênero *Alicyclobacillus*.

A incidência de *Alicyclobacillus* spp. 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* spp. em sucos de frutas não deteriorados (PREVEDI *et al.*, 1995) sugere que a deterioração seja incidental, requerendo condições adequadas para seu desenvolvimento.

As características da deterioração causada por *Alicyclobacillus* spp. já descritas na literatura são:

- a presença de sabor e de odor desagradáveis, descrito como "anti-séptico", "desinfetante", embora muitas vezes o odor produzido pela deterioração seja pouco perceptível;
- ausência de formação de gases;
- pouca ou nenhuma alteração de pH,
- em alguns casos, pode apresentar um aumento da turbidez do produto
- pode apresentar a formação de um sedimento branco no fundo da embalagem, ou manter a aparência normal do produto.

Uma das principais causas do "off-flavor" em sucos de frutas é atribuída à formação de traços do composto 2-6 dibromofenol, na ordem de partes por trilhão (ppt), bem como 2-metoxifenol (guaiacol) (BORLINGHAUS & ENGEL, 1997; BROWN, 1996).

A deterioração de suco de frutas por *A. acidocaldarius* e *A. acidoterrestris* é caracterizada pelo odor anti-séptico atribuído ao guaiacol, um produto metabolismo da bactéria. Algumas estratégias de controle do problema de contaminação e biodeterioração de sucos cítricos por *A. acidoterrestris* envolviam assegurar a presença de populações baixas da bactéria no produto, associado a processos apropriados de produção e condições de estocagem que minimizassem ou eliminassem a deterioração. Contudo, ORR *et al.* (2000) verificaram o limiar de detecção do guaiacol em suco de maçã por análise sensorial, determinaram a população de *A. acidoterrestris* e o tempo de incubação a 21 ou 37 °C necessários para a detecção de guaiacol no suco. Os autores verificaram que o conteúdo de guaiacol no suco de maçã nem sempre se correlacionou com a população de células da bactéria. Assim, garantir níveis populacionais baixos pode não assegurar necessariamente a qualidade microbiológica do produto final. Ainda, o limite de sensibilidade de quantificação cromatográfica do componente é relativamente alto, tornando pouco inviável a aplicação do método de monitoramento cromatográfico utilizado no controle de qualidade de rotina.

Como consequência dos estudos de diferentes grupos de pesquisa em várias partes do Mundo, os *Alicyclobacillus* spp. foram considerados organismos-alvo na avaliação da qualidade de produtos ácidos termoprocessados, sendo associados à deterioração de sucos de frutas, bebidas ácidas 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) descrevem o isolamento de *Alicyclobacillus* spp. de vários substratos e etapas do processamento industrial de suco de laranja no Estado de São Paulo.

Alguns estudos 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 de ATSB na deterioração de sucos de laranja concentrados foi uma descoberta relativamente recente, trazendo a necessidade de se conhecer mais profundamente o comportamento desses organismos e de se estudar as possíveis formas de controlar ou eliminar as contaminações, seja na sua origem (solo, água ou outra fonte) e/ou nas etapas de industrialização dos sucos ácidos (SPLITTSTOESSER, 1994).

3.2. Diversidade, ocorrência e caracterização taxonômica de *Alicyclobacillus* spp.

Os *Alicyclobacillus* spp. 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

Abstract

Thirty strains isolated from industrial processing of frozen concentrated orange juice (FCOJ) in different regions of the state of São Paulo were studied using a polyphasic approach with the goal of determining the diversity and deteriorogenic potential of isolates from FCOJ production in Brazil. Characterization of isolates involved determining their ability to grow and produce odor in reconstituted orange juice, and phenotypic (carbohydrate utilization, API 50 CH), chemotaxonomic (FAMES, MIDI system) and molecular analyses (ARDRA of 16S-23S rDNA spacer region, *Hae* III, *Hha* I and *Msp* I, and 16S rDNA phylogenetic analysis). All isolates were identified as *Alicyclobacillus* spp. according to the characteristic fatty acid patterns. Contrary to literature data, omega-cyclohexyl-C17:0 and omega-cyclohexyl-C19:0 were confirmed in samples identified as *A. pomorum*. From the 30 environmental alicyclobacili samples analyzed, 21 were able to grow in reconstituted orange juice after 24 or 48 hs incubation at 45 °C, but only 10 isolates yielded a characteristic biodeterioration odor. Six ARDRA patterns were obtained for the isolates analyzed, enabling them to be assigned to *A. acidocaldarius* and *A. acidoterrestris*, and to groups related to valid species named *A. acidocaldarius*-like and *A. pomorum*-like.

Key words: *Alicyclobacillus*, ATSB, concentrated orange juice, biodeterioration, polyphasic taxonomy.

que recebem tratamento térmico, também são fontes naturais para o isolamento de *Alicyclobacillus* spp. (EGUCHI *et al.*, 2001a).

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), EUA (DARLAND & BROCK, 1971), Itália e Rússia (LOGINOVA *et al.*, 1978).

A. acidoterrestris e *A. cycloheptanicus* foram isolados de diferentes tipos de solo (HIPPCHEEN *et al.*, 1981; DEINHARD *et al.*, 1987). O fato de organismos acidofílicos obrigatórios serem 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 em áreas próximas às raízes das plantas. Segundo HIPPCHEEN *et al.* (1981) os *Alicyclobacillus* spp. estão amplamente distribuídos nos solos e a sua detecção depende do refinamento das metodologias de isolamento e cultivo, possivelmente relacionado com requerimentos nutricionais e minerais específicos.

JENSEN & WHITFIELD (2003) descreveram o isolamento e identificação de bactérias e produtos metabólicos produzidos no suco atribuindo-lhe característica de deterioração. Elas mostraram a capacidade de produzir halofenóis, assim como do *A. acidoterrestris*, e indicam que alguns *A. acidoterrestris* contém sistemas de enzimas que são capazes de fazer a halogenação.

A identificação de *Alicyclobacillus* spp. está baseada nas características morfológicas das células e colônias, crescimento sob diferentes condições de temperatura e pH, testes de utilização de fonte de carbono, ensaios bioquímicos tradicionais e caracterização quimiotaxonômica. Particularmente, a análise dos ácidos graxos celulares (FAMES) proporciona informação importante para diferenciação

de *Alicyclobacillus* spp. de outras espécies de bacilos acidotermofílicos, devido à presença de ácidos graxos omega-cíclicos (Figura 2) característicos do grupo (DEINHARD, 1987; BERKELEY & ALI, 1994).

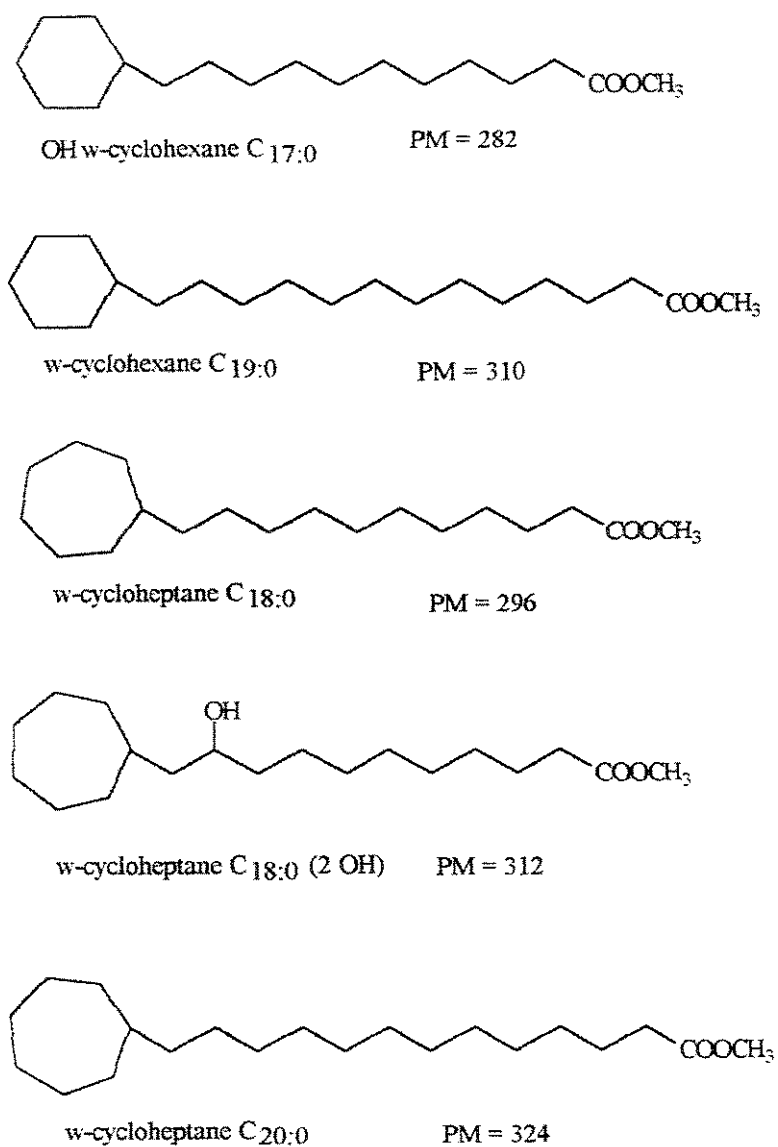


Figura 2. Estruturas dos principais ácido graxos omega-cíclicos de *Alicyclobacillus* spp.

Até 1992, as três espécies acidotermofílicas de *Alicyclobacillus* estavam alocadas no gênero *Bacillus* e nomeadas como *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* e *B. cycloheptanicus*. Contudo, a presença ácidos de graxos cíclicos, como ω -ciclohexil ou ω -cicloheptil, como principais componentes da membrana celular, permitiu diferenciar estas espécies das demais do gênero *Bacillus*. Ácidos graxos omega-cíclicos são os principais componentes do perfil de ácidos graxos de membrana das espécies do gênero, DEINHARD, 1987 (Tabela 1).

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). A análise comparativa de seqüências de RNA ribossomal 16S e perfis de ácidos graxos de membrana celular possibilitaram a alocação de *Bacillus acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* e *B. cycloheptanicus* no gênero *Alicyclobacillus* (WISOLTZKEY *et al.*, 1992).

Com relação a problemas microbiológicos em indústrias de alimentos, CERNY *et al.* (1984) foram os primeiros autores a isolar aliciclobacilos a partir de suco pasteurizado de maçã deteriorado. As características principais foram a resistência térmica extremamente elevada dos esporos, uma propriedade que permite a estes microrganismos sobreviver à pasteurização industrial e germinar em condições de baixo pH. Este microrganismo foi posteriormente classificado como *Bacillus acidoterrestris* (DEINHARD, 1987), e reclassificado, em 1992, como *Alicyclobacillus acidoterrestris* (WISOLTZKEY *et al.*, 1992).

Tabela 1. Padrões de ácidos graxos de membrana celular de diferentes espécies de *Alicyclobacillus* spp.

Espécies de <i>Alicyclobacillus</i> *	Composição dos principais ácidos graxos (%)													
	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	<i>iso</i> -C15:0	<i>iso</i> -C16:0	<i>iso</i> -C17:0	<i>iso</i> -C18:0	<i>anteiso</i> -C15:0	<i>anteiso</i> -C17:0	ω -ciclohexil C17:0	ω -ciclohexil C19:0	ω -cicloheptil C18:0
<i>A. acidocaldarius</i> ⁽¹⁾			1,7- 3,2		1,5- 2,5	1,4- 1,7	0,8- 2,8	2,6- 5,1		0,5- 1,2	0,7- 6,7	47,6 -	25,2 -	
<i>A. acidoterrestris</i> ⁽¹⁾	0- 1,2	0- 0,7	1,7- 9,7			0,8- 0,8	0- 0,5	1,2- 2,0		0,5- 1,1	3,2- 6,5	62,6 -	18,9 -	
<i>A. cycloheptanicus</i> DSM 4006 ⁽²⁾	0,8	0,6	2,4		1,3	0,5	1,0	2,7		tr	1,3			86,8
<i>A. herbarius</i> IAM 14883 ⁽²⁾	0,4	tr	5,1	0,5	2,4	0,4	3,8	5,6	3,2	tr	3			67,1
<i>A. hesperidum</i> DSM 12489 ⁽³⁾			2,1			5,4	0,9	4,9		66	10,3	56,8	13,3	
<i>A. pomorum</i> 3A ⁽¹⁾	0,5	0,5	1,4	tr	1,3	19,9	18,3	13,3	tr	9,9	34,2			

*Dados de (1) Goto et al. (2003); (2) Goto et al. (2002); (3) Albuquerque et al. (2000). tr: traços

NICOLAUS *et al.* (1998) isolaram bactérias termofílicas de uma região geotermal na Antártica e classificaram esses microrganismos como *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*. As condições de crescimento da bactéria incluem temperatura ótima de 63°C embora sejam capazes de crescer em temperaturas de 45 a 70°C e pH ótimo de 3,5 a 4,0. A porcentagem C+G do DNA desta espécie é 64,9%. Os autores relataram ainda similaridade no 16S rDNA de 99,3% com *A. acidocaldarius* DSM 446^T.

Recentemente várias bactérias aeróbias, acidofílicas, foram isoladas de solos sulfatários da área de Furnas, ilha de São Miguel, Açores, por ALBUQUERQUE *et al.* (2000), após estudos desses isolados, determinaram uma nova espécie do gênero *Alicyclobacillus* como *A. hesperidum*. As características desses microrganismos são bacilos Gram positivos, formadores de esporos terminal, não possuem motilidade, e crescem em meio BAM (meio para *Bacillus acidocaldarius*), em temperaturas entre 35 °C e 60 °C, e pH de 3,5 a 4,0.

Uma nova espécie, *A. sendaiensis* foi isolada do solo do Japão em Sendai. TSURUOKA *et al.* (2003) propuseram a descrição desta nova espécie, através da análise da sequência do 16S rDNA, estudo da composição de ácidos graxos e das propriedades fenotípicas dessa bactéria. Os autores verificaram também a atividade da collagenase ácida extracelular com potencial aplicação industrial.

Estudos realizados por GOTO *et al.* (2002a), através da comparação da sequência do gene 16S rRNA (rDNA) de sete diferentes espécies de *Alicyclobacillus* (cinco espécies validadas, uma proposta de nova espécie e uma espécie genômica), sugerem que a região terminal 5' e região hipervariável (259-273 bases) do 16S rDNA são específicas para as espécies analisadas. Análises filogenéticas baseadas na sequência da região hipervariável de 24 linhagens de *Alicyclobacillus*

spp. permitiram separá-las em seis grupos: *A. acidiphilus*, *A. acidoterrestris*, *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius* e *A. hesperidum*, cuja região hipervariável mostrou-se conservada, e *A. acidocaldarius*-*Alicyclobacillus* espécie genômica grupo 1, com subdivisões em *cluster* I (*Alicyclobacillus* espécie genômica grupo 1) e II (*A. acidocaldarius*).

SIMBAHAN *et al.* (2004) isolaram uma linhagem de fontes termais no deserto de Mojave (Califórnia, USA). De acordo com seus resultados propuseram a nova espécie *Alicyclobacillus vulcanalis*, bactéria ácido-termofílica com crescimento aeróbico em temperatura de 35 a 65 °C (ótimo 55 °C), com pH de 2,0 a 6,0 (ótimo 4,0).

A caracterização fenotípica de aliciclobacilos oferece informações importantes para a diferenciação das espécies no grupo. Os métodos disponíveis para realização de ensaios de assimilação de carboidratos, fontes de carbono e nitrogênio são de difícil implementação para isolados deste grupo, devido à necessidade de utilização de condições de cultivo termofílicas e pH baixo. Assim, a utilização de ensaios convencionais ainda é a forma de escolha para estes ensaios, sendo que o uso de kits, como o sistema API 50CH, requer a adaptação dos meios de cultivo e indicadores de viragem de pH (DEINHARD, 1987). Um perfil das características bioquímicas de diferentes espécies do grupo pode ser analisado na Tabela 2.

Tabela 2. Características bioquímicas de espécies do gênero *Alicyclobacillus* (GOTO *et al.*, 2003).

Propriedades	<i>A. pomorum</i> DSM 14955 ^T	<i>A. acidocaldarius</i> DSM 446 ^T	<i>Alicyclobacillus</i> sp. genômica I DSM 11984	<i>Alicyclobacillus</i> sp. genômica II MIH 332	<i>A. acidoterrestris</i> ATCC 49025 ^T	<i>A. hesperidum</i> DSM 12489 ^T	<i>A. acidiphilus</i> TA67 ^T	<i>A. cycloheptanicus</i> DSM 4006	<i>A. herbarius</i> IAM 14883 ^T
Oxidase	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Hidrólise da gelatina	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Hidrólise do amido	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Redução do nitrato à nitrito	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Crescimento a 5% de NaCl	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Metabolismo de:									
5-Cetogluconato	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Aesculina	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Amigdalina	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Arbutina	-	+	+	+	-	-	+	-	+
Beta-Gentiobiose	-	-	+	+	-	W	+	-	+
Celobiose	-	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	+	+	+
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Galactose	-	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Lixose	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Rafinose	-	+	+	+	-	-	+	-	+
D-Tagatose	+	-	+	+	-	-	-	+	-
D-Turanose	+	-	+	+	-	+	+	-	+
D-Xilose	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Erithritol	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Glicerol	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Glicogênio	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lactose	-	+	+	+	+	+	+	-	+
L-Arabinose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	-	-	+	-	-	+	+	-
L-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Melezitose	-	-	+	+	-	-	+	-	+
Melibiose	-	+	-	+	W	-	-	-	+
Metil-alfa-D-glicosídeo	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Metil-alfa-D-manosídeo	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Rhamnose	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Salicina	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Amido	-	+	-	+	-	W	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Xilitol	-	-	-	+	+	-	+	-	-

(+) assimilação positiva do substrato; (-) assimilação negativa do substrato; (W) assimilação fraca do substrato.

Apesar da importância dos *Alicyclobacillus* spp. na indústria de alimentos, existe, ainda, a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a diversidade e ecologia das espécies associadas à contaminação de diferentes ambientes industriais e produtos. Os únicos relatos de estudos abrangentes neste grupo de microrganismos são os estudos realizados no Brasil (EGUCHI *et al.*, 2001a, b, c), que permitiram o rastreamento de isolados de aliciclobacilos desde sua origem no campo, na superfície de laranjas e plantas nas plantações, sua entrada na indústria (silos de armazenagem e sistemas de lavagem de fruta), em sub-produtos de processamento industrial, como óleo essencial e aromas, e nos sistemas de água evaporada do processo de concentração.

Um conhecimento mais aprofundado sobre a diversidade de aliciclobacilos nos processos industriais poderá contribuir para uma melhor avaliação de riscos microbiológicos nestes processos e ações de monitoramento e controle de espécies deteriorogênicas, uma preocupação constante da indústria de sucos concentrados de laranja nacional.

4. Material e Métodos

4.1. Linhagens microbianas, métodos de manutenção em laboratório e preparação de soluções padronizadas de esporos

As linhagens de bactérias ácido-teromofílicas (ATSB) isoladas de amostras ambientais foram obtidas da Coleção de Culturas Tropical (CCT), Fundação André Tosello, Campinas, SP sendo originárias de um estudo de campo realizado em conjunto com a Associação Brasileira de Exportadores de Citrus (ABECitrus; Eguchi *et al.*, 2001a, b, c). Trinta linhagens de ATSB isoladas de suco de laranja em diferentes etapas do processo industrial, incluindo suco fresco, polpa, suco concentrado antes e após adições, foram selecionadas de 3 indústrias citrícolas (Norte, Centro e Sul) e 6 laranjais do Estado de São Paulo (FP e SJ, no Norte; F, no Centro, e FB, FBo e NSC, no Sul).

As linhagens-tipo das diferentes espécies de ATSB associadas a sucos de laranja e outros ambientes foram obtidas junto à Coleção de Culturas Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (DSZM; Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen) e compreendem linhagens-tipo das diferentes espécies do gênero *Alicyclobacillus*.

Todos os isolados utilizados no presente estudo (Tabela 3) foram depositados na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)/UNICAMP (Paulínia, SP). Suspensões de esporos e células vegetativas dos isolados foram preservados tanto por liofilização como por ultra-congelamento em glicerol (-80 °C).

Tabela 3. Isolados de ATSB utilizados nos experimentos de caracterização taxonômica e ensaios de biodeterioração.

Código Original*	Código CBMAI**	Origem
Isolados de amostras de suco de laranja		
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7227	CBMAI 0267	Suco concentrado, após pasteurização, FP-Norte
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7228	CBMAI 0268	Suco concentrado, após pasteurização, FP-Norte
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7187	CBMAI 0269	Suco concentrado, antes das adições, FB-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7188	CBMAI 0270	Suco concentrado, antes das adições, FB-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7195	CBMAI 0271	Suco concentrado, antes das adições, FB-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7245	CBMAI 0272	Polpa finisher, FB-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7246	CBMAI 0273	Polpa finisher, FB-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7247	CBMAI 0274	Suco fresco, entrada do evaporador, FB-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7355	CBMAI 0275	Polpa finisher, FB-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7356	CBMAI 0276	Polpa finisher, FB-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7357	CBMAI 0277	Suco fresco, entrada do evaporador, FB-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7267	CBMAI 0278	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7272	CBMAI 0279	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7276	CBMAI 0280	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7362	CBMAI 0281	Suco concentrado, após pasteurização, F-Centro
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7304	CBMAI 0282	Suco concentrado, antes das adições, F-Centro
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7230	CBMAI 0283	Suco concentrado, após adições, FBo-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7231	CBMAI 0284	Suco concentrado, após adições, FBo-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7232	CBMAI 0285	Suco concentrado, após adições, FBo-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7310	CBMAI 0286	Suco concentrado, após adições, F-Centro
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7292	CBMAI 0287	Suco concentrado, após adições, SJ-Norte
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7330	CBMAI 0288	Suco fresco, entrada evaporador, NSC-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7331	CBMAI 0289	Suco concentrado, antes das adições, NSC-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7332	CBMAI 0290	Suco concentrado, após as adições, NSC-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7346	CBMAI 0291	Suco concentrado, antes das adições, NSC-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7347	CBMAI 0292	Suco concentrado, após adições, NSC-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 6276	CBMAI 0293	Água taste (usada no enxágüe final de tanques e correção de Brix), NSC-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 6280	CBMAI 0294	Suco concentrado, NSC-Sul
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 6279	CBMAI 0295	Suco concentrado, SJ-Norte
<i>Alicyclobacillus</i> sp. CCT 7286	CBMAI 0296	Suco concentrado, antes das adições, SJ-Norte
Linhagens de referência		
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmanni</i> DSM 11297 ^T	CBMAI 0245 ^T	Solo, Antártica
<i>A. cycloheptanicus</i> DSM 4006 ^T	CBMAI 0297 ^T	Solo
<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922 ^T	CBMAI 0244 ^T	Solo
<i>A. acidiphilus</i> DSM 14558 ^T	CBMAI 0247 ^T	Bebidas ácidas Japão
<i>A. acidocaldarius</i> DSM 446 ^T	CBMAI 0298 ^T	Solo
<i>A. herbarius</i> DSM 13609 ^T	CBMAI 0299 ^T	Erva de chá, Japão
<i>A. hesperidum</i> DSM 12489 ^T	CBMAI 0246 ^T	Solo sulfatário, Ilha San Miguel, Açores

*CCT = Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Campinas, SP; **CBMAI = Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria, CPQBA/UNICAMP, Paulínia, SP. DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Suspensões padronizadas de esporos foram preparadas e mantidas sob congelamento a -20°C para serem utilizadas como inóculo nos ensaios de deterioração de suco reconstituído. A partir de cultura de células em placa de meio BAT (DEINHARD *et al.*, 1987), foram coletadas pelo menos cinco colônias isoladas, com o auxílio de uma alça de semeadura, as quais foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio BAT líquido. A suspensão foi incubada a 45°C por 72 horas, ou até que o nível de esporulação de aproximadamente 80% das células fosse observado por 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, aliquotado em criotubos (Nunc, 2 mL) e estocados a -20°C . A avaliação da viabilidade das suspensões de esporos foi determinada por diluição e contagem em placa (em duplicata), sendo expressas em UFC/mL. Alíquotas das suspensões de esporos foram ativadas por choque térmico (80°C por 10 minutos, em banho-maria), diluídas, plaqueadas na superfície de meio BAT por espalhamento, e incubadas a 45°C por 24-48 horas.

O meio de cultura utilizado para o cultivo dos isolados foi o Meio BAT (DEINHARD *et al.*, 1987), cuja composição encontra-se descrita a seguir.

MEIO BAT (DEINHARD *et al.*, 1987)

Solução A: meio base

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,50 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,20 g
KH_2PO_4	3,0 g
Extrato de levedura (Difco).....	1,0 g
Glicose.....	5,0 g

Solução de elementos traços (B) 1,0 mL
 Água destilada p/ meio líquidoq.s.p. 1 L
 Para meio sólido q.s.p. 500 mL + 500 mL Solução C. O pH do meio foi ajustado para 4,0.

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

CaCl₂ . 2 H₂O 0,66 g
 ZnSO₄ . 7 H₂O 0,18 g
 CuSO₄ . 5 H₂O 0,16 g
 MnSO₄ . 4 H₂O 0,02 g
 CoCl₂ . 6 H₂O 0,18 g
 H₃BO₃ 0,10 g
 Na₂MoO₄ . 2 H₂O 0,30 g
 Água destiladaq.s.p. 1 L
 Esterilizado por filtração.

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

Ágar (Difco)15 g
 Água destilada500 mL

A solução C (ágar 1,5%) ainda quente foi adicionada à mistura das soluções A e B, e o meio foi vertido nas placas rapidamente para evitar hidrólise do ágar devido ao baixo pH do meio.

4.2. Ensaios de crescimento de aliciclobacilos em amostras de suco de laranja reconstituído

Ensaios para avaliação da capacidade de proliferação das diferentes linhagens em amostras de suco de laranja reconstituído e determinação do potencial de biodeterioração do suco (produção de odor característico), foram realizadas em frascos tipo Schott de 100 mL contendo 25 mL de suco de laranja reconstituído (11-12° Brix; livre de ATSB) e inoculadas com aproximadamente 10¹ UFC/mL das suspensões

padronizadas de esporos. Os frascos foram incubados à temperatura de 45 °C por 24 a 48 horas. Amostras foram coletadas, após agitação, nos tempos 0, 24 e 48h de incubação, diluídas, submetidas a choque térmico (80 °C/10 min), plaqueadas em duplicata em meio BAT e incubadas a 45 °C por 48 horas para avaliação das populações de bactérias no suco mostrado na Figura 3.

Teste para verificação da produção de odor (*off flavour*), por meio de avaliação sensorial do *headspace* também foi avaliado, comparando-se os frascos com suco de laranja inoculados com os isolados e frascos-controle não-inoculados ou inoculados com um isolado sabidamente deteriogênico (*A. acidoterrestris* DSM 3922^T) (Figura 3).

4.3. Caracterização fenotípica dos isolados

As colônias isoladas de cultivos em meio BAT sólido submetidos a incubação a 45 °C por 48 hs foram utilizadas para caracterização do aspecto de morfologia das colônias e coloração de Gram ilustradas na Figura 4.

A caracterização fenotípica foi realizada utilizando-se o sistema API 50 CH (bioMérieux, França), que possui 49 fontes de carbono desidratadas (Tabela 4) distribuídas em galerias de ensaio. A preparação de inóculos padronizados foi realizada com cultivos de 24 h dos isolados em 100 mL de caldo BAT a 50 °C, sob agitação (150 rpm). As células foram centrifugadas a 5.000 g por 5 min e lavadas em solução salina esterilizada.

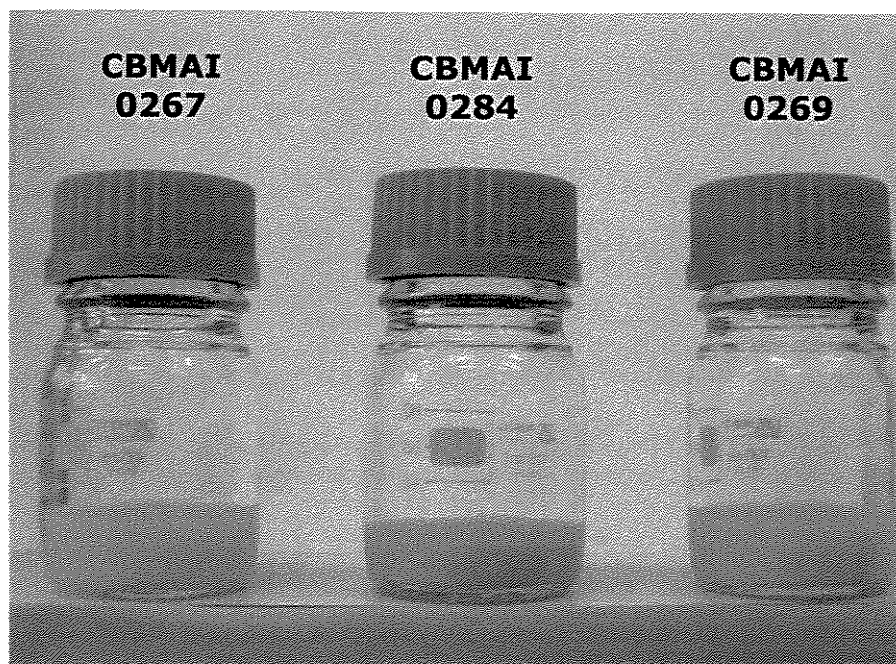


Figura 3. Ensaios de deterioração de amostras de suco de laranja reconstituído inoculados com diferentes linhagens de *Alicyclobacillus* spp.

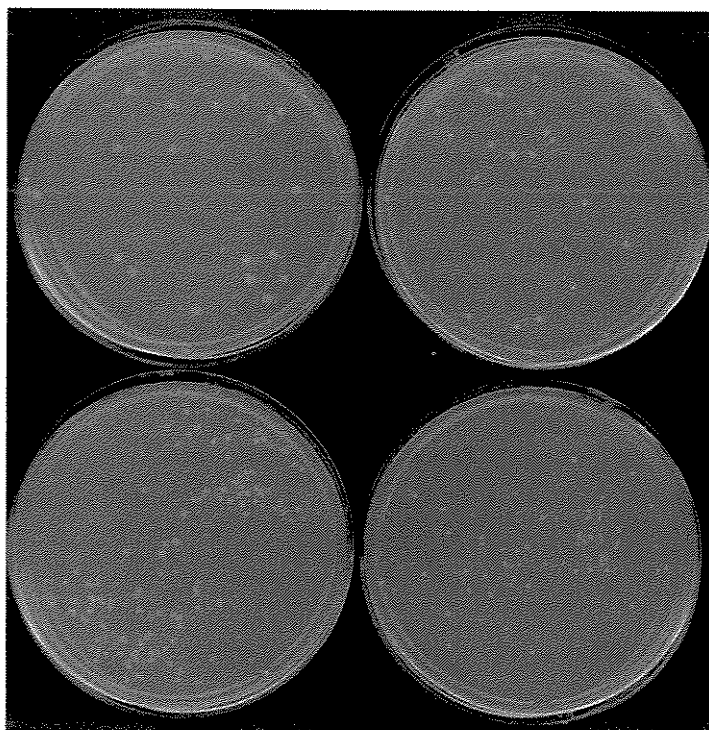


Figura 4. Aspecto característico de colônias de *Alicyclobacillus* sp. (CBMAI 0291) na superfície de meio BAT pH 4.0 (45 °C, 48 h).

Numa ampola do kit contendo 5 mL de solução de suspensão estéril foi padronizada a suspensão de células com turbidez equivalente ao tubo 2 da escala de MacFarland (aprox. 6×10^8 UFC/mL), conforme orientação do procedimento de utilização do KIT API 50 CH (Deinhard *et al.* 1987a). A suspensão de células padronizada foi utilizada para inoculação de 20 mL do meio basal de ensaio (meio BAT, sem adição de glicose e adição de azul de bromofenol 20 µg/mL, segundo Deinhard *et al.*, 1987a), a qual foi distribuída nos poços das galerias. As cartelas contendo as galerias foram acondicionadas em sacos plásticos contendo algodão úmido para evitar a evaporação excessiva durante a incubação a 50 °C por até 5 dias. As leituras de resultados foram feitas a partir de 24 horas de incubação.

Tabela 4. Fontes de carbono do sistema API 50 CH.

01. Glicerol	18. Manitol	35. D-Rafinose
02. Eritritol	19. Sorbitol	36. Amido
03. D-Arabinose	20. α-metil-D-Manosídeo	37. Glicogênio
04. L-Arabinose	21. α-metil-D-Glucosídeo	38. Xilitol
05. Ribose	22. N-acetil-Glucosamina	39. β-Gentiobiose
06. D-Xilose	23. Amidalina	40. D-Turanose
07. L-Xilose	24. Arbutina	41. D-Xilose
08. Adonitol	25. Esculina	42. D-Tagatose
09. β-metil-Xilosídeo	26. Salicina	43. D-Fucose
10. Galactose	27. Celobiose	44. L-Fucose
11. D-Glicose	28. Maltose	45. D-Arabitól
12. D-Frutose	29. Lactose	46. L-Arabitól
13. D-Manose	30. Melibiose	47. Gluconato
14. L-Sorbose	31. Sacarose	48. 2-ceto-Gluconato
15. Ramnose	32. Trealose	49. 5-ceto-Gluconato
16. Dulcitol	33. Inulina	
17. Inositol	34. Melezitose	

A acidificação do meio de cultura nos diferentes poços contendo substratos específicos foi classificada em diferentes categorias, definidas da seguinte forma:

- (-) assimilação negativa do substrato, sendo que a coloração do meio basal não difere do controle;
- (W) assimilação fraca do substrato, podendo alterar levemente a coloração do meio basal em comparação com o controle;
- (A/V) assimilação positiva do substrato, com viragem da coloração do meio basal de azul para amarelo (acidificação do meio).

Uma única exceção nesta codificação refere-se ao ensaio de esculina, onde não foi possível observar a formação de ácido devido à coloração marrom-negra observada na hidrólise de esculina na presença de citrato ferro.

4.4. Análise da composição de ácidos graxos

Na caracterização da composição de ácidos graxos de membrana foi empregada a metodologia do Sistema MIDI (Agilent), sendo as preparações de ácidos graxos analisadas por cromatografia gasosa na forma de ésteres metílicos (FAMES).

Em meio solidificado BAT pH 4,0, foi realizado um pré-cultivo dos isolados que foram incubados a 50 °C por 24 horas. Posteriormente, uma alçada deste crescimento celular foi inoculada por estrias em quatro quadrantes em uma nova placa de Petri, utilizando uma alça de semeadura. As estrias foram feitas da seguinte forma: no primeiro quadrante foram feitas 10 estrias, puxadas duas vezes com a alça de semeadura. No segundo quadrante foram feitas 10 estrias, puxadas duas vezes com a alça de semeadura e no terceiro quadrante 10 estrias. A alça de semeadura foi flambada e o material da terceira estria foi puxado duas vezes para realizar, no quarto quadrante, a quarta estria. É importante girar a alça de semeadura quando estiver fazendo as estrias

para evitar carrear material entre os movimentos de semeadura. As placas semeadas deste modo foram incubadas a 50 °C por no máximo 24 horas.

Após incubação, foi retirada da placa, por meio de alça de semeadura, uma quantidade de massa celular correspondente a aproximadamente 4 mm² de área (do tamanho de um grão de arroz) a partir da terceira estria de crescimento. Quando não houve crescimento na terceira estria, a massa celular da segunda estria seria coletada.

A saponificação, metilação e extração dos ácidos graxos celulares foram realizadas segundo protocolo do sistema MIDI (Agilent). Uma alíquota de 1,0 mL do reagente de saponificação foi adicionada a um tubo de vidro ou criotubos (Viol) contendo as células. Os tubos foram fechados com tampas com septo de teflon, brevemente agitados em vortex (5-10 segundos), acondicionados em banho-maria (100 °C por 5 min), novamente agitados em vortex por 5-10 seg e retornados ao banho-maria (100 °C, por mais 25 min). O reagente de saponificação consistiu de uma mistura de 45 g de hidróxido de sódio (Fischer, padrão HPLC, ref. S318-500), 150 mL de metanol (Fischer, padrão HPLC, ref. A452-1) e 150 mL de água destilada deionizada. Misturou-se primeiro a água, depois o metanol e por fim as pastilhas de NaOH.

Os tubos foram resfriados rapidamente em banho de gelo e 2 mL do reagente de metilação foram adicionados a cada tubo. O objetivo da metilação é diminuir a polaridade e aumentar a volatilidade. O ácido clorídrico e o metanol foram usados como catalisadores da reação de esterificação. Os tubos foram tampados e brevemente agitados em vortex. Após a homogeneização das soluções, os tubos foram aquecidos em banho-maria por 10 minutos a 80°C. Nesta etapa crítica do processo, o tempo e a temperatura foram estritamente monitorados. O reagente de metilação consistiu de uma mistura de 325 mL de ácido

clorídrico 6 N (Baxter, ref. 3750-32UK) e 275 mL de metanol, padrão HPLC. Adicionou-se o ácido sobre o metanol, sob agitação. A adição do ácido acelera o processo de ligação do metanol aos ácidos graxos. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) são pouco solúveis na fase aquosa nesta etapa.

A extração dos ácidos graxos foi feita adicionando-se aos tubos resfriados rapidamente em banho de gelo 1,25 mL do reagente de extração. Os tubos foram em seguida colocados no agitador de tubos e submetidos a agitação horizontal por 10 minutos. O reagente de extração consistiu de uma mistura de 200 mL de hexano (Fischer, padrão HPLC, ref. H302-1) e 200 mL de metil-terc-butil éter (Aldrich, ref. 29321-0). Adicionou-se o éter sobre o hexano, sob agitação rigorosa. A extração dos ésteres metílicos de ácidos graxos na fase orgânica foi então submetida a um processo de limpeza antes da injeção no cromatógrafo gasoso.

Foram adicionados aos tubos 3 mL do reagente de limpeza e a homogeneização ocorreu no agitador de tubos com agitação horizontal por 5 minutos. Houve separação visível em duas fases, sendo 2/3 da fase superior removida com o auxílio de pipeta Pasteur descartável e transferida para novo tubo (vial de GC), evaporada em fluxo de nitrogênio e a ampola foi selada. Os extratos secos foram conservados no freezer a -20 °C até o momento da análise cromatográfica. O reagente de lavagem ou limpeza, entre injeções das amostras, consistiu em uma solução de 10,8 g de hidróxido de sódio dissolvido em 900 mL de água destilada deionizada. Este procedimento reduz a contaminação da linha de injeção, da coluna e do detector.

Padrões de referência dos ácidos graxos omega-cíclicos foram preparados a partir das linhagens-tipo de aliciclobacilos, uma vez que ácidos graxos ciclohexanos ou cicloheptanos não são disponíveis como padrões comerciais de FAMES.

As análises cromatográficas foram realizadas preferencialmente no mesmo dia da extração. Os extratos de FAMES foram suspensos em 50 µL de hexano. Para a cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos, foi utilizado um cromatógrafo a gás HP 5890 (Agilent), acoplado a detetor seletivo de massas HP 5971. As condições cromatográficas para análise de FAMES foram: coluna capilar HP-5 (30 metros x 0,25 mm diâmetro x 0,25 mm de espessura de fase estacionária), injetor a 250 °C, coluna a 110 °C, com rampa de aquecimento de 5 °C/min até 300 °C (20 min.), detector a 280 °C, razão de split 1:40. O volume injetado foi 1 µL.

Os extratos de FAMES das linhagens-Tipo utilizados como padrão foram injetados no início e ao longo das análises. Os principais ácidos graxos nos cromatogramas de cada linhagem foram identificados a partir da comparação dos tempos de retenção destes com os de ácidos graxos das linhagens-referência utilizadas como padrão e padrões internos do sistema MIDI.

4.5. Análise de restrição da região espaçadora DNA 16S-23S (ARDRA)

A técnica de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) foi utilizada na caracterização de fragmentos da região espaçadora DNAr 16S-23S dos isolados e linhagens-tipo das espécies válidas de *Alicyclobacillus* spp. Para isto, o DNA genômico dos isolados, assim como das linhagens tipo, foi extraído pelo método da proteinase K (YOUNG & BLAKESLEY, 1991). Entre 5 a 10 colônias de uma placa com culturas novas foram suspensas em 100 µL de uma solução de lise (50 a

100 ng/ μ L de proteinase K dissolvidos em TE pH 7,5-8,0). Os tubos de microcentrífuga foram mantidos em banho-maria a 55 °C por 15 min e transferidos para um banho a 80 °C por mais 15 min., centrifugados por 7-10 min. a 12.000 g e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Aproximadamente 5 μ L do lisado obtido foi utilizado nas reações de PCR.

Para amplificação dos fragmentos de DNA 16S-23S foi utilizado o par de *primers* pHr [5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3']; (MASSOL-DEYA *et al.*, 1995) e p23S322-anti [5'-GGTTCTTTTCACCTTCCCTC-3']; (HONEYCUTT *et al.*, 1995), homólogos às extremidades conservadas do gene DNAr 16S e 23S de bactérias. As condições de PCR seguiram as definições da Tabela 5. O programa de amplificação consistiu de um passo de desnaturação a 95 °C por 2 min, seguido de 12 ciclos de 94 °C por 1 min, 63 °C por 1 min, com decréscimo de 0,5 °C por ciclo, e 72 °C por 2 min, e outros 23 ciclos de 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, em equipamento Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf). Os resultados de amplificação foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio (0,1 μ g/mL) e visualizados em transiluminador UV.

A digestão dos fragmentos com as enzimas de restrição selecionadas (*Hae* III, *Hha* I e *Msp* I) foi realizada de acordo com as especificações dos fabricantes com relação à temperatura, tempo de incubação e concentração de enzima utilizada.

Após a digestão enzimática, os padrões de restrição foram analisados em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio (0,1 μ g/mL) e submetidos a fotodocumentação sob luz UV (BioDoc It™ System UVP BioImaging Systems, Upland, CA, USA). Padrões de peso molecular de DNA (Fermentas) na faixa de 50 a 2 Kb (Fermentas).foram utilizados para análise dos perfis de restrição

4.6. Seqüenciamento e análise filogenética de DNAr 16S

A amplificação do DNA ribossomal 16S foi realizada pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente das amostras. O par de *primers* utilizado para a reação de PCR foi p27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; LANE, 1991) e p1401r (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAGG-3'; HEUER *et al.*, 1997), homólogos às extremidades conservadas do gene RNAr 16S de bactérias, e as condições de PCR seguiram as mesmas definições da Tabela 5. O programa de amplificação do DNAr 16S consistiu de 1 ciclo a 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min/55 °C por 1 min/72 °C por 3 min, seguido de 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 3 min e finalização a 4 °C.

Os resultados de amplificação do gene para RNAr 16S foram visualizados em géis de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio (0,1 µg/mL), e documentados com o sistema de fotodocumentação digital BioDoc It™ System (UVP BioImaging Systems, Upland, CA, USA). O padrão de peso molecular utilizado foi o 1 Kb DNA Ladder (Fermentas).

Tabela 5. Descrição da composição da reação de PCR do DNAr 16S.

Reagentes	Concentração da solução estoque	Concentração final por reação
Solução tampão da <i>Taq</i>	10 X	1 X
<i>Primer</i> p27f	20 µM	0,4 µM
<i>Primer</i> p1401r	20 µM	0,4 µM
dNTP's	25 mM	200 µM
<i>Taq</i> polimerase (Amersham Biosciences)	5 U/µL	2 U
DNA	-	50-100 ng
H ₂ O	-	qsp 50 /µL

Os produtos de PCR foram a seguir purificados utilizando o kit *GFX™ PCR-DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Health Care), quantificados por eletroforese em gel de agarose 1,2% e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático MegaBace 500 system (GE Health Care). O seqüenciamento foi realizado empregando o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Health Care). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram:

- 10f [5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; LANE, 1991];
- 530r [5'-GATTACCGCGGCGCTG-3'; LANE, 1991];
- 765f [5'-ATTAGATACCCTGGTAG-3'; WEISBURG *et al.*, 1991];
- 782r [5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGT-3'; CHUN, 1995];
- 1100r [5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3'; LANE, 1991].

Estes primers foram adicionados na concentração de 3,2 pmoles por reação. O programa utilizado para o seqüenciamento consistiu de um ciclo de 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 50 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

A identificação dos isolados foi realizada através da comparação das seqüências obtidas com dados de seqüência de RNAr 16S de linhagens tipo e referência disponíveis nas bases de dados públicas Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP (Ribosomal Database Project, <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>).

As seqüências foram alinhadas usando o programa CLUSTAL X (THOMPSON *et al.*, 1994) e analisadas usando o programa PAUP, versão 4.0 beta 10 (SWOFFORD, 2000). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo de substituição de Kimura (KIMURA, 1980) e a reconstrução filogenética foi realizada usando o algoritmo de *neighbor-joining* (NJ), como implementado no programa PAUP, com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1000 replicatas.

5. Resultados e Discussão

Das centenas de isolados de ambientes e amostras de fábricas de suco de laranja disponíveis na Coleção de Culturas Tropical, foram selecionadas 30 linhagens de ATSB (Tabela 3) representativas de 3 indústrias citrícolas (Norte, Centro e Sul) e 6 laranjais do Estado de São Paulo (FP e SJ, no Norte; F, no Centro, e FB, FBo e NSC, no Sul), incluindo isolados de diferentes pontos do processamento da fruta e do suco de diferentes fábricas e regiões. Elas foram designadas com códigos da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) para fins da condução do presente estudo.

5.1. Ensaios de proliferação/deterioração de suco reconstituído de laranja

Ensaios de proliferação/deterioração de suco de laranja reconstituído foram realizadas após o tempo de incubação de 24 h em temperatura favorável à proliferação dos isolados inoculados nas amostras (45 °C). Alíquotas de suco foram diluídas e plaqueadas, visando determinar a proliferação do inóculo inicial aplicado à amostra de suco reconstituído. O crescimento em superfície das placas foi quantificado para tal propósito (Figura 4).

Os ensaios de deterioração foram conduzidos nas condições de tempo e temperatura citadas, pois indicações de PINHATI *et al.* (1997) sugerem que aliciclobacilos isolados de suco de laranja apresentam crescimento rápido, sendo capazes de completar o ciclo de propagação vegetativa e esporulação em 24 a 48 h. Ainda, o ensaio de deterioração relatado simulou uma situação real de fabricação, onde embalagens de sucos reconstituídos são acondicionadas em pallets logo após pasteurização e envase, podendo permanecer por períodos longos sob

temperaturas elevadas, adequadas à proliferação de aliciclobacilos. Condições semelhantes a estas foram verificadas nos episódios de contaminação de sucos reconstituídos de laranja ocorridos no verão de 1994-95 na Europa (EGUCHI *et al.*, 2001a).

Das 30 amostras de aliciclobacilos analisadas, 21 (70%) foram capazes de proliferar no suco de laranja reconstituído após 24 ou 48 h de incubação a 45 °C (Tabela 6). Destas, apenas 10 (47,61%) produziram odor característico de biodeterioração, conforme indicado na Tabela 6. Dentre essas amostras, CBMAI 0272 (isolado de polpa finisher, região Sul) apresentou crescimento superior a 10^3 UFC/mL com produção de odor. As linhagens CBMAI 0283 (isolado de suco concentrado, região Sul), CBMAI 0293 (isolado de água taste, região Sul) e CBMAI 0294 (isolado de suco concentrado, região Sul) cresceram por volta de 10^2 UFC/mL e apresentaram odor de bioterioração. Entretanto, as linhagens CBMAI 0267 (isolado de suco concentrado, região Norte); CBMAI 0271 (isolado de suco concentrado, região Sul); CBMAI 0275 (isolado de polpa finisher, região Sul); CBMAI 0292 (isolado de suco concentrado, região Sul) e CBMAI 0295 (isolado do suco concentrado região Norte), não apresentaram odor, apesar de proliferarem no suco reconstituído em nível populacional de 10^2 UFC/mL.

As linhagens CBMAI 0270 e CBMAI 0290 (isolado de suco concentrado, região Sul), CBMAI 0279 e CBMAI 0281 (isolado de suco concentrado, região Centro), cresceram na ordem de 10 UFC/mL e foram capazes de produzir odor no suco. Contudo, as linhagens CBMAI 0268 (isolado de suco concentrado, região Norte), CBMAI 0273 (isolado de polpa finisher, região Sul), CBMAI 0274 (suco fresco, entrada do evaporador, região Sul), CBMAI 0291 (suco concentrado, região Sul) e CBMAI 0296 (suco concentrado região Norte), com o mesmo nível de crescimento, não apresentaram biodeterioração.

EGUCHI *et al.* (2000), ao analisarem 13 *Alicyclobacillus* spp. isolados de indústrias de suco de laranja concentrado, verificaram que apenas 2 isolados (16%) dentre os testados provocaram forte deterioração no suco com produção de *off-flavour*. Os dados obtidos no presente estudo corroboram, de certo modo, os achados destes autores, indicando que uma parcela dos isolados de ATSB originários de sucos de laranja são reconhecidamente deteriogênicos do suco reconstituído.

Os experimentos de ARDRA e análise filogenética realizados caracterizaram as linhagens CBMAI 0270, CBMAI 0272, CBMAI 0281, CBMAI 0283, CBMAI 0284 e CBMAI 0287 como *A. acidoterrestris*, a linhagem CBMAI 0279 como *A. pomorum-like*, CBMAI 0293 como *A. acidocaldarius*, e CBMAI 0290 e CBMAI 0294 como *A. acidocaldarius-like*, respectivamente. Foi, portanto, claramente demonstrado que todos os grupos de *Alicyclobacillus* spp. verificados neste estudo foram capazes de crescer e deteriorar o suco reconstituído, sendo estas propriedades evidenciadas, pela primeira vez, para *A. pomorum* e *A. acidocaldarius* em suco de laranja reconstituído.

Das 7 linhagens-tipo testadas, somente 4 (57,14%) cresceram no suco e produziram odor característico de biodeterioração, com crescimento na ordem de 10 UFC/mL (Tabela 6), a saber: *A. acidiphilus* DSM 14558^T, *A. acidoterrestris* DSM 3922^T, *A. herbarius* DSM 13609^T e *A. hesperidum* DSM 12489^T, sendo que *A. acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* DSM 446^T, *A. acidocaldarius* subsp. *rittmanni* DSM 11297^T e *A. cycloheptanicus* DSM 4006^T não apresentaram crescimento no suco reconstituído. Assim como para os isolados anteriormente citados, este constitui-se no primeiro relato da capacidade deteriogênica de suco de laranja reconstituído pelas espécies *A. herbarius* e *A. hesperidum*.

Tabela 6. Resultados dos ensaios de deterioração de suco de laranja reconstituído inoculado com aliciclobacilos.

Linhagens (inóculo inicial = 10 UFC/mL)	Crescimento no suco (UFC/mL)				Odor
	<10	10	100	1000	
CBMAI 0272					+
CBMAI 0283					+
CBMAI 0284					+
CBMAI 0287					+
CBMAI 0293					+
CBMAI 0294					+
CBMAI 0267					
CBMAI 0271					
CBMAI 0275					
CBMAI 0292					
CBMAI 0295					
CBMAI 0270					+
CBMAI 0279					+
CBMAI 0281					+
CBMAI 0290					+
<i>A. acidiphilus</i> DSM 14558 ^T					+
<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922 ^T					+
<i>A. herbarius</i> DSM 13609 ^T					+
<i>A. hesperidum</i> DSM 12489 ^T					+
CBMAI 0268					
CBMAI 0273					
CBMAI 0274					
CBMAI 0277					
CBMAI 0291					
CBMAI 0296					
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i> DSM 446 ^T					
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmanni</i> DSM 11297 ^T					
<i>A. cycloheptanicus</i> DSM 4006 ^T					
CBMAI 0269					
CBMAI 0276					
CBMAI 0278					
CBMAI 0280					
CBMAI 0282					
CBMAI 0285					
CBMAI 0286					
CBMAI 0288					
CBMAI 0289					

As linhagens CBMAI 0269 (isolado suco concentrado região Sul), CBMAI 0276 (isolado de polpa finisher região Sul), CBMAI 0278 (suco concentrado região Centro), CBMAI 0280 (suco concentrado, região Centro), CBMAI 0282 (suco concentrado, região Centro), CBMAI 0285 (suco concentrado, região Sul), CBMAI 0286 (suco concentrado, região Centro), CBMAI 0288 (suco fresco entrada do evaporador, região Sul) e CBMAI 0289 (suco concentrado, região Sul) não apresentaram crescimento no suco reconstituído e não produziram odor característico de deterioração.

Os dados obtidos corroboram as evidências de literatura de que nem todos os isolados de *Alicyclobacillus* recuperados de amostras de suco ou de ambiente de indústria são capazes de crescer no suco reconstituído ou produzir deterioração (EGUCHI *et al.*, 2001c).

As informações neste estudo demonstraram que a presença de *Alicyclobacillus* no suco, em contagem por volta de 10^2 , não está necessariamente correlacionada à deterioração. Existe a hipótese disseminada na literatura especializada de que a deterioração de sucos causada por *Alicyclobacillus* seja um fato incidental, requerendo uma combinação de condições adequadas, como pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio, que favoreçam o seu crescimento e o desenvolvimento de alterações nos sucos (PETTIPHER *et al.*, 1997).

5.2. Caracterização fenotípica de aliciclobacilos no sistema API 50CH

Os resultados da caracterização do perfil de utilização de fontes de carbono das linhagens-tipo e dos isolados de ATSB selecionados para a realização dos experimentos estão apresentados na Tabela 7.

De acordo com a caracterização fenotípica, todas as linhagens estudadas utilizaram como fonte de carbono a glicose, L-arabinose, e galactose, e foram também capazes de hidrolisar a esculina. Os isolados e as linhagens-tipo foram capazes de assimilar e realizar a viragem do pH quando da utilização do carboidrato 5-ceto-gluconato, exceto para as linhagens CBMAI 0271 e CBMAI 0272.

A assimilação da ribose foi realizada pelas linhagens-tipo de *A. cycloheptanicus* (DSM 4006^T, =CBMAI 0297^T), *A. acidoterrestris* (DSM 3922^T, =CBMAI 0244^T), *A. acidiphilus* (DSM 14558^T, =CBMAI 0247^T), e *A. hesperidum* (DSM 12489^T, =CBMAI 0246^T), mas não ocorreu para as linhagens-tipo de *A. acidocaldarius* (DSM 446^T, =CBMAI 0298^T), *A. herbarius* (DSM 13609^T, =CBMAI 0299^T) e *A. acidocaldarius* subsp. *rittmanni* (DSM 11297^T, =CBMAI 0245^T).

Da mesma forma, a grande maioria dos isolados de ATSB assimilaram ribose, exceto as linhagens CBMAI 0293 e CBMAI 0294. O comportamento fenotípico desses isolados foi similar ao da espécie *A. acidocaldarius*. Na análise filogenética de seqüências de DNAr 16S, o isolado CBMAI 0293 foi agrupado no *cluster* 2 (*A. acidocaldarius*), junto com a linhagem-tipo da espécie e *A. acidocaldarius* subsp. *rittmanni* DSM 11297^T, e o isolado CBMAI 0294 no *cluster* 3 (*A. acidocaldarius*-like), junto a CBMAI 0290 e CBMAI 0295. Contudo, estas duas últimas linhagens assimilaram ribose no ensaio API 50CH. Estes resultados são coerentes com a descrição do perfil de utilização de ribose por *A. acidocaldarius*, relatado como variável (CHANG & KANG, 2004). As

linhagens CBMAI 0293 e CBMAI 0294 possuem a mesma origem, tendo sido isoladas de uma mesma propriedade na região Sul, sendo a CBMAI 0293 isolada de água taste, e a CBMAI 0294 isolada de suco concentrado.

As linhagens CBMAI 0278, CBMAI 0279, CBMAI 0282 e CBMAI 0288 foram capazes de assimilar as fontes de carbono glicerol (exceto CBMAI 0282), esculina, L-arabinose, ribose, D-xilose, D-glicose, D-frutose (exceto CBMAI 0288), D-manose (exceto CBMAI 0288) e L-sorbose (exceto CBMAI 0278 e CBMAI 0282), manitol (exceto CBMAI 0278), arbutina (exceto CBMAI 0278 e CBMAI 0282), D-turanose (exceto CBMAI 0288) e sacarose (exceto CBMAI 0279).

A comparação das propriedades metabólicas e fisiológicas deve ser avaliada com cautela, levando-se em consideração que, em muitos casos, as características fenotípicas de uma única espécie podem ser heterogêneas (DEINHARD, 1987). Além disso, a metodologia de caracterização de fontes de carbono através do sistema API 50CH requer cuidados para evitar a desidratação dos poços de ensaio, principalmente na caracterização de organismos termofílicos a 50 °C. Algumas vezes, a viragem de cor do indicador azul de bromofenol pode não ser nítida, dificultando a interpretação do teste. A Figura 5 ilustra a aplicação do sistema API 50CH na caracterização de aliciclobacilos, com a diferenciação dos resultados de utilização de diferentes fontes de carbono (assimilação), representado pela turvação do meio no poço de ensaio, com exemplos de alteração e não-alteração do pH do meio (viragem).

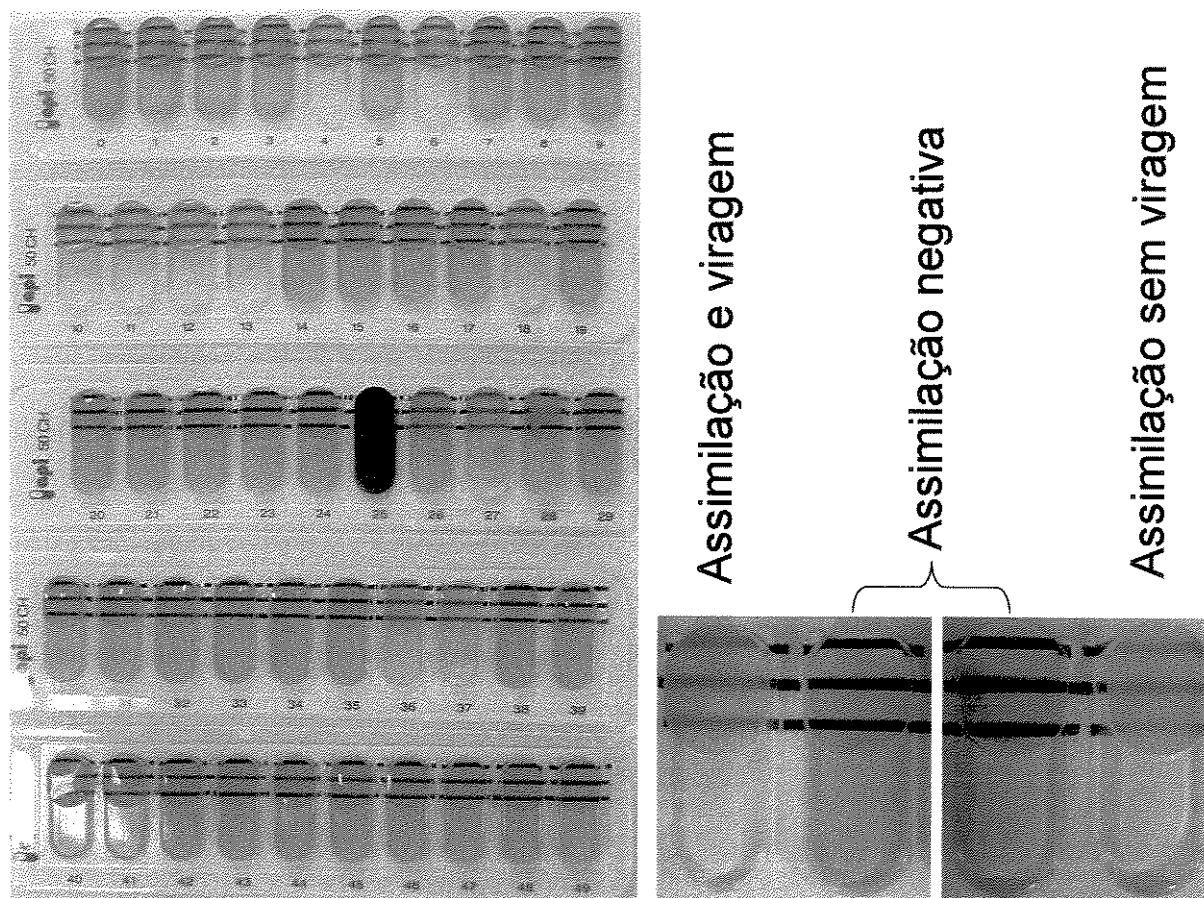


Figura 5. Perfil de utilização de carboidratos de *Alicyclobacillus acidocaldarius* DSM 446^T no sistema API 50 CH (meio BAT sem glicose, pH 4,0, acrescido de azul de bromofenol 20 µg/mL; incubação a 50° C por 48 h).

Tabela 7. Continuação.

[illegible]

5.3. Caracterização molecular usando o método ARDRA

Os genes que codificam para o RNA ribossomal (RNAr) 16S e 23S têm sido utilizados para análises filogenéticas de microrganismos. Muitas vezes, a simples comparação dos fragmentos de ácidos nucleicos amplificados por PCR a partir desses genes ou do operon rRNA completo de numerosos grupos taxonômicos já se constitui em um método eficaz para identificação do gênero ou espécie de bactérias. Ainda, o produto amplificado do gene ribossomal pode ser submetido à digestão com enzimas de restrição, resultando num padrão de fragmentos que é usado como *fingerprinting* para identificação de genoma bacteriano. Este método é denominado ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) e baseia-se no princípio de que os sítios de restrição do operon RNA ribossomal estão conservados de acordo com as relações filogenéticas (GÜRTLER & STANISICH, 1996; VANEECHOUTTE *et al.*, 1992; MASSOL-DEYA *et al.*, 1995).

A caracterização genotípica dos isolados de *Alicyclobacillus* utilizando a técnica de ARDRA da região espaçadora DNAr 16S-23S representa resultados inéditos na literatura, pois não foram encontrados registros de pesquisas utilizando este método para o grupo dos aliciclobacilos.

A análise dos padrões de bandas obtidos pelo uso das enzimas *Hae* III, *Hha* I e *Msp* I, como exemplificado na Figura 6, resultou em 11 perfis de restrição diferentes dentre os isolados e linhagens-tipo das espécies válidas de *Alicyclobacillus*. Uma compilação dos padrões é listada na Tabela 8.

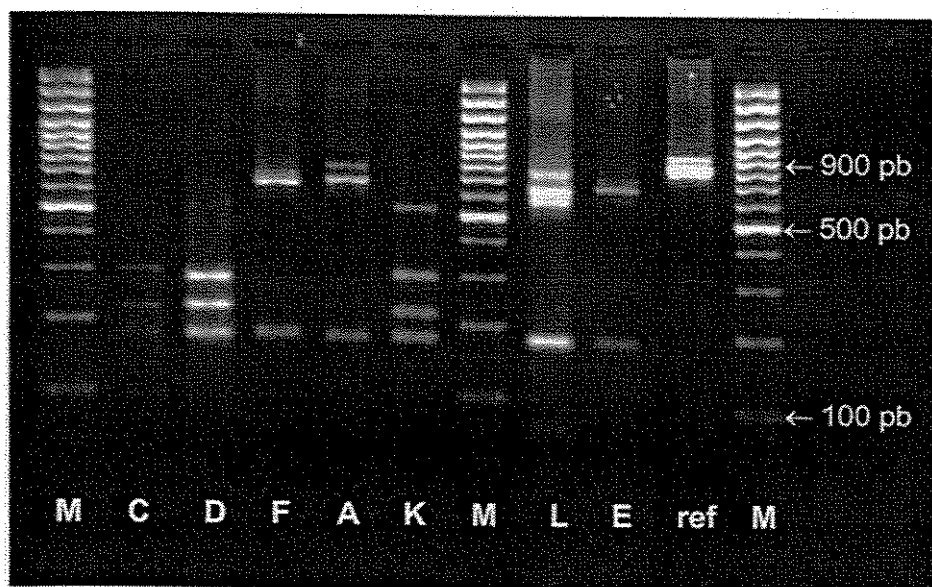


Figura 6. Padrões de ARDRA de fragmentos de região espaçadora rDNA 16S-23S de linhagens de *Alicyclobacillus* obtidos com *Hae* III (ref = fragmento não digerido; M= marcador de peso molecular de 100 pb, A = CBMAI 0291; C = CBMAI 0293; D = CBMAI 0288; E = CBMAI 0279; F = CBMAI 0290; K = CBMAI 0247; L = CBMAI 0246).

Tabela 8. Perfis de ARDRA obtidos para as linhagens de *Alicyclobacillus* spp. estudadas.

Linhagem representativa do padrão	Origem	Hha I	Msp I	HaeIII	Padrão ARDRA
CBMAI 0244	<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922 ^T	1	1	1	A
CBMAI 0267	Suco conc. após pasteurização, FP-Norte	1	1	1	A
CBMAI 0269	suco conc. antes das adições, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0277	Suco fresco entr. evaporador, FB-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0281	Suco conc. após pasteurização, F-Centro	1	1	1	A
CBMAI 0283	suco conc. após as adições, FBo-Sul	1	1	1	A
CBMAI 0291	Suco conc. antes das adições, NSC-sul	1	1	1	A
CBMAI 0296	Suco conc. antes das adições, SJ-Norte	1	1	1	A
CBMAI 0294	Suco concentrado, NSC-Sul	1	4	4	B
CBMAI 0293	Água taste para correção do Brix, NSC-Sul	2	5	5	C
CBMAI 0298	<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i> DSM 446 ^T	2	5	5	C
CBMAI 0278	Suco conc. após pasteurização, F-Centro	3	2	1	D
CBMAI 0288	Suco fresco entr. do evapor., NSC-Sul	3	2	1	D
CBMAI 0279	Suco conc. após pasteurização, F-Centro	3	2	2	E
CBMAI 0282	suco conc. antes das adições, F-Centro	3	2	2	E
CBMAI 0290	Suco conc. após pasteurização, NSC-Sul	1	4	7	F
CBMAI 0295	Suco concentrado, SJ-Norte	1	4	7	F
CBMAI 0245	<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmanni</i> DSM 11297 ^T	2	7	7	I
CBMAI 0297	<i>A. cycloheptanicus</i> DSM 4006 ^T	5	8	1	J
CBMAI 0247	<i>A. acidiphilus</i> DSM 14558 ^T	6	9	9	K
CBMAI 0246	<i>A. hesperidum</i> DSM 12489 ^T	7	10	10	L
CBMAI 0299	<i>A. herbarius</i> DSM 13609 ^T	8	2	11	M

Os perfis de ARDRA mostraram-se distintos entre as diferentes espécies-tipo de *Alicyclobacillus* usadas neste trabalho, assim como entre as subespécies de *A. acidocaldarius* analisadas, confirmando o poder de resolução da técnica em nível infra-específico para este grupo de bactérias (Tabela 8).

Dentre os isolados ambientais analisados, apenas dois padrões de ARDRA, ou ribotipos, obtidos foram semelhantes ao perfil das linhagens-tipo analisadas, sendo estes o ribotipo **A**, característico de *A. acidoterrestris*, e o ribotipo **C**, característico de *A. acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* (Tabela 8). O ribotipo **A** foi o mais predominante, tendo sido verificado para 22 dos 30 isolados analisados. O ribotipo **C** foi verificado apenas para 1 dos isolados, a linhagem CBMAI 0293.

Os outros ribotipos obtidos para os isolados ambientais mostraram-se distintos dos ribotipos das linhagens-tipo de *Alicyclobacillus*. Para elucidar a hipótese destes ribotipos representarem uma variabilidade genética em nível infra-específico ou inter-específico, isolados representativos de cada padrão foram selecionados para ensaios complementares de caracterização molecular, utilizando a metodologia de seqüenciamento de DNAr 16S. Estes dados serão apresentados nas seções posteriores.

5.4. Caracterização do padrão de ácidos graxos celulares

A caracterização quimiotaxonômica das 30 linhagens isoladas e das 7 linhagens-tipo estudadas foi realizada através da determinação dos seus perfis qualitativos de ácidos graxos metil-esterificados (FAMES).

Os principais ácidos graxos detectados nas análises cromatográficas das linhagens estudadas foram: ω -11-ciclohexil-undecanóico (C17:0), ω -13-ciclohexil-tridecanóico (C19:0), ω -14-metil-hexadecanóico (*anteiso*-C17:0), 15-metil hexadecanóico (*iso*-C17:0), ω -cicloheptil (C18:0), hexadecanóico (C18:0) e metil-tetradecanoato (C18:0). Os resultados da caracterização dos perfis de ácidos graxos celulares das linhagens analisadas encontram-se na Tabela 9.

Os estudos da análise cromatográfica de FAMES confirmaram a identificação das linhagens isoladas de sucos de laranja em ambiente de fábrica como pertencentes ao gênero *Alicyclobacillus*.

Um aspecto interessante a ser destacado se refere à detecção de ácidos graxos ω -alícíclico em linhagens de *A. pomorum*. Embora GOTO *et al.* (2003) descreveram que espécie *A. pomorum* não possui o ácido graxo ω -alícíclico no perfil de composição de membrana celular, uma característica comum para todas as espécies do gênero *Alicyclobacillus*, nossos estudos mostraram a presença desse ácido graxo nas amostras identificadas como *A. pomorum* nas análises polifásicas, a saber: CBMAI 0278 (26,3 de *iso*-C17:0 e 63,7 de *anteiso*-C17:0), CBMAI 0279 (3,6 de *anteiso*-C17:0, 71,3 de ω -ciclohexil-C17:0 e 25,1 de ω -ciclohexil-C19:0), CBMAI 0282 (23,33 de *iso*-C17:0 e 55,2 de *anteiso*-C17:0) e CBMAI 0288 (22,3 de *iso*-C17:0 e 59,9 de *anteiso*-C17:0). A visualização do perfil cromatográfico denota com clareza a presença de ω -18:1 7c (Figura 7), confirmado pela realização de estudos de espectrometria de massas (dados não apresentados).

As linhagens acima citadas, possuem origem CBMAI 0278, CBMAI 0279 e CBMAI 0282 são isolados de suco concentrado, região Centro, enquanto que a linhagem CBMAI 0288 foi isolada do suco fresco, entrada do evaporador, região Sul.

As demais linhagens isoladas e as linhagens-tipo estudadas revelaram o perfil de ácidos graxos semelhantes ao da literatura. CHANG & KANG (2004) relataram que a característica dos *Alicyclobacillus* spp. é a presença do principal componente de membrana o ácido graxo ω -alicíclico. As membranas do *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. hesperidum* e *A. acidiphilus* são principalmente compostas por ω -ciclohexil, enquanto que os ácidos graxos ω -heptil são a principal composição das membranas do *A. cycloheptanicus* e *A. herbarius*.

De acordo com DEINHARD & PORALLA (1996), os ácidos graxos cíclicos são marcadores quimiotaxonômicos importantes para a identificação de espécies de aliciclobacilos. Entretanto, sua ocorrência não deve ser considerada isoladamente, mas como uma característica dentre um conjunto de dados morfológicos e fisiológicos, complementando, deste modo, a identificação das linhagens.

Tabela 9. Padrões de ácidos graxos de membrana de diferentes isolados de *Alicyclobacillus* sp. analisados neste estudo.

Amostras	C _{14:0}	C _{16:0}	Iso-C _{15:0}	Iso-C _{16:0}	Iso-C _{17:0}	Iso-C _{18:0}	Anteiso-C _{15:0}	Anteiso-C _{17:0}	ω -ciclohexil C _{17:0}	ω -ciclohexil C _{19:0}	ω -cicloheptil C _{18:0}	ω -cicloheptil C _{18:0} (2 OH)	ω -cicloheptil C _{20:0}
CBMAI 0267					1,6			4,9	57,4	36,1			
CBMAI 0268					1,7			4,9	59,4	34,0			
CBMAI 0269					0,7			2,9	70,2	26,2			
CBMAI 0270					4,2			9,3	64,3	22,2			
CBMAI 0271					3,0			8,5	61,2	27,3			
CBMAI 0272					2,0			5,3	65,0	27,7			
CBMAI 0273					3,2			7,3	64,8	24,7			
CBMAI 0274					2,2			5,2	69,0	23,6			
CBMAI 0275					2,6			6,8	56,1	34,5			
CBMAI 0276								3,5	66,7	29,8			
CBMAI 0277								1,8	80,5	17,7			
CBMAI 0278					26,3			63,7					
CBMAI 0279								3,6	71,3	25,1			
CBMAI 0280					1,1			2,9	65,1	30,8			
CBMAI 0281					1,7			4,7	70,6	23,0			
CBMAI 0282					23,3			55,2					
CBMAI 0283	9,1	24,8							7,0	2,8			
CBMAI 0284								2,7	74,7	22,6			
CBMAI 0285									69,8	30,2			
CBMAI 0286								1,9	74,4	23,7			
CBMAI 0287								0,7	78,6	20,7			
CBMAI 0288					22,3			59,9					
CBMAI 0289								5,1	71,5	23,4			
CBMAI 0290									45,7	54,3			
CBMAI 0291									68,8	31,2			
CBMAI 0292									66,9	33,1			
CBMAI 0293									55,3	44,7			
CBMAI 0294									50,7	49,3			
CBMAI 0295					1,5			3,0	56,0	39,5			
CBMAI 0296									70,7	29,3			
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmanni</i> DSM 11297 ^T									70,1				
<i>A. cycloheptanicus</i> DSM 4006 ^T											100		
<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922 ^T									67,1	32,9			
<i>A. acidiphilus</i> DSM 14558 ^T									100				
<i>A. hesperidum</i> DSM 12489 ^T								16,1	76,4	7,5			
<i>A. acidocaldarius</i> DSM 446 ^T									77,8	22,2			
<i>A. herbarius</i> DSM 13609 ^T											92,9		6,1

CBMAI 0288: analitos não-identificados com t_R = 16,64 min. (3,5%), analito com t_R = 16,82 min. (2,1%) e analito com t_R = 18,75 min. (15,8%). CBMAI 0282: analitos não-identificados com t_R = 18,75 min. (17,8%). CBMAI 0278: analitos não-identificados com t_R = 20,93 min. (8,2%) e analito com t_R = 26,12 min. (1,8%). DSM 11297^T: analitos não-identificados com t_R = 18,78 min. (29,9%).

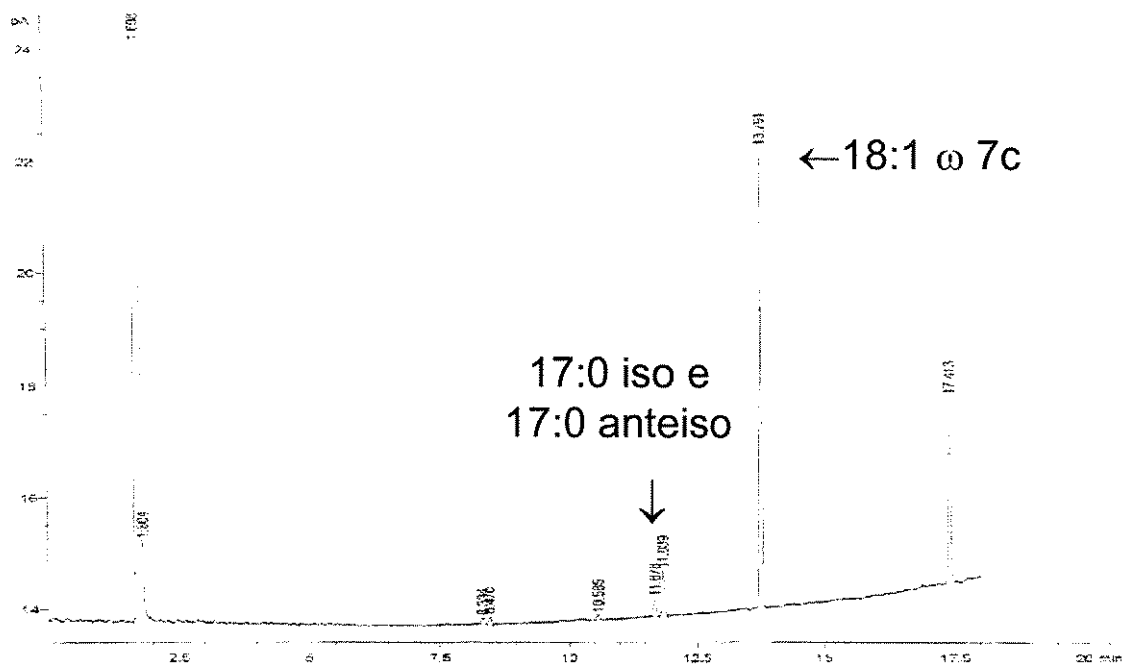


Figura 7. Perfil de ácidos graxos de *Alicyclobacillus pomorum* CBMAI 0279, com identificação do pico de ácido graxo ω -18:1 7c.

5.5. Análise filogenética de seqüências de DNAr 16S

As seqüências de DNAr 16S foram submetidas ao seqüenciamento direto em seqüenciador automático, após amplificação por PCR e purificação. Dos 30 isolados utilizados neste estudo, 15 foram selecionados para as análises de DNAr 16S. Os isolados selecionados incluem representantes de grupos de restrição (ribotipos) distintos assim como linhagens com perfis de restrição repetidos, com o intuito de confirmar a consistência dos resultados encontrados através do seqüenciamento.

Cerca de 1000 a 1300 pb de seqüência foram obtidos para os isolados analisados (Anexo I), cujas afiliações filogenéticas são apresentadas na Figura 8. Os isolados CBMAI 0267, CBMAI 0269, CBMAI 0277, CBMAI 0281, CBMAI 0283, CBMAI 0291 e CBMAI 0296 mostraram alta similaridade (99%) com linhagens de *A. acidoterrestris* contidas nas bases de dados. A análise filogenética confirmou a relação de proximidade entre estes isolados e linhagens pertencentes à espécie de *A. acidoterrestris*, incluindo a linhagem tipo da espécie, sendo estas relações suportadas por altos valores de *bootstrap* (Figura 8). Todos estes isolados apresentaram padrão de restrição (ribotipo) **A** (Tabela 8).

O isolado CBMAI 0293 apresentou 98% de similaridade com as linhagens tipo das subespécies de *A. acidocaldarius*, a saber, *A. acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* e *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*. A análise filogenética suporta esta relação, sugerindo que este isolado pertence à espécie *A. acidocaldarius*. Nos experimentos de ARDRA, este isolado apresentou o ribotipo **C**, o mesmo apresentado pela linhagem tipo de *A. acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* (Tabela 8).

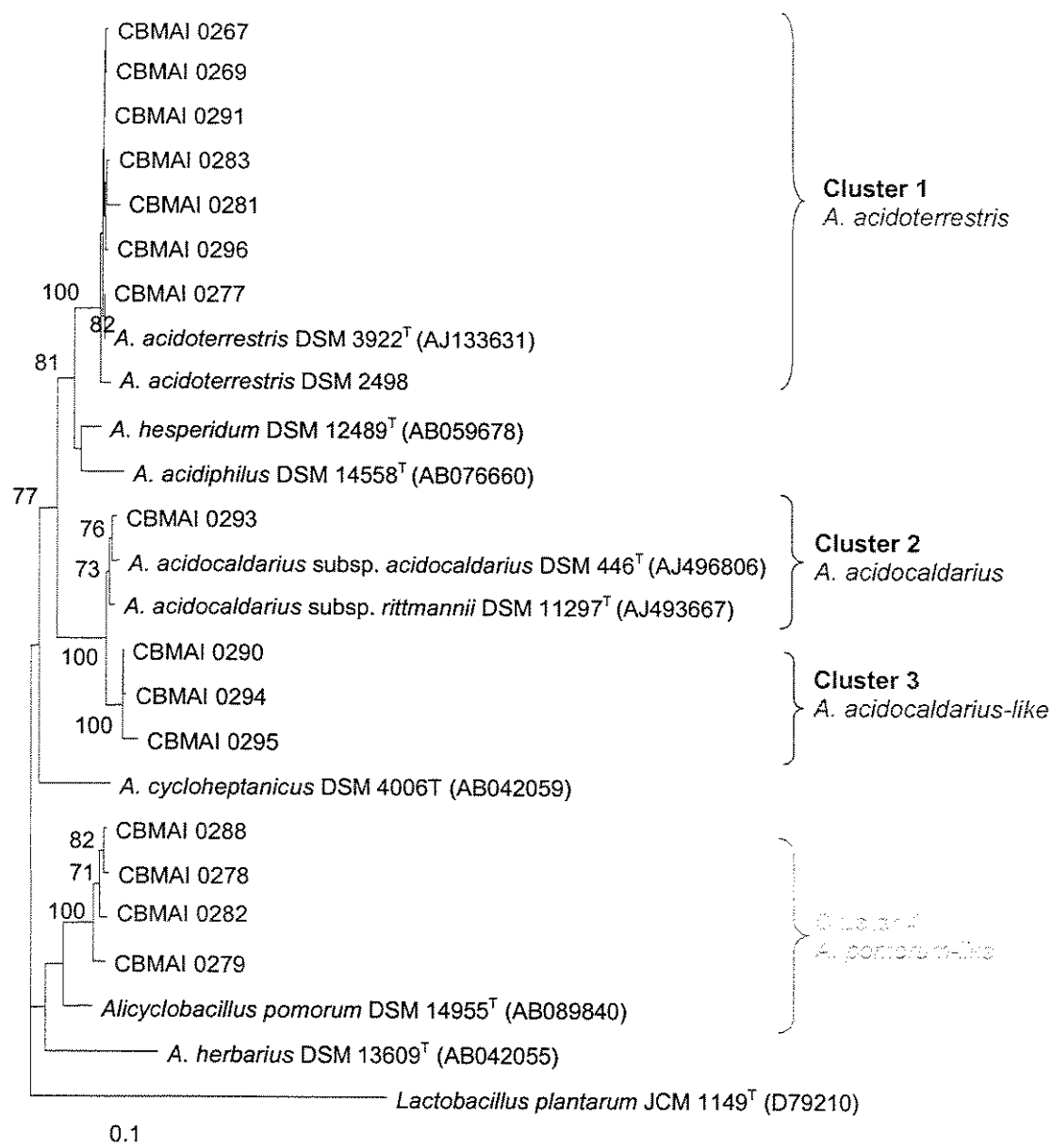


Figura 8. Análise filogenética de seqüências de DNAr 16S de *Alicyclobacillus* isolados de sucos e de ambiente fabril de FCOJ.

Os isolados CBMAI 0290, CBMAI 0294 e CBMAI 0295, embora tenham apresentado também altos níveis de similaridade com as subespécies de *A. acidocaldarius* (98 a 99%), na análise filogenética aparecem como um agrupamento distinto, relacionado a *A. acidocaldarius* e denominado de *A. acidocaldarius-like*. Um alto valor de *bootstrap* suporta esta relação (100%) e sugere que estes isolados possam representar uma espécie nova de *Alicyclobacillus*, sendo *A. acidocaldarius* a espécie válida mais próxima. Estes isolados apresentaram ribotipos **F** (CBMAI 0290 e 0295) e **B** (CBMAI 0294), similares entre si (diferem apenas com uma das enzimas utilizadas) e distintos dos ribotipos apresentados pelas subespécies de *A. acidocaldarius* (Tabela 8). Vale ressaltar que um trabalho realizado por GOTO *et al.* (2002a), o qual analisou um grupo de 24 linhagens de *Alicyclobacillus* originadas de diferentes coleções de culturas, propôs a existência de uma espécie genômica de *Alicyclobacillus* (denominada espécie genômica 1), relacionada a *A. acidocaldarius* e representada por sete das linhagens empregadas no estudo. Os resultados encontrados através da análise filogenética das seqüências de DNAr 16S das linhagens foram confirmados por experimentos de hibridização DNA-DNA conduzidos pelos autores, os quais revelaram níveis de hibridização entre 51 e 61% entre uma linhagem pertencente à espécie genômica 1 e linhagens de *A. acidocaldarius*, incluindo a linhagem tipo desta espécie. Análises de alinhamento e reconstrução filogenética envolvendo as seqüências de DNAr 16S das sete linhagens pertencentes à espécie genômica 1 de *Alicyclobacillus* (GOTO *et al.*, 2002a) e as linhagens de *Alicyclobacillus* empregadas no presente estudo, revelaram um *cluster* coeso (99% de valor de *bootstrap*) entre as linhagens da espécie genômica 1 e as 3 linhagens denominadas neste estudo de *A. acidocaldarius-like* (Figura 8, Cluster 3), sendo que a próxima relação com o Cluster 2, representado pelas linhagens tipo das subespécies de

A. acidocaldarius, se manteve com um valor de *bootstrap* de 100% (dados não mostrados). Estes resultados dão embasamento à hipótese de que o Cluster 3 (*A. acidocaldarius*-like) verificado neste estudo representa uma nova espécie de *Alicyclobacillus*.

Os isolados CBMAI 0278, 0279, 0282 e 0288 apresentaram 96% de similaridade com seqüências de *A. pomorum* contidas nas bases de dados consultadas e níveis de similaridade mais baixos com *A. hesperidum* e *A. acidoterrestris*. A análise filogenética mostra claramente que estes isolados formam um *cluster* (ou agrupamento) bem definido com valores de *bootstrap* de 71 e 82% suportando as relações entre eles e de 100% com a linhagem tipo de *A. pomorum*. Este agrupamento foi denominado de *A. pomorum*-like e sugere que estes isolados constituem uma nova espécie de *Alicyclobacillus*, sendo *A. pomorum* a espécie válida mais próxima. Os isolados CBMAI 0278, 0279, 0282 e 0288 apresentaram ribotipos **D** (CBMAI 0278 e 0288) e **E** (CBMAI 0279 e 0282) (Tabela 8). Estes ribotipos se mostraram distintos do ribotipo de *A. acidoterrestris* (**A**) e do ribotipo de *A. hesperidum* (**L**). Entretanto, não foi possível comparar os perfis de restrição destes isolados com o da linhagem tipo de *A. pomorum*, pois a mesma ainda não estava disponível para comercialização na época em que estes experimentos foram conduzidos.

Os resultados combinados de ARDRA e análise filogenética baseada no seqüenciamento do DNAr 16S mostraram que os isolados puderam ser identificados com sucesso, sendo alguns deles representantes potenciais de espécies novas de *Alicyclobacillus*. Os resultados de ARDRA da região espaçadora DNAr 16S-23S dos isolados, assim como das linhagens-tipo utilizadas, foram consistentes com a identificação. Ainda, a técnica de ARDRA mostrou ter resolução em nível infra-específico, uma vez que foi capaz de discriminar as subespécies de *A. acidocaldarius*.

Estes resultados estão de acordo com a literatura, segundo a qual a região espaçadora DNAr 16S-23S apresenta maior variabilidade quando comparada ao DNAr 16S e portanto maior poder de discriminação entre espécies muito próximas, ou mesmo entre linhagens de uma mesma espécie (BARRY *et al.*, 1991; JENSEN *et al.*, 1993).

5.6. Identificação polifásica e considerações sobre a diversidade de aliciclobacilos isolados de amostras de fábricas de suco laranja

A análise combinada dos resultados de ARDRA, caracterização do perfil de ácidos graxos e seqüenciamento de rDNA 16S permitiu a alocação dos isolados em grupos taxonômicos polifásicos. A compilação dos resultados (Tabela 10) pode ser considerada como a "identificação polifásica" dos isolados.

Os resultados obtidos com a utilização do sistema de fermentação de carboidratos (API 50CH) não foram conclusivos e, portanto, não forneceram informação que pudesse ser utilizada na identificação polifásica dos isolados de *Alicyclobacillus*. Estes resultados corroboram dados encontrados na literatura (DEINHARD, 1987).

Particularmente, os perfis de ARDRA constituíram um conjunto de dados altamente informativo, permitindo a discriminação dos isolados em *A. acidoterrestris* (**A**), *A. acidocaldarius-like* (**B** e **F**), *A. acidocaldarius* (**C**), *A. pomorum-like* (**D** e **E**). Esses perfis apresentaram uma correspondência direta com o resultado do seqüenciamento de caracterização das linhagens.

Os principais ácidos graxos presentes nas linhagens isoladas foram ω -ciclohexil-C17:0 e ω -ciclohexil-C19:0, que se apresentaram como bons marcadores quimiotaxonômicos para o gênero *Alicyclobacillus*, mais especificamente para os grupos *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. acidocaldarius-like* e *A. pomorum-like* (CBMAI 0279). As linhagens denominadas *A. pomorum-like* (CBMAI 0278, CBMAI 0282 e CBMAI 0288) apresentaram uma composição de ácidos graxos *iso*-17:0, *anteiso*-C17:0.

As linhagens isoladas das diferentes fábricas e regiões do Estado de São Paulo, apresentaram uma diversidade onde na região Norte obteve-se *A. acidoterrestris* (CBMAI 0267, CBMAI 0268, CBMAI 0287 e CBMAI 0296) e *A. acidocaldarius-like* (CBMAI 0295), na região Centro obteve-se *A. acidoterrestris* (CBMAI 0280, CBMAI 0281 e CBMAI 0286) e *A. pomorum-like* (CBMAI 0278, CBMAI 0279 e CBMAI 0282) e na região Sul *A. acidoterrestris* (CBMAI 0269, CBMAI 0270, CBMAI 0271, CBMAI 0272, CBMAI 0273, CBMAI 0274, CBMAI 0275, CBMAI 0276, CBMAI 0277, CBMAI 0283, CBMAI 0284, CBMAI 0285, CBMAI 0289, CBMAI 0291 e CBMAI 0292), *A. pomorum-like* (CBMAI 0288), *A. acidocaldarius-like* (CBMAI 0290 e CBMAI 0294) e *A. acidocaldarius* (CBMAI 0293).

Os resultados obtidos permitem concluir que a diversidade de ATSB em fábricas brasileiras é rica, sendo que novos grupos, representantes potenciais de novas espécies de aliciclobacilos, foram evidenciados nas análises filogenéticas de seqüências de DNAr 16S. Estes novos grupos foram relacionados a *A. acidocaldarius* (CBMAI 0290, CBMAI 0294 e CBMAI 0295) e *A. pomorum* (CBMAI 0278, CBMAI 0279, CBMAI 0282 e CBMAI 0288). Os resultados sugerem haver uma distribuição cosmopolita dos *Alicyclobacillus* nas regiões analisadas, sendo a espécie *A. acidoterrestris* de ocorrência mais comum nas regiões, e também a mais abundante (cerca de 73% dos isolados).

Tabela 10. Identificação polifásica de aliciclobacilos isolados de amostras de fábricas de suco laranja.

Amostras	ARDRA	Perfil de ácidos graxos (majoritários)	Seqüenciamento de rDNA 16S	Identificação taxonômica polifásica
CBMAI 0267	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0268	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0269	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0270	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0271	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0272	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0273	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0274	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0275	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0276	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0277	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0278	D	<i>iso</i> -C17:0, <i>anteiso</i> -C17:0	<i>A. pomorum</i> -like	<i>A. pomorum</i> -like
CBMAI 0279	E	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. pomorum</i> -like	<i>A. pomorum</i> -like
CBMAI 0280	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0281	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0282	E	<i>iso</i> -C17:0, <i>anteiso</i> -C17:0	<i>A. pomorum</i> -like	<i>A. pomorum</i> -like
CBMAI 0283	A	C16:0, C14:0, ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0284	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0285	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0286	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0287	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0288	D	<i>iso</i> -C17:0, <i>anteiso</i> -C17:0	<i>A. pomorum</i> -like	<i>A. pomorum</i> -like
CBMAI 0289	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0290	F	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. acidocaldarius</i> -like	<i>A. acidocaldarius</i> -like
CBMAI 0291	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0292	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	n.d.	<i>A. acidoterrestris</i>
CBMAI 0293	C	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. acidocaldarius</i>	<i>A. acidocaldarius</i>
CBMAI 0294	B	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. acidocaldarius</i> -like	<i>A. acidocaldarius</i> -like
CBMAI 0295	F	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. acidocaldarius</i> -like	<i>A. acidocaldarius</i> -like
CBMAI 0296	A	ω -ciclohexil-C17:0, ω -ciclohexil-C19:0	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidoterrestris</i>

n.c. = não característico.

6. Conclusões

Das 30 amostras de aliciclobacilos isolados de fábrica que foram analisadas nos ensaios de biodeterioração (24 h a 45 °C), 21 foram capazes de se multiplicar no suco de laranja reconstituído, mas apenas 10 produziram odor desagradável de biodeterioração, em contagens na ordem de 10^1 a 10^3 UFC/mL. Destes 10 isolados, 6 foram caracterizados como *A. acidoterrestris*, 2 como *A. acidocaldarius-like*, 1 como *A. acidocaldarius* e 1 como *A. pomorum*.

Algumas linhagens-tipo de ATSB, incluindo *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus*, *A. hesperidum* e *A. herbarius*, foram capazes de proliferar e causar deterioração de suco reconstituído de laranja, nas condições de ensaio empregadas.

Os dados indicam que *A. acidoterrestris* compreende um grupo heterogêneo de isolados, com potencial deteriogênico variado. Conseqüentemente, a simples constatação da presença de isolados deste grupo de microrganismos em FCOJ pode não corresponder ao risco de deterioração do produto reconstituído.

Os resultados de API 50CH sugerem que esta metodologia não se constitui em uma ferramenta informativa e adequada para estudos taxonômicos do gênero *Alicyclobacillus*.

A análise do perfil de restrição por ARDRA mostrou-se consistente com os resultados de identificação polifásica. Seis ribotipos de ARDRA foram obtidos para os isolados, permitindo a alocação destes nas espécies *A. acidocaldarius* e *A. acidoterrestris*, e em grupos relacionados designados como *A. acidocaldarius-like* e *A. pomorum-like*.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a técnica de ARDRA representa uma excelente ferramenta taxonômica

para a identificação e/ou discriminação de isolados de *Alicyclobacillus* spp.

Os resultados obtidos permitem concluir que a diversidade de ATSB em fábricas brasileiras é rica, sendo que novos grupos, representantes potenciais de novas espécies de aliciclobacilos, foram evidenciados nas análises filogenéticas de seqüências de DNAr 16S. Estes novos grupos foram relacionados a *A. acidocaldarius* (CBMAI 0290, CBMAI 0294 e CBMAI 0295) e *A. pomorum* (CBMAI 0278, CBMAI 0279, CBMAI 0282 e CBMAI 0288), sendo que os resultados filogenéticos obtidos para os isolados relacionados a *A. acidocaldarius* foram corroborados por dados de literatura. O gênero *Alicyclobacillus* apresentou uma distribuição cosmopolita nas regiões analisadas, sendo a espécie *A. acidoterrestris* de ocorrência mais comum, e também a mais abundante.

Diferentemente de relatos de literatura, foi confirmada a presença de omega-ciclohexil-C17:0 e omega-ciclohexil-C19:0 em amostras identificadas como *A. pomorum*-like.

No presente estudo, a aplicação de métodos de caracterização polifásica permitiu a identificação inequívoca de diferentes taxa dentre os isolados originários das amostras de suco e ambientes de fábricas estudados.

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.
- ALBUQUERQUE, L.; RAINEY, F.A.; CHUNG, A.P.; SUNNA, A.; NOBRE, M.F.; GROTE R.; ANTRANIKIAN, G. & da COSTA, M.S. (2000), *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 50: 451-457.
- BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON, M.; DUNICAN, L.K. & GANNON, F. 1991. The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. **PCR Methods Applied Microbiology** 1: 51-56.
- BERKELEY, R. C. W. & ALI, N. (1994). Classification and identification of endospore-forming bacteria. **Journal of Applied Bacteriology (Symp. Supl.)** 76: 1s-8s.
- 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.
- CHANG, S. S. & KANG, D. H. (2004). *Alicyclobacillus* spp. in the Fruit Juice Industry: History, Characteristics, and Current Isolation/Detection Procedures. **Critical Reviews in Microbiology** 30:2 55-74.
- CHUN, J. (1995) **Computer-assisted classification and identification of actinomycetes.** Tese (Doutorado). University of Newcastle upon Tyne (UK).
- 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 ω -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 ω -cycloheptane fatty acids. **Systematic Applied Microbiology** 10: 68-73.
- DEINHARD, G. & PORALLA, K. (1996). Vorkommen, Biosynthese und Funktion ω -alicyclischer Fettsäuren bei Bakterien. **Biospektrum** 2:40-46.

- EGUCHI, S. Y.; PINHATTI, M. E. M.; AZUMA, E. H.; MANFIO, G. P. & CANHOS, V.P. (2000). An ecological study of acidothermophilic sporeforming bacteria (*Alicyclobacillus*) in the citrus industry. **Annals of the 23rd International Federation of Fruit Juice Producers (IFU) Symposium**. pp. 257-270.
- 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.
- FARRAND, S. G.; LINTON, J. D.; STEPHENSON, R. J. & MACCARTHY, W. V. (1983). The use of response surface analysis to study growth of

Bacillus acidocaldarius throughout the growth range of temperature and pH. **Microbiology** 135: 272.

GOTO, K.; MOCHIDA, K.; ASAHARA, M.; SUZUKI, M. & YOKOTA, A. (2002a). Application of the hypervariable region of 16S r DNA sequence as an index for the rapid identification of species in the genus *Alicyclobacillus*. **Journal General Applied Microbiology** 48: 243-250.

GOTO, K.; MATSUBARA, H.; MOCHIDA, K.; MATSUMURA, T.; HARA, Y.; NIWA, M. & YAMASATO, K. (2002b). *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing ω -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 52: 109-113.

GOTO, K.; MOCHIDA, K.; ASAHARA, M.; SUZUKI, M.; KASAI, H. & YOKOTA, A. (2003). *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 53: 1537-1544.

GÜRTLER, V. & STANISICH, V. A. (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology** 142: 3-16.

HATCHER, 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^a. ed. American Public Health Association, London.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K. & WELLINGTON, E. M. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic

- separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology** 63(8):3233-3241.
- HIPPECHEN, B.; ROLL, A. & PORALLA, K. (1981). Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing α -cyclohexane fatty acids and hopanoids. **Archives of Microbiology** 129: 53-55.
- HIRAISHI, A.; INAGAKY, K.; TANIMOTO, Y.; IWASAKI, M.; KISHIMOTO, N. & TANAKA, H. (1997). Phylogenetic characterization of a new thermoacidophilic bacterium isolated from hot springs in Japan. **Journal of General and Applied Microbiology** 43: 295-304.
- HONEYCUTT, R. J., SOBRAL, B. W. S., KEIM, P. & IRVINE, J. E. (1995). A rapid DNA extraction method for sugarcane and its relatives. **Plant Molecular Biology Reports** 10: 66-72.
- JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A. & STRAUS, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology** 59: 945-952.
- JENSEN, N. & WHITFIELD, F. B. (2003). Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. **Letters in Applied Microbiology** 36: 9-14.
- KIMURA, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16: 111-120.
- 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 Technology** 34: 81-85.

- LANE, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *In*: STACKEBRANDT, E. & GODFELLOW, M. (Eds). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. pp. 115-175. New York: John Wiley & Sons.
- LEE, S. Y.; DOUGHERTY, R. H. & KANG, D. H. (2002). Inhibitory effects of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. **Applied and Environmental Microbiology** 68: 4158-4161.
- 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.
- MATSUBARA, H.; GOTO, K.; MATSUMURA, T.; MOCHIDA, K.; IWAKI, M.; NIWA, M. & YAMASATO, K. (2002). *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, w -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 52: 1681-1685.
- MASSOL-DEYA, A. A.; ODELSON, D. A.; HICKEY, R. F. & TIEDJE, J. M. (1995). Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). *In*: AKKERMANS, A. D. L.; van ELSAS, J. D. & de BRUIJN, F. J. (Eds). **Molecular microbial ecology manual**. Cap. 3.3.2, pp. 1-8. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2001). **Resolução nº. 12, de 02 DE JANEIRO DE 2001, DOU de 20/12/00 – ANVISA**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para Alimentos. Brasília.
- 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.

- MURAKAMI M., TEDZUKA H. YAMAZAKI K. (1998). Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. **Food Microbiology** 15: 577-582.
- NICOLAUS, B.; IMPROTA, R.; MANCA, M. C.; LAMA, L.; ESPOSITO, E. & GAMBACORTA, A. (1998). Alicyclobacilli from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann. **Polar Biology** 19: 133-141.
- 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.
- PETTIPHER, G. L. & OSMUNDSON, M. E. (2000). Methods for detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Food Australia** 52 (7): 293-295.
- 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.
- PONTIUS, A.; RUSHING, J.; E. & FOEGEDING, P. M.; (1998). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. **Journal of Food Protection** 61: 41-46.

- 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.
- 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.
- SWOFFORD, D. L. (2000). **PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- SIMBAHAN, J.; DRIJBER, R.; & BLUM, P. (2004) *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California, USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 54: 1703-1707.
- 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.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680.

- TSURUOKA, N.; ISONO, Y.; SHIDA, O.; HEMMI, H.; NAKAYAMA, T. & NISHINO, T. (2003). *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 53: 1081-1084.
- UBOLDI EIROA, M. N. (1989). Microrganismos deteriorantes de sucos de frutas e medidas de controle. **Boletim SBCTA, Campinas** 23(3/4): 141-160.
- UCHINO, F. & DOI, S. (1967). Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. **Journal of Agriculture and Biological Chemistry** 31: 817-822.
- VANEECHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; DE BRIEL, D.; MONTEIL, H.; VERSCHAEGEN, G.; DE ROUCK, A. & CLAYES, A. (1995). Evaluation of the applicability of amplified DNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. **Research in Microbiology** 146: 633-641.
- WALLS, I. & CHUYATE, R. (1998). *Alicyclobacillus* - Historical perspective and preliminary characterization study. **Dairy Food and Environmental Sanitation** 18: 499-503.
- WALLS, I. & CHUYATE, R. (2000a). Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. **Journal of AOAC International** 83(5): 1115-1120.
- WALLS, I. & CHUYATE, R. (2000b). Spoilage of fruit juice by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Food Australia** 52: 286-288.
- 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 96th. General meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans LA, May, 1996.

- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A. & LANE, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 173: 697-703.
- WHITE, D.; SHARP, R. J. & PRIEST, F. G. (1993). A polyphasic taxomomy 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 liophilized 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.; KAWAI, Y.; INOUE, N. & SHINANO, H. (1997). Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. **Letters in Applied Microbiology** 25: 153-156.
- YOUNG, A. & BLAKESLEY, R. (1991). Sequencing plasmids from single colonies with the dsDNA cycle sequencing system. **Focus** 13: 13.

8. Anexos

Anexo I. Sequências de DNAr 16S dos isolados de *Alicyclobacillus* spp. analisados neste estudo.

>CBMAI 0291

GATCNTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCG
AGCGAGCCTTCGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATC
TGCCTTTCAGACTGGAATAACACTCGGAAACGGGTGCTAATGCCGGATAA
TACACGGGTAGGCATCTACTTGTGTTGAAAGATGCAACTGCATCGCTGAG
AGAGGAGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCCTTCGG
GTTGTAAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAGCGACAAGGAGAGTGGAAGCTC
CTTGTGAGACGGTACCGAGTGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAA
AGCGTGCGTAGGCGGTTGTGTAAGTCTGAAGTGAAAGTCCAAGGCTCAAC
CTTGGGATTGCTTTGGAAGTGCATGACTTGAGTGCTGGAGAGGCcAAGG
GGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTTGGAGGAATACCA
GTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTGACTGACGCTGAGGCACGAAAGCG
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
ACTGCTAGGTGTTGGGGGGACACACCCCAAGTGCCGAAGGAAACCAATAA
GCACTCCGCTCGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCCGCACAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACCGGTGCA

>CBMAI 0294

AGTGCAGCGGGTCTCTTCGGAGGCCAGCGGCGGACGGGTGAGGAACACG
TGGGTNATCTGCCCTTTCAGGCCGGAATAACGNCCCGGAAACGGGCGCTAA
TGCCGGATACGCCCCGCGAGGAGGCATCTTCTTGCGGGGGAAGGCCCAATT
GGcCCGCTGAGAGAGGAGCCCCGCGGCGCATTAGCTGGTTGGCGGGGTAAC
GGCCACCAAGGCGgACGATGCGTAgCCGACCTGAGAAgGGGTGACCGGCC
ACACTGGGACTgAGACACGGCCCCAGACTCCTACGtGGAGGCaGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGA
AGAAGGCCTTCGGCTTGTAAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAGCGGCATGGG
GGATGGAAGCCCCATGCGAGACGGTACCGAGTGAGGAAGCCCCGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCGCGGTAAAACGTAGGGGCGAGCGTTGTCCGGAAT
CACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTGAGCAAGTCTGGAGTGAAAGT
CCATGGCTCAACCATGGGATGGCTTTGGAAGTGTCTGACTTGAGTGCTG
GAGAGGCAAGGGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAATACCACTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTGACTGACGCTGAGG
CACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGGACACACCCcAGTGCCGAAGGA
AACCAATAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTG
AAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCTCTGACACCCCTCAG
AGATGAGGGGTCCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGATGGTTGTGCG
TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTTCACTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTGACCTGTGTTACCAGCGGTTGAGGCGGGGACTCACAGGTGACTGCCG
GCGTAAGTCGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTGAT
GTCCTGGGCTACACACCTGCTACAATGGGCGGAACAAAGGGAGGCGAACG
CGAAGGNGGAGCGAAACCCAAAAAGCCGCTCGTAGTTTCGGATTGCAGGCT
GCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
CCGCGGTGAATACGTTCGCCGGCCTTGATC

>CBMAI 0293

GGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACTCTTCGGAGGTCAGCGGCGG
ACGGGTGAGGAACACGTGGGTAATCTGCCTTTTCAGACCGGAATAACGCCC
GGAAACGGGCGCTAATGCCGGATACGCCCGGAGGAGGCATCTTCTTGCG
GGGAAAGNCCAATTGGGCCGCTGAGAGAGGAGCCCGCGGCGCATTAGCT
CGTTGGCGGGGTAACGGCCCCACCAAGGCGACGATGCGTACCGACCTGAGA
GGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCTGACGGAGCAACGCC
GCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGA
GCGGCATGGGGAGTGAAAGCCCCATGCGAGACGGTACCGAGTGAGGAAG
CCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGGGGCGAGCG
TTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGcCGGTGAGCAAGTCT
GGAGTGAAAGTCCATGGCTCCACCATGGGATGGCTCTGGAACTGCTTGA
CTTGAGTGCTGGAGAGGCAAGGGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAATACCCNGTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTGA
CTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAAGGATTAGATACCCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGACACACCCCA
GTGCCGAAGGAAACCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG
ACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCAGTGAGCATGT
GGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTC
TGACGGGTGCGAGAGATGCACCCCTTCCTTCGGGGCAGAGGAGAGCAGGTG
TGCATGGNTGTCTGCTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGTCA

>CBMAI 0288

GACGGGTGATACACGTGGGTAATCTGCCTGTGACACCGGAATAACGCCTG
GAAACGGGTGCTAATGCCGGATAGTCAGTCTTAGGGCATCTTAGGACTGG
GAAAGGCGCTAAGGCGTCACTGACAGAGGAGCCCGCGGCGCATTAGCTAG
TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACCGAGCAACGCC
GCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCAGTCACTCGGGAAGA
GCGAACCGGAGAGGGAATGCTCCGGTGGAGACGGTACCGAGAGAGGAAGC
CCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGT
TGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTTGGTAAGTCCG
GAGTGAAAGACCAGGGCTCAACCCTGGGGGTGCTTTGGAAACTGCCAGAC
TTGAGTGCTGGAGAGGCAAGGGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATGTGGAGGAATACCACTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTGACT
GACGCTGAGGCACGAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGTACCACCCCTCA
GTGCCGAAGGAAACCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG
ACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCAGTGAGCATGT
GGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTC
TGACGGGTTGAGAGATGAGCCGTCCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGT
GCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCCTTGACCTGTGTTACCAGCACGTGAAGGTGGGGACTCAC
AGGTGACTGCCGGCGTAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT
CATGCCCTTTATGTCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAC
GGGAAGCGAGACCGCGAGGTGGAGCGAAACCCCTGAAAGCCGTTCTAGATT
CGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGCCGCGGT

>CBMAI 0282

CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTGCCTGTGACACCGGAATA
ACGCCTGGAAACGGGTGCTAATGCCGGATAGTCAGTCTTAGGGCATCTTG
GACTGGGAAAGGCGCTTTGGCGTCACTGACAGAGGAGCCCGCGGCGCAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTA

CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGCGAAAGCCTGACCGAG
CAACGCCCGCTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCTCAGTCACTC
GGGAAGAGCGAACCGGAGAGGGAATGCTCTGGTAGAGACGGTACCGAGAG
AGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGG
CGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTTGGT
AAGTCCGAGTGAAAGACCAGGGCTCAACCTGGGGGTGCTTTGGAACT
GCCAGACTTGAGTGCTGGAGAGGCAAGGGGAATTCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCACTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGAC
AGTGACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGGTACC
ACCCTCAGTGCCGAAGGAAACCAATAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACT
GGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCAGT
GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTG
ACATCCCTCTGACGGGTGCAGAGATGTGCCGTCCCTTCGGGGCAGAGGAG
ACAGGTGGTGATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGACCTGTGTTACCAGCACGTAAGGGTG
GGGACTCACAGGTGACTGCCGGCGTAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
TCAATCATCATGCCCTTTATGTCTGGGCTACACAGTGCTACAATGGG
CGGTACAACGGGAAGCGAGACCGCGAGGTGGAGCGAAACCCCTGAAAGCCG
TTCGTAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATTG
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATCCGTTCCCGGGC

>CBMAI 0267

CGTGCTAANACATGCNAGTCGAGCGAGCCTTCGGGGCTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCTTTCAGACTGGAATAACACTCGGAA
ACGGGTGCTAATGCCGGATAATACACGGGTAGGCATCTACTTGTGTTGAA
AGATGCAACTGCATCGCTGAGAGAGGAGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTANCCGACCTGAGAGGGT
GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCG
TGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAGCG
ACAAGGAGAGTGGAAGCTCCTTGTGAGACGGTACCGAGTGAGGAAGCCC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTG
TCCgGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGcCGGTTGTGTAAGTCTGAA
GTGAAAGTCCAAGGCTCAACCTTGGGATTGCTTTGGAACTGCATGACTT
GACTGCTGGAGAGGCAAGGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATGCTGGAGGAATACCACTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTGACTGA
CGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGACACACCCCACTGC
CGAAGGAAACCCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGAC
CGGTGCAGAGATGTACCTTCCTTCGGGCAGAGGAGACAGGTGTG

>CBMAI 0290

GGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGGTCTCTTCGGAGGCCAGCGGCG
GACGGGTGAGGAACACGTGGGTAATCTGCCTTTCAGGCCGGAATAACGCC
CGGAAACGGGCGCTAATGCCGGATACGCCCGGAGGAGGCATCTTCTTGC
GGGGGAAGGCCCAATTGGGCGCTGAGAGAGGAGCCCGCGCGCATTAGC
TNGTTGGCGGGTAAAGCGCCCAAGGCGACGATGCGTANCCGACCTGA
GAGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCTGACGGAGCAACG
CCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCTCTGTTGCTCGGGGA
GAGCGGCATGGGGGATGGAAGCCCCATGCGAGACGGTACCGAGTGAGGA
AGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAAACGTAGGGGGCGAG
CGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTGAGCAAGT
CTGGAGTGAAAGTCCATGGCTCAACCATGGGATGGCTTTGGAACTGCTT
GACTTGAGTGCTGGAGANGCAAGGGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATG

CGTAGAGATGTGGAGGAATACCACTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTN
 ACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGNGCAAACAGGATTAGATACCCT
 GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGNANACACCC
 CAGTGCCGAAGGAAACCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCGA
 AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCAGTGGAGCAT
 GTGGTNTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCC
 TCTGACACCNCTCAGAGATGAGGGTTCCTTCGGGGCNAGAGGNNGNACNAG
 GTGGTGCATGGNGTCGTGCACTCGTTTCGTGAGATGTTGNG

>CBMAI 0281

GCGAGCCTTCGGGGCTAGCGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCT
 GCCTTTCAGACTGGAATAACA CTCcGAAACcGGTGCTAATGCCGGA TAA T
 ACACGGGTAGGCATCTACTTGTGTTGAAAGATGCAACTGCATCGCTGAGA
 GAGGAGCCCCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
 CGACGATGCGTA GCGGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTgGGACTGAG
 ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
 GGCgCAAgCCTGACGGAGCAACGCCGCGT aACCcAAGAAGGCCTTCcGGT
 TgTAAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAGCGACAAGGAGAGTGGAAGCTCCT
 TGTGAGACGGTACCGAGTGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAG
 CGTGCCTAGGCGGTTGTGTAAGTCTGAAGTGAAAGTCCAAGGCTCAACCT
 TGGGATTGCTTTGGAAACTGCATGACTTGAGTGCTGGAGAGGCAAGGGGA
 ATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAATACCAGTGG
 CGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTGACTGACGCTGAGGCACGAAAAGCGTGGG
 GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
 CTAGGTGTTGGGGGACACACCCcAGTGCCGAAGGAAACCAATAAGCAC
 TCCGCCTGGGgAGGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAaAGGAATTGACGG
 GGGCCCCGACAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACCGGtgCAGAGATGTACCTTC
 CCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTC
 GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTGTGTT
 ACCAGCACGTAGAGGTGGGGACTCACAGGTGACTGCCGGCGTAAGTCGGA
 GGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTTATGTCTGGGCTAC
 ACACGTGCTACAATGGGCGGTACAACGGGGAAAGCGAACCCCNAGGTGGA
 GCAAAACCTAAAAAGCCGGTCGTAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAANTCGCC
 TGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA
 TCCGTTCCCCGGCCTTGTAC

>CBMAI 0269

CGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCCTTCGGGGGGCTAGCGGCGGACG
 GGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCTTTCAGACTGGAATAACACTCGGA
 AACGGGTGCTAATGCCGATAATACACGGGTAGGCATCTACTTGTGTTGA
 AAGATGCAACTGCATCGCTGAGAGAGGAGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
 GGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGCGACGATGCGTANCCGACCTGAGAGGG
 TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
 GCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCTGACGGAGCAACGCCGCG
 TGAGCAAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAGCG
 ACAAGGAGAGTGGAAGCTCCTTGTGAGACGGTACCGAgTGAGGAAGCCC
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTG
 TCCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTGTGTAAGTCTGAA
 GTGAAAGTCCAAGGCTCAACCTTGGGATTGCTTTGGAAACTGCATGACTT
 GAGTGCTGGAGAGGCAAGGGGAATTcACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 ATATGTGGAGGAaTACCAGTGCGGAAGgCGCCTTGCTGGACAGTNACTGA
 CGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGNGCAAACNNGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGNACACACCCCACTG
 CCGAAGGAAACCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACT
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCAGTGGAGCATGTGGT
 NTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGA

CCGGTGACAGAGATGTACCTTCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCAT
GGNTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGTT

>CBMAI 0283

GGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCCTTCGGGGCTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCTTTCAGACTGGAATAACACcCCG
AAACcGGTGCTAATGCCGGATAaTACACGGGTAGGCATCTACTTGTGTTG
AAAGATGCAACTGCATCGCTGAGAGAGGAGCCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAG
CGACAAGGAGAGTGGAAAGCTCCTTGTGAGACGGTACCGAGTGAGGAAGC
CCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGT
TGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTGTGTAAGTCTG
AAGTGAAAGTCCAAGGCTCAACCTTGGGATTGCTTTGGAAACTGCATGAC
TTGAGTGCTGGAGAGGCAAGGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATGTGGAGGAATACAGTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTGACTG
ACGCTGAGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGGACACACCCAGT
GCCGAAGGAAACCcAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTG
ACCGgTGCAGAGATGTACCTTCCCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGC
ATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCCTTGATCTGTGTTACCAGCACGTAGAGGTGGGACTCACAG
GTGACTGCCGGCGTAAGTCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCA
TGCCCTTTANGTCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAACGG
GAAGCGAACCGCGAGGTGGAGCAAACCTAAAAAGCCGTTTCGTAGTTCGGA
TTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGG
ATCAGCATGCCG

>CBMAI 0295

GGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGGTCTCTTCGAGGGCCAGCGGCG
GACGGGTGAGGAACACGTGGGTAATCTGCCTTTCAGGCCGGAATAACGCC
CGGAAACGGGCGCTAATGCCGGATACGCCCAGGAGGCATCTTCTTGC
GGGGGAAGGCCCAACTGGGCGCTGAGAGAGGAGCCCGCGGCGCATTAGC
TAGTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATGCGTACCGACCTGAG
AGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGCAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGA
GCGGCATGGGGGATGGAAAGCCCCATGCGAGACGGTACCGAGTGAGGAAG
CCCCGGCTAACTACGGGCGAGNAGCGNGGTAAAACGTAGGGGGCGACCG
TTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTGAGCAAGTNT
GGAGTGAAAGTCCATGGCTCAACCATGGGATGGCTTTGGAAACTGCTTGA
CTTGAGTCTTGAGAGGCAAGGGGAATTCCACGTGTAGcGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAATACAGTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTNAC
TGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACNNCNTTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGNACACACCCCA
GTGCCGAAGGAAACCCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG
ACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACANGCAGTGGNGCATGT
GGNNTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCCTCT
GACACNCTCAGAGATGAGGGGCTCTCTTGGNTCTATATGAGTCNATGTNT
CNACTGCTNTCGTCNCTGTTTCGTAATGTTGTGA

>CBMAI 0278

GGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACGGAAGGGAGCTTGCTCCTGG
AAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTGCCTGTCAGAC
CGGAATAACGCCTGGAAAACGGGTGCTAATGCCGGATAGTCAGTCTTAGG
GCATCTTAGGACTGGGAAAGGCGCTAAGGCGTCACTGACAGAGGAGCCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATGCG
TACCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGCGAAAGCCT
GACCGAGCAACGCCCGCTGAGCGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCTCA
GTCACt CGGGAAGAGCGAACC GGAGAGGGAATGCTCCGGTGGAGACGGTA
CCGAGAGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACG
TAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCG
GTTTGGTAAGTCCGAGTGAAAGACCAGGGCTCAACCTGGGGGGGCTTT
GGAAACTGCCAGACTTGAGTGCTGGAGAGGCAAGGGGAATTCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGCCTT
GCTGGACAGTGACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGG
GGTACACCCTCAGTGCCGAAGGAAACCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGgCCCCGACAAGC
AGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGC
TTGACATCCCTCTGACGGGTTGAGAGATGAGCCGTCCcTTCGGGGCAGAG
GAGACAGGTGGTGATGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTGACCTGTGTTACCAGCACGTGAAG
GTGGGGACTCACAGGTGACTGCCGGCGTAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAATCATCATGCCCTTNATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGGCGGTACAACGGGAAGCGAGACCGCGAGGTGGAGCGAAACCTGAAAG
CCGTTCTGATGTTTCGGATTGACAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGNCGGAA
TTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATCCGTTCCCGGGCCT
TNTAC

>CBMAI 0296

GGCGTGCTAATACATGCAAGNNGAGCGANCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCTTTT CAGACTGGAATAACACTCCG
AAACGGGTGCTAATGCCGGATAATACACGGGTAGGCATCTACTTGTGTTG
AAAGATGCAACTGCATCGCTGAGAGAGGAGCCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAG
CGACAAGGAGAGTGGAAGCTCCTTGTGAGACGGTACCGAGTGAGGAAGC
CCCCGGCTAACTACGNGNCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGT
TGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTGTGTAAGTCTG
AAGTGAAGTCCAAGGCTCAACCTTGGGATTGCTTTGGAAACTGCAATGAC
TTGAGTGCTGGAGAGGCAAGGGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATGTGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTGACT
GACGCTGAGgCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACNGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGGAGACACCCAG
TGCCGAAGGAAACCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGTGAGCATGTG
GTTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCT
GACCGGTGCAGAGATGTACCTTTCTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTG
CATGNGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATG

>CBMAI 0277

TGCAAGTCGAGCGAGCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG
TGGGCAATCTGCCTTT CAGACTGGAATAACACTCGGAAACGGGTGCTAAT
GCCGATAATACACGGGTAGGCATCTACTTGTGTTGAAAGATGCAACTGC
ATCGCTGAGAGAGGAGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG

CTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCGGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCGCAATGGGCGCAAGCcTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAG
GCCTTCGGGTGTGTAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAGCGACAAGGAGAGTG
GAAAGCTCCTTGTGAGACGGTACCGAGTGAGGAAGCCCCGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATCACT
GGCGGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTGTGTAAGTCTGAAGTGAAAGTCCAA
GGCTCAACCTTGGGATTGCTTTGGAAACTGCATGACTTGAGTGCTGGAGA
GGCAAGGGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGA
ATACCAGTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTGACTGACGCTGAGgCACG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGGaCACACCCcAGTGCCGAAGGAAaCC
CAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGC
AACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACCGgTGCAGAGA
TGTACCTTCCCTTTCGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCA
GCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTG
ATCTGTGTTACCAGCACGTAGAGGTGGGGACTCACAGGTGACTGCCGGCG
TAAGTCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTTATGTC
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAACGGGAAGCGAACC GCG
AGGTGGAGCAAAACCTAAAAAGCCGTTCTAGTTTCGGATTGCAGGCTGCA
ACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCANCATGCCG
CGGGGAATCGGGNCCCGGCCT

>CBMAI 0279

GAGCGGACGGAAGGGAGCTTGCTCCTGGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAG
TAACACGTGGGTAATCTGCCTGTCAGACCGGAATAACGCCTGGAAACGGG
TGCTAATGCCGGATAGTCAGTCTTAGGGCATCTTGGGACTGGGAAAGGCG
CTTTGGCGTCACTGACAGAGGAGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGG
GTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATGCgTAGCcGACCTGAGAGGgTGACCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCaAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCGGCAATGGGCGAAAGCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGC
GAAGAAGGCCTTCGGGTGTGTAAGCTCAGTCACTCGGGAAGAGCGAACC
GAGAGGGAATGCTCTgTAGAGACGGTACCGAGAGAGGAAGCCCCGGCTA
ACTAGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGA
ATCACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGTTTgTAAGTCCGAAGTGAAA
GaCCAaGGCTCAACCTTGGGATTGCTTTGGAAACTGCcAGACTTGAGTGC
TGGAGAGGCAAGGGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAgATGT
GGAGGAATACCACTGGCGAAGGCGCCTTGCTGGACAGTGACTGACGCTGA
GgCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGGACACACCCAGTGCCGAAG
gAAACCcAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCTGACcGgTG
CAGAGATGTaCCtTCCCTTcGGGGCAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTG
TCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTGACCTGTGTTACCAGCACGTAAGGTGGGGACTCACAGGTGACTG
CCGGCGTAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
TATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAACGGGAAGCGA
GACCGCAGGTGGAGCGAAACCCCTGAAAGCCGTTCTAGTTTCGGATTGCA
GGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAG
CATGCCGCGGTGAATCCGTTCCCGGCCTT

