

Comunicación breve

Evaluación de la Acción de Desinfectantes sobre Esporos de *Alicyclobacillus*

RECIBIDO: 20/6/08

ACEPTADO: 7/8/08

Sobrero, M.S.¹ • Fernández, V.¹ • Martins, J.² •
Basilico, J.C.² • Sanchis, J.C.¹

¹ Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas,

² Facultad de Ingeniería Química. Ciudad Universitaria Paraje
El Pozo. 3000. Santa Fe. Argentina. Tel: 0342 4575206.int.127.
Email: ssobrero@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: *Alicyclobacillus* es una bacteria esporulada ácido termófila aislada frecuentemente de frutas, jugos y bebidas a base de frutas. Ocasiona grandes pérdidas a la industria ya que soporta la pasteurización y acidez alterando los jugos sin que los consumidores puedan advertir su alteración hasta el momento de utilizarlos. Con el propósito de aportar soluciones que permitan controlar éste microorganismo se ensayaron tratamientos químicos desinfectantes. Suspensiones de esporos de cepas de *Alicyclobacillus* se mezclaron durante dos minutos con soluciones de hipoclorito de sodio y ácido peracético, luego se cultivaron en medio BAM modificado de pH 3,7 durante 7 días a 55°C y finalmente se contaron las UFC mL⁻¹. Para ambos compuestos se encontró que la respuesta frente a la cepa de colección usada y la cepa procedente de frutas de quinta orgánica Argentina eran similares. Además ninguno de los dos sanitizantes logró disminuir más de 1 log los recuentos en las concentraciones de 100, 250 y 500 ppm ensayadas.

PALABRAS CLAVE: *Alicyclobacillus*, hipoclorito de sodio, ácido peracético, reducción.

SUMMARY: *Evaluation of the disinfectant action on Alicyclobacillus spores*
Alicyclobacillus is a sporulated acid-thermo resistant bacterium frequently isolated from fruits, juices and fruit-based drinks. It undergoes traditional pasteurization and acidity, occasionally altering the juices. In order to provide solutions that will allow industry to control this microorganism, chemical disinfectant treatments were assayed. Spore suspensions of *Alicyclobacillus* strains were mixed during two minutes with solutions of sodium hypochlorite and peracetic acid, then cultured in modified BAM medium pH 3.7 during seven weeks at 55°C and, finally, the UFCmL⁻¹ were counted. For both compounds it was found that the response front to the strain collection used and the one coming from Argentinian organic fruit were similar. None of the two disinfectants could reduce the counts in the assayed concentrations (100, 250, and 500 ppm) in more than 1 log.

KEYWORDS: *Alicyclobacillus*, sodium hypochlorite, peracetic acid, reduction.

Introducción

En los años 80 se conocieron los primeros casos de jugos alterados por bacterias ácido termófilas (TAB) en Alemania, desde la década del 90 muchas TAB se aislaron de jugos de fruta deteriorados en Estados Unidos, Europa, Japón y Brasil. Las mismas fueron identificadas como *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *A. acidocaldarius*. (1, 2, 3, 4, 5, 6) aunque trabajos más recientes citan también a *Propionibacterium cyclohexanicum* como productora de los ácidos grasos responsables del deterioro característico (7). *Alicyclobacillus* tiene una distribución ubicua, se puede aislar del suelo, en particular en zonas volcánicas o con aguas termales, desde donde arrastrado por el viento contamina las frutas, fundamentalmente en periodos de sequía. De esta manera ingresan a los establecimientos elaboradores y allí colonizan los equipos de la parte caliente del proceso como en el agua del condensador (8, 9).

En nuestro país se ha aislado TAB de frutas, jugos y aguas usadas en el proceso de los mismos, tanto de frutas cítricas como de manzanas, de las provincias de Entre Ríos y Río Negro (8). Estas bacterias son capaces de resistir la pasteurización y acidez del medio, afectando luego la calidad y ocasionando importantes pérdidas económicas a los industriales que formulan bebidas (10,11, 12, 13).

Si bien no afectan la salud de los consumidores, alteran las características organolépticas del producto y como no producen gas (no deforman el envase), el comprador recién notará las características desagradables en el momento del consumo.

Las alteraciones más frecuentes son: el aroma y el aspecto. El olor reportado del jugo es medicinal o antiséptico, siendo el metabolito responsable, el guayacol (10, 11,

12). También puede modificarse la turbidez dejando un sedimento no deseado (10, 5). Estas alteraciones pueden notarse a partir de concentraciones tan bajas de *Alicyclobacillus* como de 10^2 UFC mL⁻¹ (11). Por estos motivos actualmente el comercio internacional en muchos casos está exigiendo a sus proveedores cantidades no detectables de TAB.

Actualmente muchos grupos de investigación han orientado sus estudios a evaluar los procedimientos que se deben implementar en las plantas de elaboración para eliminar la bacteria de las instalaciones. Se han reportado la utilización de agentes físicos tales como la presión y la temperatura, de agentes químicos como el dióxido de cloro, el hipoclorito, agua oxigenada, ácido peracético, entre otros, con dispares resultados (12,13,14,15,16,17). Por ese motivo y con el propósito de evaluar la resistencia de los esporos de cepas autóctonas en el presente trabajo se estudió la eficiencia de diferentes tratamientos químicos sanitizantes frente a esporos de cepas de *Alicyclobacillus*.

Materiales y métodos

Microorganismos: se utilizaron dos cepas de *Alicyclobacillus* una de la colección española CECT N° 5137 aislada de jugos de fruta y otra aislada de cáscaras de naranjas provenientes de una quinta productora de fruta orgánica, de la costa del río Uruguay, en la provincia de Entre Ríos.

Sanitizantes: se utilizaron los dos sanitizantes más frecuentemente usados en la industria de jugos y bebidas: hipoclorito de sodio y ácido peracético. El primero de indiscutida utilidad y difusión, y el segundo, por sus características ventajosas como: la particularidad de ser efectivo tanto para bacterias y sus esporos, levaduras y mohos, así como frente a biofilms, no deja residuos, es menos corrosivo, es rápido, es

efectivo en presencia de materia orgánica y de aguas duras, por requerir bajas concentraciones de uso su costo es muy moderado, prácticamente, no genera espuma, por lo que resulta muy fácil de enjuagar (18).

Procedimiento: Las cepas se inocularon en caldo BAM modificado (2g de extracto de levadura, 2 g de glucosa, 0.2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.6 g KH_2PO_4 y 1litro de agua) esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El pH se ajustó a 3,7 con ácido málico 1N esterilizado por filtración. Se incubó en estufa a 55°C durante 15 días. Dichas suspensiones se sometieron a un choque térmico de 10 minutos a 80°C y así se obtuvo el inóculo de trabajo. Luego 1 mL del mismo se agregó a 9 mL de disoluciones de hipoclorito de sodio y ácido peracético, ambos comerciales, de concentración: 100, 250 y 500 ppm. Se dejó actuar por dos minutos y luego se realizaron diluciones decimales en caldo BAM que se sembraron en medio BAM modificado con doble glucosa y extracto de levadura (Solución A: igual composición que el caldo pero sin glucosa, pH 3.7 y 500 ml de agua y solución B: glucosa 2g, agar 20 g y agua 500 mL, ambas soluciones se mezclaron en el momento de usar a 40°C), se incubó a 55°C durante 7 días. En todos los casos se procedió por duplicado y las experiencias se repitieron tres veces. Se realizó el recuento en placa de las UFC mL^{-1} , al promedio de las dos placas se les calculó el logaritmo decimal.

Análisis estadístico de los resultados: Los resultados se trataron estadísticamente con la versión libre del programa Statgraphics 5.0.

Resultados y discusión

En base a la visita a la planta elaboradora de jugos de la que se extrajeron las muestras de frutas y jugos para realizar el trabajo,

se seleccionaron los parámetros del ensayo. Cuando las frutas cítricas llegan a la fábrica procedentes de quintas o galpones de empaque se almacenan hasta el momento de ser utilizadas. Luego se vuelcan a la batea de lavado con sanitizantes y la cinta transportadora las conduce al enjuague por aspersión, continúa la selección manual, el tamañado y, finalmente, llegan a las exprimidoras. A partir de ésta realidad se estimó que el tiempo de contacto de las frutas con el sanitizante es de dos minutos y ese fue el tiempo que se dejó a actuar en este estudio. Las concentraciones de sanitizantes se seleccionaron en función de las concentraciones máximas permitidas como residuo luego del enjuague que no pueden superar 10 a 12 ppm (18), además porque podrían alterar caracteres organolépticos del jugo.

El caldo y medio de cultivo utilizados se modificaron a partir de ensayos de laboratorio con el propósito de obtener suspensiones con número de recuento lo más altos posibles (orden 10^5 UFC mL^{-1}) para poder evaluar la eficiencia del tratamiento químico.

En la tabla 1 se resumen los resultados obtenidos para las dos cepas estudiadas, los mismos se expresan como logaritmos decimales del promedio del recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro que sobreviven luego de aplicar sanitizante durante dos minutos y desarrollan en medio BAM a pH 3,7 (Log N).

Para todas las experiencias se realizaron tres repeticiones, luego se aplicó el test estadístico de comparación de medias resultando que no existía diferencias significativas con un 95 % de confianza. Los p-valor obtenidos fueron: para cepa control – hipoclorito: 0,516; cepa control – peracético: 0,9807; cepa de fruta orgánica – hipoclorito: 0,668 y para la cepa de fruta orgánica – peracético: 0,919

Tabla 1: Resultados Logarítmicos de los recuentos de Alicyclobacillus en medio BAM post tratamiento de suspensiones de esporos con sanitizantes*

CEPAS	Parámetros Estadísticos	Hipoclorito de sodio (ppm)				Acido Peracético (ppm)			
		0	100	250	500	0	100	250	500
Cepa Control	Media	5,956	5,725	5,685	5,342	5,565	4,892	4,604	4,302
	Varianza	0,004	0,001	0,001	0,310	0,0003	0,009	0,002	0,008
	Rango	0,012	0,063	0,0602	0,9675	0,0356	0,1918	0,0850	0,1760
	Mínimo	5,952	5,698	5,653	4,698	5,545	4,799	4,568	4,204
	Máximo	5,964	5,761	5,713	5,666	5,580	4,991	4,653	4,380
Cepa de huerta orgánica	Media	5,852	5,802	5,757	5,257	5,780	5,349	5,018	4,813
	Varianza	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,007	0,022	0,007
	Rango	0,079	0,061	0,061	0,030	0,108	0,168	0,298	0,178
	Mínimo	5,812	5,770	5,724	5,221	5,724	5,278	4,857	4,724
	Máximo	5,892	5,832	5,785	5,287	5,832	5,447	5,155	4,903

* n= 6

En la Figura 1 se puede visualizar en la parte superior los resultados de los recuentos luego del tratamiento con lavandina y en la parte inferior los de peracético. El aumento de concentración no afecta tanto al hipoclorito de sodio como al peracético.

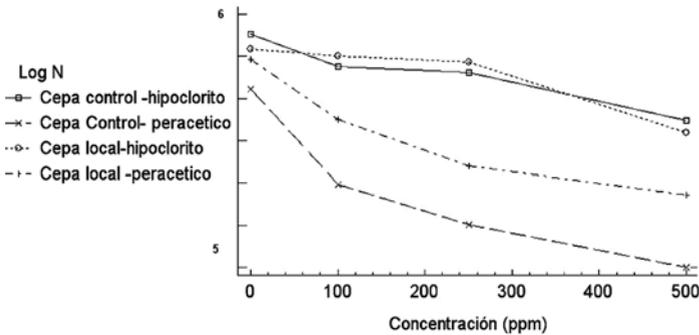
La cepa de la zona se muestra más resistente al tratamiento que la cepa de colección. Pero en ninguno de los dos casos se puede considerar que el tratamiento resulte notoriamente efectivo o que siempre una cepa fue más sensible.

Las reducciones con los dos fueron en el mejor de los casos de un ligeramente superiores a un logaritmo decimal. Con respecto al tratamiento con hipoclorito los hallazgos son coincidentes con los resultados

de Orr y Beuchat (17), estos investigadores hallaron que para concentraciones menores a 1200 ppm durante 10 minutos las reducciones no superan las 2 log. Estos investigadores también concluyeron que no existirían grandes diferencias entre las 5 cepas diferentes que testearon. Sus estudios con un desinfectante a base de ácido peracético mostraron que a concentraciones de 160 ppm y 10 minutos de exposición no se logran reducciones mayores a 1 log y no existen diferencias entre cepas.

Conclusión

El presente trabajo ha puesto de manifiesto lo complejo que resulta para la industria el control de TAB. Una vez que estas bac-

**Figura 1:**

Logaritmos del promedio de esporos de *Alicyclobacillus* sobrevivientes a tratamientos desinfectantes*

* Duración del Tratamiento 2 minutos.

terías llegan a la empresa ni los tratamientos térmicos, ni los tratamientos químicos parecen resolver el problema, de allí que se deberán seguir buscando alternativas para llevar tranquilidad a empresarios y consumidores, además de seguir insistiendo con la necesidad de implementar Buenas Prácticas Agrarias (BPA) y de Manufactura (BPM). Para lograr esto último se deberían realizar capacitaciones específicas acerca de la problemática del manejo de TAB.

Bibliografía

1. Cerny, G., W. Hennlich, K. Poralla.. 1984. Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoilage organism. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* Vol. **179**:224-227.
2. Deak T., Timar E. 1998. Simplified identification of aerobic sporeformers in the investigation of foods. *Intern. Journal of Food Microbiology.* Vol **6** (12):115-125.
3. Eiroa, M.N; Junqueira, V.C; Schmidt, F.L. 1999. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *J. Food Prot.* Aug; Vol **62** (8):883-6.
4. Matsubara H, Goto K, Matsumura T, Mochida K, Iwaki M, Niwa M, Yamasato K. 2002 *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, omega-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Sep;* Vol.**52**:1681-5.
5. Walls, I. and Chuyate, R 1998. *Alicyclobacillus* — Historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy Food and Environ. Sanitation.* Vol **18**:499-503.
6. Walls I, Chuyate R. 2000. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. *J. AOAC Int. Sep-Oct;* Vol. **83** (5):1115-20.
7. Kusano,K; Yamada, H.; Niwa M. and Yamasato,K. 2004. *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a new acid-tolerant omega- cyclohexyl fatty acid-containing propionibacterium isolated from spoiled orange juice. *International Journal of Systematic Bacteriology,* Vol **47**: 825-831.
8. Sobrero, MS; Fernández, V; Martins,J; Basílico,JC y Sanchis,JC. 2007. Bacterias Esporuladas Acido Termófilas en el Proceso de Elaboración de Jugos Concentrados de frutas procedentes de Zonas de Riesgo de la República Argentina. *Revista FABICIB.* Vol. **11**: 251-63Wisse, C. A., and M. E. Parish. 1998 Isolation and enumeration of sporeforming, thermoacidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. *Dairy Food and Environ. Sanitation.* Vol.**18**:504-509.
9. Brown K.L. 1995. *New Microbiological*

- spoilage challenges in aseptics *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage aseptically packed fruit juices. In T. Ohlsson (ed.), *Advances in Aseptic Processing and Packaging Technologies Proceedings of international symposium Copenhagen, Sept. 11-12. Swedish Institute for Food Research, Gutemberg. Sweden.*
10. Pettipher, G Osmundson M; y Murphy,J. 1997. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice containing juice. *Letters Appl. Microbiol.* Vol **24**: 185-189.
 11. Jensen, N; Whitfield, F.B. 2003;Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Lett. Appl. Microbiol.* Vol **36**(1):9-14.
 12. Splittstoesser, D. F., J. J. Churey, and C. Y. Lee. 1994. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacteria isolated from fruit juices. *J. Food Protection.* **57**:1080- 1083.
 13. Sun-Young Lee, Richard H. Dougherty, and Dong-Hyun Kang. 2002 Inhibitory Effects of High Pressure and Heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores in Apple Juice . *Applied and Environmental Microbiology*, Vol **68** (8): 4158-4161.
 14. Hartman, A. D. 2003.The Efficacy of Antimicrobials for the Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Fruit and Vegetable Juices. Master 's Thesis . Department: Food Science and Technology.
 15. Lee,S.Y; Gray, P.M; Dougherty, R.H; Kang, D.H. 2004.The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples. *Int. J. Food Microbiol.* Apr; 15; Vol **92**(2):121-7.
 16. Orr, R.V. and Beuchat,L.R. . 1999. fficacy of Disinfectants in Killing Spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and Performance of Media for Supporting Colony Development by Survivors. *Letters in Applied Microbiology*Jan; Vol. **36**(1) 9.
 17. SENASA. 2002.Guía de Buenas Prácticas de Higiene, Agrícolas y de Manufactura para la producción primaria (cultivo-cosecha), acondicionamiento, empaque, almacenamiento y transporte de frutas frescas. Resolución SENASA N° 510.