**OCORRÊNCIA DE *Bacillus coagulans* E CONTAGEM BACTERIANA
TOTAL EM TOMATES E SEUS PRODUTOS NO
ESTADO DE SÃO PAULO**

SANDRA M. FERRAZ DE ARRUDA SPOSITO

Orientador: Prof. Dr. HOMERO FONSECA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola.

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho de 1984**

A meus pais e irmãos
que muito contribuíram
para a minha formação,
minha gratidão.

Ao meu esposo, Reginaldo
e meus filhos,
Ricardo, Eduardo e Juliana,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos:

- Ao Prof. Dr. *Homero Fonseca* pela amizade, estímulo e segura orientação durante a realização deste trabalho;

- À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*, pelo apoio financeiro, tornando possível a realização desta pesquisa;

- Ao Prof. Dr. *José Santo Goldoni*, da Faculdade de Ciências Agrônômicas do Campus de Botucatu, pela sua orientação, receptividade e ensinamentos recebidos;

- Ao Prof. *Antonio Joaquim de Oliveira* pelo acolhimento junto ao laboratório do Departamento de Tecnologia Rural e apoio;

- Ao Prof. *Alcídes Martinelli Filho* pelas sugestões por ocasião da redação da tese;

- Aos professores do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, pelos valiosos ensinamentos recebidos;

- Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

pela amizade e colaboração prestada;

- *À Costa Pinto Industrial de Alimentos Ltda.*,
pela permissão na coleta das amostras de tomate.

E a todos que direta ou indiretamente contri-
buíram para a realização deste trabalho,

ÍNDICE

	<u>página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Introdução	5
2.2. Características de <i>Bacillus coagulans</i>	7
2.3. Distribuição de esporos da bactéria "flat- sour"	13
2.3.1. Solo e água	13
2.3.2. Leite	15
2.3.3. Açúcar e amido	16
2.3.4. Ingredientes	17
2.3.5. Tomate e seus produtos	17
2.4. Controle	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Material	20
3.2. Meios de cultura	20
3.3. Métodos	21
3.3.1. Coleta das amostras	21
3.3.2. Preparo das amostras	23
3.3.3. Contagem de <i>Bacillus coagulans</i> em toma te e produtos derivados	24
3.3.3.1. Contagem total	25
3.3.3.2. Contagem de esporos	25
3.3.4. Contagem de microrganismos em tomate e seus produtos	27

3.3.4.1. Contagem total	27
3.3.4.2. Contagem de esporos	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÕES	43
6. LITERATURA CITADA	45

OCORRÊNCIA DE *Bacillus coagulans* E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL
EM TOMATES E SEUS PRODUTOS NO ESTADO DE SÃO PAULO

Autora: Sandra Maria Ferraz de Arruda Sposito

Orientador: Prof. Dr. Homero Fonseca

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar a incidência de *Bacillus coagulans* e a contaminação bacteriana total em tomate e seus produtos.

O material utilizado na análise constituiu-se de 120 amostras de tomate bruto e lavado, suco antes da concentração, polpa concentrada e extrato coletados semanalmente em uma indústria alimentícia no município de Botucatu (SP).

Para a quantificação, foi utilizada a técnica de contagem em placas (pour plate) em GTY, com incubação a 37°C durante 48 horas, para a contagem total de microrganismos e em NCA, com incubação a 45°C, durante 48 horas, para a contagem de *Bacillus coagulans*.

Os resultados revelaram índices variáveis de contaminação total de microrganismos nas amostras analisadas, sendo mais intensa na matéria-prima bruta, que apresentou tam

bem, maior incidência de *Bacillus coagulans*, tanto em contagem total como em contagem de esporos.

De um modo geral, o número de microrganismos presente nas amostras analisadas foi grande, porém, a incidência de *Bacillus coagulans* mostrou ser baixa no Estado de São Paulo.

Não houve predominância de incidência de *Bacillus coagulans* em qualquer das regiões tomateiras do Estado de São Paulo analisadas.

OCCURRENCE OF *Bacillus coagulans* AND TOTAL BACTERIAL COUNT IN
TOMATOES AND THEIR BY-PRODUCTS IN THE STATE OF SAO PAULO

Author: SANDRA MARIA FERRAS DE ARRUDA SPOSITO

Adviser: PROF. DR. HOMERO FONSECA

SUMMARY

In the present work it was studied the occurrence of *Bacillus coagulans* and total bacterial count in tomatoes and their by-products, in the State of São Paulo.

On hundred and twenty samples of raw and washed tomatoes, pre-heated juice (prior to concentration) and concentrated pulp or tomato paste were collected weekly in a food processing plant located at Botucatu (SP).

Bacillus coagulans and total bacterial counts were made on plates in GTV incubated at 37°C for 48 hours and also in NCA incubated at 45°C for 48 hours.

The results showed a varied contamination of microorganisms in the samples, being more intense in raw tomatoes either for total counts or for *Bacillus coagulans*.

In general, the total count of microorganisms

was high but the incidence of *Bacillus coagulans* showed to be low in the State of São Paulo.

The incidence of *Bacillus coagulans* was not predominant in any region of the State of São Paulo.

1. INTRODUÇÃO

O tomate é originário do Equador e Norte do Chile (JENKINS, 1948) e, provavelmente, também das Ilhas Galápagos (RICK, 1967). É uma hortaliça cultivada em todo o mundo sendo, portanto, de grande importância, não só em termos de produção, como também em valor econômico, em virtude de ser, seguramente, a cultura mais industrializada.

O tomate pode, através de um processamento adequado, dar origem a inúmeros produtos, alguns deles, de elevado consumo no Brasil. Assim, pode-se obter, do tomate inteiro, o tomate pelado e do quebrado, em diversos graus de intensidade, suco, polpa concentrada, purê, catchup, extratos, molhos culinários e inclusive tomate em pó.

Os produtos enlatados resultantes da industrialização do tomate apresentam as mais variadas aplicações, des

de que possuam bom sabor, aroma, aspecto e valor nutritivo para competir com o produto fresco encontrado o ano todo.

A industrialização do tomate no Brasil iniciou-se durante a Segunda Guerra Mundial. Até então, a maior parte do tomate industrializado era importado da Argentina ou Itália, com alguma produção de origem caseira.

No Brasil, houve um significativo aumento na produção de tomate a partir de 1972. As indústrias existentes aumentaram sua capacidade e outras novas foram instaladas em diversas regiões. Os maiores produtores são os Estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul.

De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - 1982) a produção brasileira de tomate atingiu 1.739.527 toneladas em 1982. O Estado de São Paulo, com produção de 826.000 toneladas nesse mesmo ano, foi o responsável por 91% da capacidade de industrialização do tomate (MINAMI, 1980).

A cultura do tomate rasteiro no Estado de São Paulo é destinada, em sua maioria, para a industrialização. As áreas de maior produção são as de Presidente Prudente, Araçatuba, São José do Rio Preto e outras (TESSARIOLI, 1980).

A deterioração do tomate "in natura" pode ser devida a fatores físicos, ação de seus próprios ênzimos, ação

de microrganismos ou ação combinada desses fatores.

Os danos mecânicos, resultantes de cortes, machucaduras e manuseio inadequado, podem predispor a entrada e posterior desenvolvimento de microrganismos.

O manuseio impróprio e as condições inadequadas durante a colheita, transporte, armazenamento e venda do produto podem favorecer a deterioração.

O controle microbiológico do tomate "in natura" e de seus produtos derivados é de importância devido ao grande consumo dos mesmos.

O tomate pode ter uma flora microbiana variável, dependendo da condição física do fruto durante a colheita e transporte, da quantidade e tipo de solo aderente ao mesmo e do seu tempo de armazenamento.

A alteração microbiológica dos produtos de tomate industrializados está geralmente associada ao desenvolvimento de grupos específicos de microrganismos, tais como: *Lactobacillus*, *Bacillus*, leveduras e certos butíricos anaeróbicos (TANNER, 1950; JONES e FERGUSON, 1961), além de fungos.

Entre as bactérias esporogênicas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, que resistem mais ao calor e causam deterioração nestes produtos, a espécie mais importante é *Bacillus coagulans*. A sobrevivência desta bactéria em produtos

enlatados pode causar um sério problema de deterioração biológica, onde as extremidades das latas permanecem planas durante o "souring" ou acidificação, por fermentação de carboidratos, principalmente, açúcares, com produção de ácidos, porém, sem gases. Como a lata apresenta aparência normal, sem qualquer estufamento, o desenvolvimento desta bactéria não é facilmente perceptível, sendo detectado, inicialmente, pelo sabor, pH e odor do produto, seguido por testes diagnósticos com inclusão de exames microscópicos e de culturas.

Na indústria de enlatamento, a carga e o tipo de microrganismo presente no alimento determinam o tempo e a temperatura necessários para a esterilização comercial do mesmo, especialmente, se a contaminação introduz organismos deterioradores resistentes ao calor.

Embora o tomate "in natura" e seus produtos sejam ácidos, estão sujeitos à deterioração, se não apropriadamente manipulados e processados, pelas linhagens termo-resistentes de *Bacillus coagulans*, que sobrevivem ao processo térmico convencional.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a incidência de *Bacillus coagulans* e a contaminação bacteriana total em tomate na indústria, antes, durante e após o processamento, para que se pudesse aquilatar se as mesmas poderiam se constituir em problema para a conservação dos produtos de tomate.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Introdução

Durante um estudo sobre a coagulação de leite desidratado, HAMMER (1915), na Estação Experimental Agrícola de Iowa, isolou, pela primeira vez, um organismo que ele denominou *Bacillus coagulans* porque causou coagulação de leite enlatado, sem produção de gás. Esse microrganismo produziu cerca de 1% de ácido nas latas do leite enlatado.

A relação entre *Bacillus coagulans* e deterioração "flat-sour" não foi estabelecida senão vários anos após o trabalho original de HAMMER (1915).

CORDES (1928) relatou a ação de bactérias "flat-sour" na coagulação de leite desidratado. Ele atribuiu a deterioração ocorrida, após tratamento térmico, a *Bacillus coagulans*.

BERRY (1933), investigando o primeiro relato do surto de deterioração em suco de tomate, achou ser o organismo responsável uma bactéria esporogênica encontrada no solo. Baseado em sua natureza termofílica, sua tolerância ao calor e sua habilidade em crescer em produtos ácidos, aquele autor denominou este organismo de *Bacillus thermoacidurans*.

Posteriormente, BECKER e PEDERSON (1950) fizeram um cuidadoso estudo das duas espécies de *Bacillus* e concluíram que não havia justificativa em considerar *Bacillus thermoacidurans* como uma espécie distinta de *Bacillus coagulans*, sendo que este último nome tinha prioridade.

Donk, citado por FIELDS (1970) identificou *Bacillus stearothermophilus* como o típico deteriorador de vegetais com baixa acidez e *Bacillus coagulans* como o responsável pela deterioração "flat-sour" em produtos de tomate e leite.

A deterioração do suco de tomate enlatado comercialmente foi relatada pela primeira vez em 1931, segundo TROY e SCHENCK (1960). Desde esta data, surtos deste tipo de deterioração têm ocorrido quase anualmente, muitas vezes, alcançando sérias proporções e causando severos prejuízos econômicos para as fábricas de conservas, nos Estados Unidos.

Até hoje, não existem referências indicando que *Bacillus coagulans* seja de alguma maneira patogênico ou tóxico, porém, deteriora o produto em que se instala,

2.2. Características de *Bacillus coagulans*

São bastonetes móveis, apresentando muitos flagelos por célula. A reação de Gram é usualmente positiva (SPECK, 1976). Em meio NCA, após incubação a 37°C durante 48 horas, formam típicas colônias amarelas circulares e translúcidas no meio de cultura de cor violeta.

BECKER e PEDERSON (1950) reportaram que *Bacillus coagulans* não é obrigatoriamente termofílico, pois, é capaz de crescer a baixas temperaturas, como 18°C. Esse microrganismo cresce bem a temperaturas de 40°C a 60°C e sua temperatura ótima de crescimento varia de 45°C a 55°C. A temperatura máxima para crescimento varia para diferentes linhagens. Virtualmente, todas as linhagens podem crescer a 60°C, porém, algumas crescem pobremente a 55°C ou a temperaturas mais altas. Não há crescimento típico a 65°C, embora, crescimento a temperaturas de 63°C a 65°C tenha sido observado. O crescimento a temperatura ambiente é extremamente lento, muito lento a 25°C e bom a 30°C. A temperatura mais baixa na qual pode ocorrer crescimento apreciável está entre 25°C a 30°C.

GORDON e SMITH (1949) relataram que 53, de 73 culturas estudadas, cresceram a 28°C; 73 a 33°C, 37°C e 45°C; 72 a 50°C; 66 a 55°C, 23 a 60°C, e nenhuma a 65°C.

Os esporos de *Bacillus coagulans* apresentam baixa resistência ao calor quando comparados com esporos de

termófilos obrigatórios. SOGNEFEST e JACKSON (1947) afirmaram que a maioria das linhagens pode ser destruída em 0,7 minutos a 121°C . Atualmente, sabe-se que para um valor $D_{212} = 0,526$ minutos, a indústria usa um valor $F_{212}^{27} =$ minutos, que é mais que o necessário para atingir uma esterilização comercial. Mesmo assim, ainda há possibilidade de uma eventual deterioração.

BERRY (1933) indicou que a temperatura de 37°C parece ser ótima para a produção de "flavor" desagradável. A resistência térmica de esporos de *Bacillus coagulans* é maior em leite desidratado do que em suco de tomate. Esta diferença em resistência ao calor de produtos diversos deve ser mais aparente do que real, porque a influência do pH, lipídios, proteínas e outros constituintes alimentares não tem sido evidenciada. Entretanto, deve-se reconhecer que a resistência térmica dos esporos deste microrganismo pode variar muito com a idade, condições ambientais e linhagens individuais da bactéria.

Bacillus coagulans produz ácido, mas não gás, com glicose, sob condições aeróbicas, quando peptona é usada como fonte de nitrogênio (BREED *et alii*, 1929). Outros autores relataram, entretanto, que sob condições aeróbicas, glicose é convertida a dióxido de carbono, ácido acético e ácido lático e que, sob condições anaeróbicas, não há produção de gás, sendo o ácido lático, o principal produto.

RICE e PEDERSON (1954) mostraram que o pH é um fator significativo na habilidade de germinação de esporos e crescimento de *Bacillus coagulans*, em produtos de tomate. Estudando o efeito da concentração de esporos no crescimento de *Bacillus coagulans*, estes autores verificaram que a quantidade de ácido, que podia ser tolerada por este microrganismo, variou com a linhagem usada. Para uma baixa concentração de esporos (20 ou menos por ml de inóculo), somente 2, das 20 culturas usadas, foram capazes de crescer a pH 4,31 ou mais baixo. Utilizando outras linhagens de esporos de *Bacillus coagulans*, estes autores verificaram que milhões de esporos causaram deterioração em 25 a 33% das amostras de suco de tomate com pH 4,18, mas, a deterioração não foi observada a pH 4,1 ou mais baixo.

Bacillus coagulans cresce bem em meio artificial com valores de pH entre 5,0 e 7,0. PEDERSON e BECKER (1949) mostraram que muitas culturas, em sua forma vegetativa, podem crescer a valores tão baixos com pH 4,02. Em meio artificial, os esporos resistentes ao calor foram incapazes de germinar e crescer em pH abaixo de 5,0. Usando suco de tomate com vários valores de pH, estes pesquisadores mostraram que células vegetativas de mais de um terço de 22 linhagens de *Bacillus coagulans* cresceram e produziram um "flat-sour" típico no suco com um valor de pH de 4,21 ou mais baixo. Esporos das mesmas 22 linhagens não se desenvolveram no suco com pH inicial mais baixo que 4,32.

DESROSIER e HEILIGMAN (1956) verificaram que esporos de *Bacillus coagulans* foram capazes de germinar e crescer em suco de tomate, quando inoculados imediatamente após tratamento térmico, ou se o pH do suco fosse aumentado. Eles também constataram que esporos de *Bacillus coagulans* causaram deterioração em suco neutralizado com fosfato de potássio e ajustado ao seu pH original.

Bacillus coagulans é um dos organismos responsáveis pela deterioração "flat-sour" em alimentos, especialmente, em alimentos ácidos (pH 3,7 a 4,5). Entretanto, embora esta bactéria possa, eventualmente, causar deterioração em alimentos pouco ácidos, isto é muito raro devido a baixa resistência ao calor de seus esporos ao severo processo térmico dado a este tipo de alimento.

O "flavor" do suco de tomate deteriorado por esta bactéria tem sido descrito como "ácido", "rançoso", "fenólico", "medicinal" ou "amargo" e, geralmente, acompanhado por uma redução de 0,3 a 0,5 no pH (STERN *et alii*, 1942). O sabor desagradável pode, algumas vezes, ser detectado antes que qualquer mudança no pH seja evidenciada, e se desenvolver mais rapidamente em torno de 37°C,

Quando suco de tomate enlatado começou a ser produzido, o pH baixo e o enchimento da lata a quente (a temperatura de aproximadamente 100°C) foram considerados suficientes para produzir um produto comercialmente estéril. Os

esporos de *Bacillus coagulans*, entretanto, podem sobreviver a este tratamento térmico e causar deterioração. A acidificação do suco de tomate para pH 4,1 parece adequada para controlar crescimento na maioria dos casos. A baixa concentração de esporos e um pH de 4,3 em suco de tomate inibirão o crescimento da maioria das linhagens de *Bacillus coagulans*. A pré-esterilização por processo HTST (alta temperatura-curto tempo) é usada para controlar este tipo de determinação (DEFI-GUEIREDO e SPLITTSTOESSER, 1976).

É um fato aceitável que o pH é um fator predominante no desenvolvimento desta bactéria em suco de tomate. A faixa de pH normal de tal suco, de acordo com o "Canned Food Reference Manual" (1949), é de 3,8-4,5, em média, 4,2.

JONES e FERGSUON (1961), estudando tomates aspergidos com uma suspensão do *Bacillus coagulans*, em vários estágios do período de armazenamento, mostraram um aumento marcante na taxa de crescimento do organismo teste, coincidindo com a mudança no pH. Este aumento na taxa de crescimento ocorreu quando o pH alcançou 4,30 e continuou até o aparecimento de excessiva contaminação por fungos. Estas descobertas sugerem que tomates armazenados após a colheita, particularmente a temperaturas relativamente altas, deve ser um fator predominante no desenvolvimento de deterioração "flat-sour".

Uma vez que a acidez desempenha um papel importante no crescimento de *Bacillus coagulans* e no desenvolvimento da deterioração "flat-sour", JONES e FERGUSON (1961) estudaram a influência do pH de tomates, recentemente colhidos e de tomates armazenados por um período comparável àquele em que os tomates deveriam ser mantidos na fábrica. Dados sobre o pH de tomates durante 5 anos mostraram amplas variações em tomates frescos, dia após dia, durante o período de colheita. Houve também uma indicação que os tomates tornaram-se menos ácidos com o tempo.

Outros estudos de JONES e FERGUSON (1961) sobre o efeito do armazenamento de tomates antes do processamento mostraram que o pH médio aumentou de 4,25 para 4,77 durante 11 dias; a faixa de pH foi de 4,19-4,32 para 4,60-4,95. O pH médio aumentou de 4,41 para 4,77 do 6º para 11º dia. Estes valores de pH permitiram o rápido crescimento de *Bacillus coagulans*, com resultante deterioração "flat-sour". Durante este período o pH de alguns tomates alcançou um valor tão alto quanto 5,0.

YORK *et alii* (1974) mostraram a influência da concentração hidrogênio-iônica na germinação de esporos e crescimento de *Bacillus coagulans* em suco de tomate, após aquecimento a 90°C durante 30 minutos. A pH 4,81, a germinação e o crescimento foram definidos. Crescimento a outros ní

veis de pH foi questionado, mas, o exame microscópico confirmou crescimento e germinação de esporos em pH 4,81, 4,56 e 4,45. Para valores de pH 4,31 ou mais baixo, somente esporos foram observados.

Como vimos, a presença de esporos de *Bacillus coagulans* é de grande importância em produtos enlatados com pH 4,1 a 5,0, podendo induzir uma grave consequência econômica para a indústria, pois, evidenciando-se a deterioração todo o lote deve ser destruído.

2.3. Distribuição de esporos da bactéria "flat-sour"

2.3.1. Solo e água

MARSH e LARSEN (1953) estudaram isolados de bactérias das fontes quentes do Yellowstone National Park. Algumas cepas tinham características de ambos os *Bacillus*: *Bacillus coagulans* e *Bacillus stearothermophilus*.

Estudos de JONES e FERGUSON (1961), para determinar a incidência de bactérias "flat-sour" em tomates de diferentes áreas no Canadá, mostraram que este microrganismo estava presente em todas as áreas. De 268 amostras de água usadas na lavagem de tomates, 214 (80%) mostraram contagem de

100 esporos de *B. coagulans*, ou menos, por ml de água. Somente 12 amostras (4,5%) mostraram contagem de esporos acima de 500 por ml de água. Estes resultados sugerem que a concentração de esporos desta bactéria na água de lavagem dos tomates da fábrica não foi muito grande durante a ocasião em que o estudo foi realizado.

Desde que o "habitat" natural de *Bacillus coagulans* é o solo, compreende-se que o organismo seja carregado para a fábrica no solo aderido aos tomates.

Em um estudo com 41 amostras de solo das Ilhas Hawaianas, FIELDS (1968) verificou que todas as amostras analisadas continham bactérias esporogênicas, aeróbicas e termofílicas, embora o número de esporos encontrado tenha sido pequeno (geralmente menos que 100 esporos por grama).

2.3.2. Açúcar e amido

Em 1930, as discussões estavam centralizadas no fato do açúcar estar envolvido na deterioração de alimentos enlatados. INGERSOLL (1930) afirmou que o açúcar não era responsável pela introdução de bactérias termofílicas nos pro

cessos de enlatamento, sugerindo que a resposta provável e este problema era a falta de saneamento em tais processos.

CAMERON e BIGELOW (1931) estudaram bactérias termofílicas em açúcar e verificaram que o grupo "flat-sour" foi o mais frequentemente encontrado e que os esporos do "flat-sour" estavam presentes em todas as amostras de açúcar de cana analisadas.

O amido, assim como o açúcar, pode ser uma fonte de esporos de bactérias "flat-sour" em alimentos enlatados.

CLARK e TANNER (1937) verificaram que esporos do "flat-sour" foram os tipos predominantes em açúcar e amido. Em açúcar comercial, 72 amostras continham 0-75 esporos de bactérias "flat-sour", 13 amostras continham 75-150 esporos, e 6 amostras continham mais que 150 esporos por 10 gramas de açúcar. Em 20 amostras de amido, o conteúdo de esporos "flat-sour" foi 0-324 esporos por 10 gramas de amido, com uma média de 139 esporos por 10 gramas.

2.3.3. Ingredientes

RICHMOND e FIELDS (1966) fizeram um estudo de vários ingredientes alimentares com a finalidade de determinar a distribuição de bactérias esporogênicas, aeróbicas e termofílicas. Alguns dos ingredientes testados foram: açúcar mascavo, granulado e comum, amido de milho, farinha de aveia, amido de batata, especiarias, ervilha, cacau, gelatina e sopa desidratada.

A espécie de microrganismo mais encontrada foi *Bacillus coagulans*, estando presente em 14 dos 18 ingredientes testados.

2.3.4. Tomate e seus produtos

Bacillus coagulans tem sido isolado de tomate e seus produtos como; suco, purê, sopa, molhos, catchup etc. (SPECK, 1976).

HUSSEIN *et alii* (1979) fizeram um estudo para determinar o grau de contaminação bacteriológica na linha de processamento de tomate do Egito. Eles verificaram a presença de *Bacillus coagulans* entre outras espécies de *Bacillus*.

2.4. Controle

O solo é a fonte de *Bacillus coagulans* nos equipamentos de processamento. DOYLE *et alii* (1958), em um estudo sobre sanificação das instalações de enlatamento, encontraram que o solo nos campos de tomate continha muitos esporos termofílicos. Estes pesquisadores mostraram que havia uma relação bem definida entre a concentração de partículas de solo (em ppm) e o número de esporos "flat-sour" nos tanques de água onde os tomates permaneciam de molho. É importante, portanto, que uma fonte de água potável seja disponível para a lavagem dos tomates, e que os tanques e condutores de água tenham um suprimento adequado, adicionado a todo momento, para manter o número de esporos "flat-sour" tão baixo quanto possível.

YORK *et alii* (1962) e O'BRIEN *et alii* (1963) constataram que o aumento em número de bactérias do ácido láctico e fragmentos de fungo em tomates, após 24 horas de armazenagem, foi relacionado não somente à porcentagem de frutos partidos, mas também, a populações microbiológicas iniciais. Esta relação foi enfatizada por avaliações de tomates armazenados por 48 horas (O'BRIEN *et alii*, 1963).

O número de microrganismos pode ser reduzido a través de lavagem de tomates antes do transporte e armazenagem (YORK *et alii*, 1962; O'BRIEN *et alii*, 1963). A lavagem apenas com água, entretanto, não diminuiu a taxa de crescimento

to bacteriano durante armazenagem e forneceu um meio que facilitou o desenvolvimento de fungos (O'BRIEN *et alii*, 1963). Esta desvantagem foi superada pela lavagem com água clorada, reduzindo o número inicial de bactérias em aproximadamente 90% e retardando marcadamente o crescimento subsequente de ambos, bactérias e fungos (MERCER *et alii*, 1961; O'BRIEN *et alii*, 1963).

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Material

O material utilizado na análise constituiu-se de amostras de tomate provenientes de várias regiões tomateiras do Estado de São Paulo, coletadas antes e após a lavagem na linha de processamento, amostras de suco pré-aquecido antes da concentração e de polpas e extratos coletados semanalmente em uma indústria alimentícia no município de Botucatu.

3.2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram os seguintes:

- a. *Para contagem total de microrganismos:* Glicose Triptona Extrato de Levedura (GTY).

- Triptona	5,0 g
- Glicose	5,0 g
- Extrato de levedura	3,0 g
- Agar	15,0 g
- Água destilada	1000 ml

O pH foi ajustado a 7,0 e o meio esterilizado a 121°C por 15 minutos.

b. *Para contagem de Bacillus coagulans*; NCA-água

- Triptona	10,0 g
- Glicose	5,0 g
- Água	15,0 g
- Púrpura de Bromocresol 0,4%	10,0 g
- Água destilada	1000 ml

O pH foi ajustado a 6,7 e o meio esterilizado a 121°C por 15 minutos.

3.3. Métodos

3.3.1. Coleta das amostras

Visando a obtenção de dados mais representativos, a amostragem dos diferentes produtos analisados foi efe-

tuada semanalmente.

O transporte da lavoura para a indústria é feito por caminhões, sendo o tomate acondicionado em caixas de material plástico.

As amostras de tomate bruto foram coletadas, ao acaso, dos caminhões na indústria e colocadas em sacos plásticos para posterior análise microbiológica em laboratório.

As amostras de tomate lavado foram coletadas, ao acaso, da esteira de rolos giratórios, onde as impurezas aderidas aos frutos são retiradas através de aspersores de água, e colocadas em sacos plásticos da mesma forma que as amostras de tomate bruto.

As amostras de suco, polpa ou extrato foram coletadas na indústria em frascos Erlenmeyers esterilizados e tamponados com algodão.

As amostras de suco foram coletadas após as extratoras-refinadoras, onde o suco, após o tomate ter sido quebrado e pré-aquecido, é obtido pela trituração do tomate quebrado, extração e refinação do suco.

As amostras de polpa foram coletadas à saída dos concentradores, de onde a polpa sai com cerca de 22°Brix.

Após a concentração, a polpa pode ser embalada

e armazenada, ou então, diretamente transformada em produtos como extratos de diferentes concentrações e catchup.

As amostras de extrato foram coletadas após a adição e homogeneização dos ingredientes (sal - 1-3%), porém, antes do seu enlatamento.

3.3.2. Preparo das amostras

A análise microbiológica das amostras de tomate bruto e lavado foi feita utilizando-se almofariz com pistilo esterilizados, onde 10 g de diferentes frutos de cada coleta foram macerados sem adição de água. A seguir, adicionava-se 90 ml de água destilada esterilizada ao macerado, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Em seguida, foi feita a diluição em série das amostras com água destilada esterilizada até 10^{-5} , utilizada para se fazer a contagem total de microrganismos em meio GTY. Para a contagem total de *B. coagulans*, em meio NCA, foi utilizada a diluição 10^{-4} .

Para contagem total de esporos e contagem de esporos de *Bacillus coagulans* foi utilizada a diluição 10^{-1} depois de ter sido submetida ao choque térmico, visando ativar a germinação dos esporos e destruir células vegetativas.

No caso das amostras de suco, polpa ou extrato de tomate, os frascos Erlenmeyers, contendo esses produtos, fo

ram abertos em condições assépticas, depois de homogeneizados. A seguir, foi feita a diluição em série das amostras com água destilada esterilizada até 10^{-2} , que foi a diluição utilizada para a contagem total de microrganismos em GTY. Para a contagem total de *Bacillus coagulans*, em meio NCA, foi utilizada a diluição 10^{-1} .

Para a contagem total de esporos e contagem de esporos de *Bacillus coagulans* nestes produtos foi também utilizada a diluição 10^{-1} , depois de ter sido submetida ao choque térmico.

3.3.3. Contagem de *Bacillus coagulans* em tomate e produtos derivados

Através da distribuição das diluições apropriadas das amostras (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) em placas de Petri esterilizadas com meio NCA-ágar, indicado pela Nacional Canners' Association (1968), foi possível verificar a presença ou não de *Bacillus coagulans*, pois, quando este microrganismo está presente, ele germina e produz ácido, aparecendo na forma de colônias amarelas circulares e translúcidas, produzindo 1 halo amarelo sobre fundo roxo, após incubação a 45°C por 48 horas.

3.3.3.1. Contagem total

Foi feita a diluição em série das amostras (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) com água destilada esterilizada. A seguir, foi colocado, em duplicata, 1,0 ml da diluição apropriada com meio NCA liquefeito e resfriado a 45°C - 50°C em placas de Petri, previamente marcadas. O meio foi homogeneizado com movimentos rotativos em forma de oito, para distribuir uniformemente os microrganismos e permitir o resfriamento e a disposição do mesmo.

As placas de Petri foram incubadas a 45°C por 48 horas.

As colônias amarelas foram contadas e tidas como o número total de *Bacillus coagulans* por grama de material.

3.3.3.2. Contagem de esporos

Para a contagem de esporos, a diluição apropriada das amostras (10^{-1}) foi aquecida a 85°C por 10 minutos em banho-maria. Logo após o aquecimento, as amostras foram retiradas do banho-maria e colocadas imediatamente em banho de gelo. Esse choque térmico visa ativar a germinação dos esporos e destruir células vegetativas de microrganismos presentes. A seguir, 1,0 ml da diluição apropriada de cada

amostra foi colocado, em duplicata, em placas de Petri com meio NCA liquefeito a 45°C - 50°C. O meio foi homogeneizado para distribuição uniforme dos microrganismos, com movimentos horizontais em forma de oito.

As placas foram incubadas a 45°C por 48 horas. As colônias amarelas foram contadas e tidas com o número de esporos de *Bacillus coagulans* por grama de material.

OBS.: As amostras, depois de diluídas e colocadas, em duplicata, em placas de Petri com o meio NCA para verificar a presença ou não de *Bacillus coagulans*, foram incubadas a 45°C durante 48 horas, e não a 37°C como proposto inicialmente, pois, constatamos que essa temperatura parece ser adequada ao desenvolvimento de muitos microrganismos, que poderiam inibir o crescimento da bactéria em questão. Como sabemos, *Bacillus coagulans* apresenta uma temperatura ótima de crescimento em torno de 45°C, a qual não se mostra favorável ao desenvolvimento de outros microrganismos.

3.3.4. Contagem de microrganismos em tomate e seus produtos

3.3.4.1. Contagem total

Foi feita a diluição em série das amostras (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) com água destilada esterilizada. A seguir, foi colocado 1,0 ml da diluição apropriada em placas de Petri, previamente marcadas, com meio GTY liquefeito e resfriado a 45°C - 50°C . O meio foi também homogeneizado com movimentos rotativos em forma de oito.

As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

Todas as colônias foram contadas.

3.3.4.2. Contagem de esporos

Para a contagem de esporos, a diluição apropriada (10^{-1}) das amostras foi aquecida a 85°C por 10 minutos em banho-maria. Logo após o aquecimento, as amostras foram colocadas imediatamente em banho de gelo. A seguir, 1,0 ml da diluição apropriada de cada amostra foi colocado, em duplicata, em placas de Petri com meio GTY liquefeito a 45°C - 50°C . O meio foi homogeneizado para distribuição uniforme dos microrganismos, com movimentos horizontais em forma de oito.

.27.

As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

Todas as colônias foram contadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises microbiológicas realizadas em amostras de tomate e seus derivados indicam que embora esses produtos sejam ácidos, estão sujeitos à deterioração, pois, apresentam uma flora microbiana variável.

Os resultados referentes às contagens totais de microrganismos e de *Bacillus coagulans* encontram-se nas Tabelas 1 a 8. Os dados representam o número de microrganismos (média de duas placas) por grama da amostra. Os resultados da análise estatística constam da Tabela 9.

Pelos resultados podemos verificar que as amostras de tomate bruto apresentaram uma elevada contaminação total de microrganismos (um mínimo de $4,50 \times 10^5$ e um máximo de $114,00 \times 10^5$) por grama da amostra, enquanto as amostras de tomate lavado apresentaram maior contaminação total de es-

poros (de $7,50 \times 10^1$ a $831,00 \times 10^1$) por grama da amostra.

Quanto à incidência de *Bacillus coagulans*, verificamos que as amostras de tomate bruto mostraram maior tendência à contaminação com esta bactéria, tanto em contagem total (de 0,00 a $14,50 \times 10^4$) como em contagem de esporos (de 0,00 a $30,50 \times 10^1$) por grama da amostra, o que seria de se esperar. Nenhuma amostra de polpa apresentou ocorrência de *Bacillus coagulans* na contagem total, porém, algumas mostraram ocorrência de esporos (duas amostras: $1,00$ e $1,50 \times 10^1$ por grama da amostra). Por outro lado, as amostras de suco de tomate, que sofreram um pré-aquecimento, não apresentaram esporos, mas, pequena incidência de contaminação total de *Bacillus coagulans* (três amostras: $1,00$, $1,50$ e $6,00 \times 10^1$) por ml da amostra.

Os dados estatísticos mostram diferença significativa a nível de 1% de probabilidade entre as etapas de processamento para a contagem total de microrganismos, mas, não indicam variação entre as procedências das amostras. Para a contagem total de esporos não constatamos diferença significativa tanto entre etapas como entre procedências.

Na contagem total de *Bacillus coagulans*, os dados mostram que houve diferença ao nível de 1% de significância entre as etapas e de 5% entre as procedências, enquanto para a contagem de esporos desta bactéria, constatamos diferença significativa a nível de 5% entre as etapas de processaa

mento e de 1% entre as procedências das amostras.

De um modo geral, o número de microrganismos presentes nas amostras analisadas foi grande, inclusive em suco, polpa e extrato de tomate, indicando má qualidade da matéria-prima.

A incidência de *Bacillus coagulans* é baixa e de maneira a não preocupar, desde que o pH dos produtos seja mantido abaixo de 4,3, de preferência abaixo de 4,2, quando a bactéria em questão terá poucas chances de se multiplicar e causar deterioração em produtos de tomate.

Devido a grande variação na incidência de *Bacillus coagulans* e de microrganismos em geral, torna-se difícil concluir qual a região que apresentou maior ou menor contaminação, pois, muitos fatores podem ter influenciado, como por exemplo, condição física do fruto durante a colheita e transporte, quantidade e tipo de solo aderente ao mesmo e seu tempo de armazenamento.

No que concerne à intensidade de contaminação das amostras de tomate analisadas, verificamos que a contagem total de esporos foi mais elevada que a contagem de esporos de *Bacillus coagulans*. Isso era de se esperar, uma vez que a ocorrência de termófilos no ambiente é muito mais restrita que a de mesófilos. Além disso, a metodologia analítica empregada foi bastante seletiva e diferencial no caso de *Bacil-*

lus coagulans, o que não ocorreu para os outros tipos de microrganismos encontrados.

No que diz respeito à contaminação de produtos de tomate, a contagem total e de esporos foi mais reduzida, comparativamente à registrada nas matérias-primas, o que também seria de se esperar, uma vez que esses produtos já foram submetidos à seleção e lavagem, além de uma sanificação ao longo do processamento.

O transporte do tomate da lavoura para a indústria é efetuado, muitas vezes, em condições inadequadas, não oferecendo muita proteção ao fruto quanto à poeira e ao calor, especialmente se o local de produção é muito distante da indústria.

Geralmente, o tomate fica sujeito às altas temperaturas reinantes (conforme a época do ano), acelerando seu metabolismo e com isso provocando uma diminuição na consistência do fruto. Além disso, o calor propicia ao desenvolvimento de microrganismos.

O acondicionamento do tomate em caixas de material plástico, em quantidades que excedem a capacidade das mesmas, faz com que haja compressão dos frutos, rompendo-se muitos deles. Este rompimento provoca não só o escoamento de suco, como também, fermentação parcial do mesmo. Além disso, o contacto de frutos sadios com outros danificados propicia

uma maior contaminação fúngica e bacteriana da matéria-prima e das caixas.

Essas considerações deixam evidente a importância das operações de seleção e lavagem da matéria-prima por ocasião da recepção na unidade de processamento, no sentido de se eliminar frutos danificados ou em processo de decomposição, bem como, assegurar a remoção de terra e resíduos aderentes.

TABELA 1. Contagem de microrganismos (contagem total e contagem de esporos) em tomate bruto, sem lavar por grama de material.

Amostra	procedência	CT ($\times 10^5$)	CE ($\times 10^1$)
1	Bauru	47,45	163,00
2	Bauru	46,90	incontável*
3	Gabriel Monteiro	74,90	incontável*
4	Gabriel Monteiro	63,95	incontável*
5	São Manoel	29,75	70,50
6	Bauru	45,40	57,00
7	São Manoel	40,25	43,50
8	São Manoel	21,90	34,50
9	São Manoel	20,65	13,50
10	Cerqueira César	28,00	18,00
11	Cerqueira César	26,15	19,00
12	Bauru	43,50	61,00
13	Gabriel Monteiro	78,95	incontável*
14	São Manoel	31,25	59,50
15	São Manoel	29,50	32,00
16	Itatinga	11,25	22,00
17	Birigui	7,95	49,00
18	Presidente Prudente	57,25	39,50
19	Birigui	24,70	45,00
20	Clementina	59,80	52,00
21	Coroados	4,50	21,00
22	Birigui	17,90	87,00
23	Narandiba	101,50	74,50
24	Coroados	39,25	32,00
25	Lucélia	48,40	59,00
26	Narandiba	14,00	17,50
27	Coroados	114,00	23,00
28	Salmourão	90,00	26,00
29	Birigui	18,30	70,00
30	Coroados	21,70	24,00
Média		$41,96 \times 10^5$	$40,43 \times 10^1$

* presença de uma colônia grande invadindo toda a placa.

TABELA 2. Contagem de *Bacillus coagulans* (contagem total e contagem de esporos) em tomate bruto por grama da amostra.

Amostra	procedência	CT	CE
1	Bauru	1,00	4,00
2	Bauru	-	-
3	Gabriel Monteiro	-	-
4	Gabriel Monteiro	-	-
5	São Manoel	-	-
6	Bauru	-	-
7	São Manoel	5,50	30,50
8	São Manoel	-	-
9	São Manoel	-	-
10	Cerqueira César	-	1,00
11	Cerqueira César	-	-
12	Bauru	-	-
13	Gabriel Monteiro	1,00	5,00
14	São Manoel	-	-
15	São Manoel	4,00	11,00
16	Itatinga	-	-
17	Birigui	-	-
18	Presidente Prudente	-	-
19	Birigui	-	-
20	Clementina	1,30	-
21	Coroados	2,75	-
22	Birigui	9,50	3,50
23	Narandiba	14,50	1,00
24	Coroados	1,00	-
25	Lucélia	3,00	-
26	Narandiba	-	-
27	Coroados	-	-
28	Salmourão	-	-
29	Birigui	-	-
30	Coroados	-	-
Média		$1,45 \times 10^4$	$1,86 \times 10^1$

- ausência de *Bacillus coagulans*.

TABELA 3. Contagem de microrganismos (contagem total e contagem de esporos) em tomate lavado por grama da amostra.

Amostra	procedência	CT ($\times 10^5$)	CE ($\times 10^1$)
1	Bauru	33,65	61,00
2	Bauru	38,15	831,00
3	Gabriel Monteiro	66,40	538,50
4	Gabriel Monteiro	50,25	incontável*
5	São Manoel	12,55	30,00
6	Bauru	30,65	40,00
7	São Manoel	29,00	38,00
8	São Manoel	18,60	25,00
9	São Manoel	17,50	7,50
10	Cerqueira César	10,05	15,50
11	Cerqueira César	9,70	17,00
12	Bauru	37,90	49,00
13	Gabriel Monteiro	68,40	25,00
14	São Manoel	22,30	40,00
15	São Manoel	19,90	17,00
16	Itatinga	9,80	12,00
17	Birigui	3,70	19,50
18	Presidente Prudente	38,90	37,00
19	Birigui	8,40	26,50
20	Clementina	36,55	48,50
21	Coroados	2,05	10,00
22	Birigui	12,40	27,00
23	Narandiba	90,00	67,00
24	Coroados	20,65	29,50
25	Lucélia	25,85	47,00
26	Narandiba	9,15	7,50
27	Coroados	99,00	11,00
28	Salmourão	59,00	21,00
29	Birigui	8,70	11,00
30	Coroados	11,40	11,00
Média		$30,01 \times 10^5$	$70,65 \times 10^1$

* presença de uma colônia grande invadindo toda a placa.

TABELA 4. Contagem de *Bacillus coagulans* (contagem total e contagem de esporos) em tomate lavado por grama da amostra.

Amostra	procedência	CT	CE
1	Bauru	1,00	-
2	Bauru	-	-
3	Gabriel Monteiro	-	6,50
4	Gabriel Monteiro	-	-
5	São Manoel	-	-
6	Bauru	-	-
7	São Manoel	4,00	23,00
8	São Manoel	-	-
9	São Manoel	-	-
10	Cerqueira César	-	-
11	Cerqueira César	-	-
12	Bauru	-	-
13	Gabriel Monteiro	1,00	3,50
14	São Manoel	-	-
15	São Manoel	2,00	5,50
16	Itatinga	-	1,00
17	Birigui	-	-
18	Presidente Prudente	-	-
19	Birigui	-	-
20	Clementina	4,00	1,00
21	Coroados	-	-
22	Birigui	-	-
23	Narandiba	9,00	-
24	Coroados	1,50	-
25	Lucélia	2,00	-
26	Narandiba	13,00	-
27	Coroados	-	-
28	Salmourão	-	-
29	Birigui	-	-
30	Coroados	-	-
Média		$1,25 \times 10^4$	$1,35 \times 10^1$

TABELA 5. Contagem de microrganismos (contagem total e contagem de esporos) em suco de tomate pré-aquecido por ml da amostra.

Amostra	procedência	CT ($\times 10^2$)	CE ($\times 10^1$)
1	Bauru	14,25	24,00
2	Bauru	16,45	126,00
3	Gabriel Monteiro	2,90	2,00
4	Gabriel Monteiro	52,45	191,50
5	São Manoel	8,00	20,00
6	Bauru	39,30	38,00
7	São Manoel	1,90	incontável*
8	São Manoel	33,50	66,50
9	São Manoel	7,65	33,50
10	Cerqueira César	8,40	26,00
11	Cerqueira César	7,80	14,50
12	Bauru	9,10	18,00
13	Gabriel Monteiro	24,40	34,50
14	São Manoel	11,00	29,00
15	São Manoel	8,90	14,00
16	Itatinga	7,90	53,50
17	Birigui	11,10	51,50
18	Presidente Prudente	9,50	23,00
19	Birigui	9,00	15,00
20	Clementina	9,80	4,00
21	Coroados	12,15	69,00
22	Birigui	29,70	18,50
23	Narandiba	34,10	19,00
24	Coroados	19,80	32,50
25	Lucélia	19,00	30,00
26	Narandiba	11,50	33,00
27	Coroados	7,70	27,00
28	Salmourão	16,50	66,00
29	Birigui	9,90	20,50
30	Coroados	14,05	29,00
Média		15,59 $\times 10^2$	37,3 $\times 10^1$

* presença de uma colônia grande invadindo toda a placa.

TABELA 6. Contagem de *Bacillus coagulans* (contagem total e contagem de esporos) em suco de tomate pré-aquecido por ml da amostra.

Amostra	Procedência	CT	CE
1	Bauru	-	-
2	Bauru	-	-
3	Gabriel Monteiro	-	-
4	Gabriel Monteiro	-	-
5	São Manoel	-	-
6	Bauru	-	-
7	São Manoel	-	-
8	São Manoel	-	-
9	São Manoel	-	-
10	Cerqueira César	-	-
11	Cerqueira César	-	-
12	Bauru	-	-
13	Gabriel Monteiro	-	-
14	São Manoel	-	-
15	São Manoel	-	-
16	Itatinga	-	-
17	Birigui	-	-
18	Presidente Prudente	-	-
19	Birigui	1,0	-
20	Clementina	-	-
21	Coroados	1,50	-
22	Birigui	6,00	-
23	Narandiba	-	-
24	Coroados	-	-
25	Lucélia	-	-
26	Narandiba	-	-
27	Coroados	-	-
28	Salmourão	-	-
29	Birigui	-	-
30	Coroados	-	-
Média		$0,28 \times 10^1$	-

TABELA 7. Contagem de microrganismos (contagem total e contagem de esporos) em extrato ou polpa de tomate por grama da amostra.

Amostra	procedência	CT ($\times 10^2$)	CE ($\times 10^1$)
1	Bauru	2,45	2,50
2	Bauru	57,20	151,50
3	Gabriel Monteiro	52,65	140,00
4	Gabriel Monteiro	incontável*	incontável*
5	São Manoel	incontável*	incontável*
6	Bauru	46,25	27,50
7	São Manoel	1,60	5,50
8	São Manoel	16,75	24,00
9	São Manoel	7,70	9,00
10	Cerqueira César	30,75	180,50
11	Cerqueira César	28,90	59,50
12	Bauru	38,50	55,00
13	Gabriel Monteiro	58,20	incontável*
14	São Manoel	10,20	22,50
15	São Manoel	9,50	15,00
16	Itatinga	6,70	35,00
17	Birigui	20,70	69,00
18	Presidente Prudente	24,80	19,50
19	Birigui	15,60	49,50
20	Clementina	22,35	82,00
21	Coroados	18,10	45,00
22	Birigui	38,25	34,50
23	Narandiba	2,75	55,00
24	Coroados	18,40	60,00
25	Lucélia	19,70	90,00
26	Narandiba	10,25	60,00
27	Coroados	14,80	38,00
28	Salmourão	38,00	55,00
29	Birigui	19,90	56,00
30	Coroados	15,90	39,50
Média		$21,56 \times 10^2$	$49,35 \times 10^1$

* presença de uma colônia grande invadindo a placa.

TABELA 8. Contagem de *Bacillus coagulans* (contagem total e contagem de esporos) em extrato ou polpa de tomate por grama da amostra.

Amostra	procedência	CT	CE
1	Bauru	-	-
2	Bauru	-	-
3	Gabriel Monteiro	-	-
4	Gabriel Monteiro	-	-
5	São Manoel	-	-
6	Bauru	-	-
7	São Manoel	-	-
8	São Manoel	-	-
9	São Manoel	-	-
10	Cerqueira César	-	-
11	Cerqueira César	-	-
12	Bauru	-	-
13	Gabriel Monteiro	-	-
14	São Manoel	-	-
15	São Manoel	-	-
16	Itatinga	-	-
17	Birigui	-	-
18	Presidente Prudente	-	-
19	Birigui	-	-
20	Clementina	-	1,00
21	Coroados	-	1,50
22	Birigui	-	-
23	Narandiba	-	-
24	Coroados	-	-
25	Lucélia	-	-
26	Narandiba	-	-
27	Coroados	-	-
28	Salmourão	-	-
29	Birigui	-	-
30	Coroados	-	-
Média		-	$0,08 \times 10^1$

TABELA 9. Análise estatística.

FV	GL	QM			
		Microorganismos Gerais		<i>Bacillus coagulans</i>	
		CT	CE	CT	CE
E. Etapas	3	1,015348**	0,019883 ^{ns}	0,300016**	0,229778*
E. Procedências	29	0,204075 ^{ns}	0,289244 ^{ns}	0,103314*	0,110568**
Resíduo	87	0,110020	0,306033	0,050579	0,051864
Médias		1,3008	1,4211	0,1100	0,0861
C.V. (%)		25,5	38,9	204,4	264,5

ns = não significativo

** = 1% de significância

* = 5% de significância.

5, CONCLUSÕES

a. As amostras de tomate e seus produtos apresentaram uma carga microbiana variável.

b. De um modo geral, o número de microrganismos presente nas amostras das várias fases da industrialização foi grande.

c. Houve uma sensível variação nos níveis de contaminação nos diferentes produtos examinados.

d. Não se pôde concluir qual a região tomateira que apresentou maior ou menor contaminação.

e. A incidência de *Bacillus coagulans* foi considerada ser baixa no Estado de São Paulo.

f. Entre as amostras analisadas, as de tomate bruto apresentaram maior incidência de *Bacillus coagulans*,

tanto em contagem total como em contagem de esporos, além de maior contaminação total de microrganismos.

g. A contagem total e contagem de esporos totais em tomates foi maior que nos produtos de tomate.

h. A contagem total de esporos foi maior que a contagem de esporos de *Bacillus coagulans* nas amostras analisadas.

6. LITERATURA CITADA

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1982. Secretaria de Planejamento da Presidência da República. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE.

BECKER, M.E. e C.S. PEDERSON, 1950. The physiological characters of *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*). J. Bacteriol. 59(6): 717.

BERRY, R.N., 1933. Some new heat resistant, acid tolerant organisms causing spoilage in tomato juice. J. Bacteriol. 25: 72-73.

BREED, R.S., P.S. PRICKETT, M.W. YALE, 1929. The significance of thermophilic spore-forming bacteria in pasteurized milk. J. Bacteriol. 17: 37-38.

CAMERON, E.J. e W.D. BIGELOW, 1931. Elimination of thermophilic bacteria from sugar. Ind. Eng. Chem. 23: 1330-1333.

CANNED FOOD REFERENCE MANUAL, 1949. Third Edition. American Can Co. 524.

CLARK, F.M. e F.W. TANNER, 1937. Thermophilic canned-food spoilage organisms in sugar and starch. Food Res. 2:27-39.

CORDES, W.A., 1928. Bacterial action in the coagulation of evaporated milk. J. Dairy Sci., 11: 46-51.

DEFIGUEIREDO, P.M. e F.D. SPLITTSTOESSER, 1976. Food Microbiology. The Avi Publishing Company, INC. Westport, Connecticut.

DESROSIER, N.W. e F. HEILIGMAN, 1956. Heat activation of bacterial spores. Food Res. 21: 54-62.

DOYLE, E.S., W.A. MERCER, J.N. DEMSEY, C.W. BOHRER e J. YESSAIR, 1958. Sanitation of canning equipment. Natl. Canners' Assoc. Inform. Letter, 56-61.

FIELDS, M.L., 1968. Thermophilic aerobic spore-forming bacteria in Hawaiian soils. Unpublished data, University of Missouri, Columbia, Missouri.

FIELDS, M.L., 1970. The flat sour bacteria. In: Advances in Food Research, 18, Academic Press, New York. 322 p.

GORDON, R.E. e R.N. SMITH, 1949. Aerobic spore forming bacteria capable of growth at high temperatures. J. Bacteriol. 58: 327-341.

HAMMER, B.W., 1915. Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk. Iowa. State Coll. Agr. Expt. Sta., Res. Bull. 19.

HANSEN, P.A., 1932. The public significance of the growth of thermophilic bacteria in pasteurized milk. N.Y. State Agr. Expt. Sta. (Geneva, N.Y.), Tech. Bull. 196.

HUSSEIN, M.F.; H.A. KHALAF; EL SAMKARY e H. EL. MANSY, 1979. Studies on bacterial - *Bacillus* species - contamination of Egyptian tomato processing as canned tomatoes concentrate, sterilized and half sterilized (En). Cairo (Egypt). 14 p. Research Bulletin, Faculty of Agricultural nº 1138.

HUSSONG, R.V. e B.W. HAMMER, 1928. A thermophile coagulating milk under practical conditions. J. Bacteriol. 15: 179-188.

INGERSOLL, C.D., 1930. Thermophiles in sugar. Food Ind., 2: 325.

JENKINS, J.A., 1948. The origin of the cultivated tomato. Economic Botany, 2: 379-392.

- JONES, A:H. e E.W. FERGUSON, 1961. Factors affecting the development of *Bacillus coagulans* in fresh tomatoes and in canned tomato juice. Food Technol. 15: 107-110.
- MARSH, C.L. e D.H. LARSEN, 1953. Characterization of some thermophilic bacteria from the hot springs of Yellowstone National Park. J. Bacteriol. 65: 193-197.
- MERCER, W.A., W. ROSE e J. CHAMPMAN, 1961. Comparative spore and breakage data for mechanically harvested tomatoes. N.C.A. Progress Report.
- MINAMI, K., 1980. The history of tomato production for industry in South America, Acta Horticultura, 100: 87-92.
- NATIONAL CANNERS' ASSOCIATION, 1968. "Sanitation for the Food Preservation Industries". Mc Graw-Hill, New York.
- O'BRIEN, M., G.K. YORK e S.L. LEONARD, 1963. Effect of bulk handling on canning tomatoes, Food Technol. 17, 1050.
- PEDERSON, C.S. e M.E. BECKER, 1949. Flat sour spoilage of tomato juice, N.Y. State Agr. Expt. Sta. (Geneva, N.Y.), Tech. Bull., 287.
- RICE, A.C. e C.S. PEDERSON, 1954. Factors influencing growth of *Bacillus coagulans* in canned tomato juice, Food Res. 19: 124-133.

- RICHMOND, B. e M.L. FIELDS, 1966. Distribution of thermophilic aerobic spore-forming bacteria in food ingredients. Appl. Microbiol. 14: 623-626.
- RICK, C.M., 1967. Fruit and pedicel characteristics derived from Galapagos tomato. Economic Botany, 21: 171-184.
- SMITH, N.R., R.E. GORDON e F.E. CLARK, 1952. Aerobic spore forming bacteria. U.S. Dept. Agr., Agr. Monograph nº 16.
- SOGNEFEST, P. e M.J. JACKSON, 1947. Presterilization of canned tomato juice. Food Technol. 1: 78-84.
- SPECK, U.R., 1976. Aciduric Flat Sour Sporeformers. Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 248-253.
- STERN, R.M., C.P. HEGARTY e O.B. WILLIAMS, 1942. Detection of *Bacillus thermoacidurans* (Berry) in tomato juice and successful cultivation of the organism in the laboratory. Food Res., 7: 186-191.
- TANNER, F.W., 1950. Laboratory Manual and Work Book in Microbiology of Foods. The Garrard Press, Champaign, Illinois.
- TESSARIOLI NETO, J., 1980. Assistência Técnica. Plano Nacional do Tomate. Seminário realizado em Presidente Prudente, 18 a 19 de setembro de 1980.

TROY, V.S. e A.M. SCHENCK, 1960. "Flat sour spoilage of tomato juice", Continental Can. Co., Chicago, Illinois.

YORK, G.K., S.L. LEONARD, J.H. Mac GILLIVRAY, M. O'BRIEN, D. TOMBROPOULOS e G. ROWE, 1962. Effect of mechanical harvesting and bulk handling on the quality of processing tomatoes. Univ. Calif. (Davis) Progress Report.

YORK, G.K., R.J. HEIL, L.G. MARSH, A. ANSAR, L.R. MERSON, T. WOLCOTT e S. LEONARD, 1974. Thermobacteriology of canned whole peeled tomatoes. J. Food, Sci., 40: 764-769.