



1150001544

T/UNICAMP
M382e
BCCL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

EFEITO DE DIVERSOS FATORES NA RECUPE
RAÇÃO DE ESPOROS ATIVADOS DE BACILLUS
COAGULANS

Por Pilar Rodríguez de Massaguer

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

ORIENTADOR:

Prof. Fumio Yokoya

Campinas
São Paulo - Brasil
Maio de 1977.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais

EULOGIO e ESPAÑA

Í N D I C E

| | Página |
|---|--------|
| Resumo | I |
| Summary | II |
| Introdução | 1 |
| Revisão Bibliográfica | |
| 1. Influência de iônios sobre a resistência térmica ... | 3 |
| 2. Efeito do meio de subcultura sobre a resistência térmica | 6 |
| 3. Transformação de esporos a células vegetativas | 10 |
| 3.1. Dormência | 10 |
| 3.2. Ativação | 11 |
| 3.2.1. Efeitos da ativação | 11 |
| 3.2.2. Fatores que influem no tempo de ativação | 14 |
| 3.2.3. Métodos de ativação de esporos bacterianos | 14 |
| 3.2.4. Métodos para medir a ativação | 15 |
| 3.2.5. Efeito de iônios na ativação | 15 |
| 3.3. Germinação | 17 |
| 3.3.1. Definição | 17 |
| 3.3.2. Mudanças produzidas no esporo durante a germinação | 17 |
| 3.3.3. Métodos para determinar a germinação ... | 19 |
| 3.3.4. Classificação da germinação | 20 |
| 3.3.5. Germinação fisiológica de esporos de <u>Bacillus</u> | 21 |

| | Página |
|---|--------|
| 3.3.6. Germinação química | 23 |
| 3.3.7. Efeito de iônios na germinação de esporos | 24 |
| 3.4. Crescimento pós-germinativo | 26 |
| 3.4.1. Definição | 26 |
| 3.4.2. Fases e mudanças do crescimento pós-germinativo | 27 |
| 3.4.3. Efeito de iônios no crescimento pós-germinativo | 28 |
| Material e Métodos | |
| Bactéria | 30 |
| Material | 30 |
| Métodos | 31 |
| 1. Teste de crescimento em diferentes meios | 31 |
| 2. Produção, colheita e limpeza de esporos | 32 |
| 3. Contagem de esporos | 34 |
| 4. Determinação da resistência térmica de <u>Bacillus coagulans</u> 56-186 A a 93°C | 38 |
| 5. Teste de anaerobiose | 39 |
| 6. Determinação da influência da adição de 1,5% de ágar ao meio DTB, sobre o número de tubos positivos obtidos na contagem por NMP | 40 |
| 7. Determinação da influência da variação da concentração de ágar adicionado ao meio DTB | 40 |
| 8. Determinação do efeito da adição de amido, EDTA, extrato solúvel de ágar, extrato solúvel calcinado de ágar, e ágar lavado ao meio DTB | 41 |
| 9. Determinação da germinação de esporos de <u>Bacillus coagulans</u> 56-186A. | 42 |

| | Página |
|--|--------|
| 10. Determinação do efeito da adição de catiônios e aniônios ao meio DTB | 46 |
| 11. Teste para estabelecer o efeito da variação da quantidade de Fe ⁺⁺ adicionado ao meio de subcultura | 47 |
| Resultados e Discussão | |
| 1. Características da cultura e esporulação | 49 |
| 2. Contagem de sobreviventes e resistência aparente .. | 51 |
| 3. Efeito do ágar na recuperação de esporos | 55 |
| 4. Efeito da adição de substâncias quelantes, adsorventes e derivados de ágar | 58 |
| 5. Agente estimulante no aumento da contagem | 60 |
| 6. Efeito dos iônios na germinação e crescimento pós-germinativo | 64 |
| Bibliografia | 71 |
| Apêndice Nº 1 Composição dos meios | 81 |

R E S U M O

Verificou-se que o meio caldo de glicose tripto na (DTB), falhava na recuperação de pequenas populações de esporos ativados, quando utilizado para subcultura de Bacillus coagulans 56-186A, usando a técnica do número mais provável (NMP) para a contagem. Tais populações foram detectadas pelo meio glicose, triptona ágar em placas de Petri.

A adição de 1,5% de ágar ao meio DTB produziu um aumento na capacidade recuperadora dos esporos em suspensão e no valor D sugerindo um efeito estimulante do ágar, na recuperação de esporos tratados com calor. Este mesmo efeito foi observado quando se usou suco de tomate 1:1 como meio de aquecimento.

Testou-se a adição de extrato solúvel de ágar, extrato solúvel calcinado de ágar, ágar nobre lavado, amido e ácido etileno diaminotetracético (EDTA) ao meio DTB, não se detectando nenhum efeito estimulante sobre a recuperação de esporos ativados, em todos os casos, com exceção da adição de extrato solúvel de ágar.

Investigou-se o efeito, sobre a contagem de esporos ativados, da adição de diferentes iônios (Ca^{++} , Ba^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} , Pb^{++} , Cr^{+6} , Fe^{++} , Fe^{+++} , SO_4^-) nas proporções em que esses se encontravam no ágar. Apenas o Fe^{++} , na forma de sulfato ferroso mostrou um efeito estimulante.

Determinou-se a germinação de esporos nos meios DTB mais extrato solúvel de ágar equivalente a 1,5% de ágar, e DTB mais Fe^{++} equivalente a 5 ppm no ágar, estabelecendo-se que a germinação dos esporos foi similar nos três meios e concluindo-se que o efeito estimulante da adição de extrato solúvel de ágar e Fe^{++} ao meio DTB, sobre a recuperação, não ocorre na fase de germinação senão no crescimento pós-germinativo.

S U M M A R Y

Dextrose Triptone Broth (DTB) failed to recuperate low populations of activated spores, when used for subculturing Bacillus coagulans 56-186A, employing the most probable number technique (NMP) for counting. These populations were readily detected on Dextrose Triptone Agar (DTA) in Petri dishes.

The addition of 1.5% agar to DTB produced an increase in the ability of recuperating spores in diluted suspension, and on D value, suggesting a stimulating effect of agar on the recuperation of heat treated spores. The same effect was observed when tomato juice 1:1 was used as heating medium.

The addition of soluble agar extract, calcinated soluble agar extract, washed noble agar, starch and EDTA to DTB medium was tested; no stimulating effect on the recuperation of spores was detected except for the addition of the soluble agar extract.

The effect on activated spore count of various ions, (Ca^{++} , Ba^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} , Pb^{++} , Cr^{+6} , Fe^{++} , Fe^{+++} , $\text{SO}_4^{=}$) added to DTB in corresponding amounts to those present in agar was investigated. Only Fe^{++} , added as ferrous sulfate showed stimulating effect.

Spore germination was determined on DTB, DTB plus soluble agar extract equivalent to 1.5% agar, and DTB plus Fe^{++} , equivalent to 5 ppm in agar. The spores showed similar germination on the three media. It was concluded that the stimulant effect on spore recuperation does not occur on germination but on outgrowth.

I N T R O D U Ç Ã O

A avaliação da efetividade de um tratamento térmico na destruição de esporos bacterianos, depende geralmente em se determinar a viabilidade dos esporos sobreviventes, após a inoculação em um meio propício para o crescimento.

Fazer subcultura é uma maneira indispensável para se investigar problemas de contaminação, estudar suas causas e determinar a esterilidade de um alimento enlatado. Mas, para se estabelecer conclusões significativas a respeito, dever-se-á conhecer com certeza, a habilidade do meio de subcultura, para suportar as diferentes fases do desenvolvimento do microrganismo em questão, bem como a sua capacidade em detectar baixas populações, as quais são de ocorrência mais provável.

Visto que não há um meio único que suporte o crescimento de todas as bactérias, nem há um acordo universal sobre qual é o melhor meio para subcultura de uma determinada classe de microrganismo, o microbiólogo baseia a sua escolha entre aqueles que são tradicionalmente usados pelos pesquisadores, ou então aqueles recomendados por organismos especializados, tanto estes sejam de caráter oficial ou privado.

O problema surge quando ao empregar um meio assim recomendado e comumente usado para subcultura de um determinado tipo de microrganismo, este meio falha na sua habilidade de recuperação. Embora se possam utilizar outros meios que não apresentem tal deficiência, deve-se considerar que o emprego do meio deficiente em determinações de resistência térmica e esterilidade de alimentos poderia levar a conclusões errôneas, sempre detectando populações inferiores às realmente existentes. Na literatura descrevem-se estudos sobre deficiências de meios (Evancho e outros, 1974; Nelson, 1943; Ashton e outros, 1968).

Pelas razões acima descritas, e após constatar-que o meio caldo de glicose triptona (DTB) usado comumente-para subcultura de termófilas obrigatórias e as facultativas, falhava em detectar baixas populações de esporos ativados de Bacillus coagulans 56-186A, decidimos iniciar esta pesquisa com a finalidade de investigar e identificar o (s) componente (s) responsável (eis) pela deficiência deste meio e determinar se este (s) composto (s) afeta (m) a germinação ou o crescimento pós-germinativo.

Acreditamos que o conhecimento e o estudo dos requerimentos nutricionais para a transformação de esporos, a célula vegetativa conduz a determinação de meios ótimos e a identificação de compostos estimulantes e inibidores dessa transformação. Em particular os compostos inibidores podem ter uma subsequente aplicação no controle microbiológico, como aditivos para a detenção da germinação ou do crescimento pós-germinativo de bactérias esporuladas. Por outro lado a presença de compostos estimulantes no produto alimentício poderia facilitar a passagem de esporo a célula vegetativa, desencadeando o processo de crescimento do microrganismo, deteriorando o produto.

1.- INFLUÊNCIA DE IÔNIOS SOBRE A RESISTÊNCIA TÉRMICA

A influência de iônios sobre a resistência térmica de esporos tem sido investigada por vários autores sob diferentes aspectos. Alguns como Alderton, Thompson & Snell (1964) e Murrell & Warth (1965) tem relacionado a resistência com a composição iônica dos esporos. Outros tem relacionado a presença ou ausência de iônios, na sua maioria catiônios bivalentes, no meio de esporulação, com a resistência térmica, tais como Williams (1929), Tallentire & Chiori (1973), El-bisi e outros (1962). Outros como Frank (1955), Sugiyama (1951) e Anderson, Esselen & Fellers (1949) estudaram a influência de catiônios no meio de aquecimento de esporos. Um último grupo de pesquisadores relativamente-pequeno, tem investigado a ação de iônios no meio de subcultura. Este último aspecto será discutido separadamente.

Em 1940, McCalla postulou que como as bactérias possuem grande área superficial em relação ao seu volume e que esta superfície tem uma carga eletrostática negativa, é possível que iônios carregados positivamente sejam atraídos das imediações de acordo com as leis da físico-química. A propriedade dos esporos de intercambiar catiônios foi demonstrada por Alderton e outros (1964). Esses autores indicaram que o estado iônico dos esporos pode afetar a sua resistência térmica e suas respostas a germinação.

Slepecky & Foster (1959) estudaram o conteúdo de metal dos esporos de B. megaterium e seu efeito sobre algumas de suas propriedades, encontrando que a resistência térmica depende de um alto conteúdo de iônios metálicos, notavelmente Ca^{++} . Murrell & Warth (1965) também relacionaram a composição iônica com a resistência, concluindo que esporos de várias espécies que diferem em conteúdo de catiônios, em especial na relação Ca^{++}/Mg^{++} , diferem significativamente em suas propriedades de resistência térmica.

Fields, Chen Lee & Wang (1974) relacionaram os constituintes do solo aonde foram encontrados esporos de B. stearothermophilus, com a resistência térmica. Relataram - que as contagens de esporos e a resistência térmica eram cor relacionados positivamente com Mn^{++} , Ca^{++} e $PO_4^{=}$, analisados no solo de onde os esporos eram contados. Williams (1929) relatou que esporos de B. subtilis em concentrações adequadas de Mg^{++} no meio de esporulação, eram altamente resistentes. Esporos mais resistentes que o normal foram obtidos com adição de Ca^{++} e Fe^{++} ao meio.

Tallentire & Chiori (1963) conduziram experimentos com esporos de B. megaterium usando meio de esporulação contendo como únicos catiônios bivalentes Mg^{++} e Fe^{++} . A esse meio, adicionaram Mn^{++} e Ca^{++} juntos ou separadamente ou também Mn^{++} e/ou substituindo Fe^{++} . Verificaram que - esporos menos resistentes, foram aqueles com Mg^{++} e Fe^{++} , a adição de Ca^{++} não afetou a resistência, a adição de Mn^{++} ou ($Ca^{++} + Mn^{++}$) produziu esporos de resistência intermediária; os esporos de maior resistência foram obtidos quando Fe^{++} foi substituído por Ca^{++} e Mn^{++} .

Slepecky & Foster (1959) reportaram que suspensões de B. subtilis com alta homogeneidade, com respeito à resistência térmica, foram obtidas pela adição de catiônios bivalentes como Ca^{++} (10-50ppm) e Fe^{++} (1-5ppm) ao meio de esporulação.

A suplementação de $CaCl_2$ segundo Levinson & Hyatt (1964), ao meio de esporulação, aumenta a resistência de esporos de B. megaterium talvez devido a alta relação molar de $Ca/\text{ácido dipicolínico}$ (DPA) em tais esporos. Lechowich (1958) observou uma relação alta de Ca/DPA em esporos de B. coagulans formados a alta temperatura e que possuíam alta resistência térmica, concluindo que a concentração de Ca^{++} , tinha um papel predominante em termoresistência.

Halvorson & Howitt (1961) estudaram o rol de DPA nos esporos bacterianos e entre as funções não específicas estava a de conferir ao esporo a termoresistência por um mecanismo de estabilização das proteínas. Observaram que

a síntese de DPA era também dependente da concentração de metais bivalentes no meio de esporulação e que quando as concentrações de Ca^{++} e Mn^{++} no meio diminuíam, diminuía também a concentração de DPA, estando a concentração de Ca^{++} e DPA no esporo em quantidades equimolares. Propuseram alguns mecanismos para relacionar Ca^{++} e DPA. O mais aceito foi que ambos são requeridos para conferir resistência térmica aos esporos e que é o tipo de ligação DPA- Ca^{++} e proteína que produz esporos mais resistentes a desnaturação pelo calor.

El-Bisi e outros (1962) estudaram os eventos que ocorrem durante a morte dos esporos por calor úmido, encontrando que esta progride a uma taxa maior que a saída de Ca^{++} e DPA dos esporos aquecidos. Também, relacionaram o conteúdo de Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} do meio de esporulação com a resistência térmica, indicando que para B.coagulans um aumento na concentração de Ca^{++} e Mn^{++} aumenta a resistência enquanto que um aumento na concentração de Mg^{++} não tinha nenhum efeito.

A ação de iônios no meio de suspensão tem sido reportada por Frank (1955) o qual realizou estudos de resistência térmica com esporos de B.coagulans aquecidos em meios com controle de catiônios. Os catiônios estudados foram H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{+++} , presentes em leite comercial evaporado e em suco de tomate (alimentos que podem ser afetados por bactérias de deterioração ácida). Frank empregou uma série de soluções de leite evaporado e suco de tomate das quais foi retirando um a um os catiônios; comparou duas soluções de leite e suco de tomate no mesmo pH, sendo maior a resistência em suco de tomate, indicando que o meio de suspensão como um todo afeta a resistência. As soluções sem Na^+ e K^+ produziram esporos com menor resistência em comparação com as soluções que tinham todos os catiônios. Ca^{++} , Mg^{++} e Fe^{+++} não afetaram significativamente a resistência. Este mesmo autor reporta que quando Na^+ e K^+ eram adicionados ao purê de ervilha a resistência dos esporos de PA.3679 aumentava.

Viljoen (1926) relatou que um aumento na concentração de Na^+ adicionado como NaCl produziu um aumento na re

sistência de esporos de várias espécies de anaeróbios e aeróbios facultativos. No entanto, Anderson e outros (1949) relataram que aumentando a concentração de NaCl no meio de suspensão, a resistência térmica de esporos de B. thermoacidurans diminuía. Também observaram que quando se aqueciam - esporos em diferentes alimentos o grau de resistência variava.

Sugiyama (1952) estudou os fatores que afetam a resistência térmica de esporos de Cl.botulinum e encontrou que a medida que a concentração de Ca^{++} e Mg^{++} aumentava no meio de suspensão aumentava também a sua termoestabilidade. El-Bisi e outros (1955) estudando o efeito de certos fungicidas na resistência térmica de esporos de B.coagulans, encontraram que 100 ppm de Cu^{++} fixo no suco de tomate, usado como meio de suspensão, causou um decréscimo significativo na resistência térmica.

2.- EFEITO DO MEIO DE SUBCULTURA SOBRE A RESISTÊNCIA TÉRMICA.

Brown & Melling (1971) definiram a resistência térmica em termos do tratamento térmico máximo durante o qual as bactérias ainda retêm viabilidade. Indicaram que somente podem se fazer comparações válidas de resistência se as condições ambientais antes, durante e depois do tratamento térmico fossem controladas e a validade das comparações - não pode ser extrapolada além dos limites destas condições. Harris (1963), também, indicou que a sensibilidade aparente ao calor de células vegetativas e esporos não apenas dependia das condições antes e durante o aquecimento, senão também, dos tratamentos aos quais são subsequentemente submetidos.

Normalmente, a recuperação de esporos tratados termicamente é mais afetada por fatores ambientais em comparação com a dos esporos não tratados por calor; como no caso de certos meios que contêm substâncias que são mais inibidoras para esporos aquecidos que para não aquecidos (Rus-

sell, 1971; Harris, 1963; Stumbo, 1973). Portanto, em estudos de morte térmica, as condições de recuperação devem ser cuidadosamente escolhidas (Prentice & Cleg, 1974), sendo a seleção de meio de recuperação crítica para testar esterilidade, examinar produtos deteriorados por bactérias e determinar a causa de sua deterioração (Evancho, Hashton & Carson, 1974).

Segundo Stumbo (1973), nos estudos de morte térmica, um critério de morte é a falha em reproduzir-se quando os esporos são colocados em um meio favorável por um tempo razoável. É pois importante prover as condições mais favoráveis para cultivar os esporos aquecidos, já que com as células sobreviventes de um tratamento térmico nunca se tem a certeza de que se está contando todos os sobreviventes.

Normalmente os meios para subcultura são examinados para verificar sua capacidade de crescimento, mas apenas com uma ou duas espécies de microrganismos e geralmente isto não se faz com baixa quantidade de inóculo. Em muitos casos, o meio de subcultura escolhido pode ser consideravelmente inferior a ótimo para recuperar organismos causadores de deterioração (Evancho e outros, 1974).

Stumbo (1973) indicou que há muitos casos de meios de subcultura que dão contagens muito superiores a outros, e, é raro o meio que dê contagens maiores do que as obtidas por observação direta ao microscópio. O que se recomenda fazer, segundo este autor, é utilizar o meio que dê contagens mais altas nas determinações de termoresistência. Os requerimentos nutricionais de esporos submetidos ao calor subletal são diferentes e as vezes maiores que os requerimentos de esporos não tratados por calor (Ernst, 1968).

Em 1943, Nelson revisou literatura sobre meios de recuperação, concluindo que os meios ricos dão contagens mais altas e observando que a sobrevivência de esporos tratados pelo calor pode ser variada pelo uso de meios diferentes, assinalando a dependência entre um meio adequado e o organismo em particular por ele recuperado. Trabalhando com B. subtilis

este autor mostrou que esporos tratados pelo calor davam contagens diferentes em diferentes caldos de ágar nutriente. Harris (1963) encontrou que a fonte de ágar é também importante.

Miller & Davey (1965) investigaram o crescimento de bactérias em ágar em estado de sol e de gel, concluindo que o número final e sua morfologia dependia das condições do ágar. Propuseram que estes efeitos podiam dever-se a mudanças na estrutura do ágar, resultante do estado do mesmo.

Boballius & Zacharias (1971) estudaram a variação do conteúdo de metal em alguns meios e seu efeito no crescimento bacteriano. Foram testados meios DIFCO e OXOID, encontrando uma notável variação no conteúdo de catiônios - entre meios que levam o mesmo nome e de aspectos similares. Ademais verificaram que diferentes lotes da mesma marca são inconsistentes no conteúdo de iônios metálicos.

Alguns casos de inibição produzida pela presença ou ausência de certos constituintes do meio de subcultura estão relatados na literatura: Em 1964, Cook & Brown mostraram que o bromocresol púrpura presente no meio caldo de glicose triptona (DTB), afetava os esporos de B.stearothermophilus e recomendaram o uso do meio sem o corante. Ernst (1968) encontrou que o meio caldo de tioglicolato era definitivamente inibidor para o crescimento pós-germinativo de espécies de Bacillus usadas para testar processos de esterilização com vapor e com calor seco.

Evancho e outros, (1974) encontraram que o meio caldo de bromocresol não suportava crescimento ótimo de esporos e células vegetativas de B.stearothermophilus, falhando em detectar crescimento quando o inóculo era menor que 10 esporos por ml. Esta falha era superada quando se adicionava 30-50 ppm de Ca^{++} ao meio.

Roberts & Ingram (1966) relataram a ação de sais como $NaCl$, KNO_3 e $NaNO_2$ presentes em meios de subcultura. Estes afetavam as contagens de esporos aquecidos, tal-

vez por inibição do crescimento pós-germinativo. Aparentemente os esporos aquecidos são mais susceptíveis a ação destes sais. Duncan & Foster (1968) afirmaram que o nitrato de sódio induzia a germinação de esporos, deixando-os susceptíveis ao calor e bloqueando o crescimento pós-germinativo dos que conseguiram resistir. Para suas experiências esses pesquisadores usaram esporos de PA 3679.

Olsen & Scott (1946) e Humphrey & Nickerson (1961) indicaram que as condições físicas e químicas do meio de subcultura afetam a resistência térmica aparente dos esporos, expressada pela velocidade de morte térmica, assinalando que mudanças no meio podem alterar a forma da curva de sobreviventes. Também, em 1961, Murrell indicou que o desvio da linearidade pode ser causado pela sensibilidade dos esporos, aos inibidores presentes no meio de contagem depois do aquecimento.

Em 1965, Yokoya & York encontraram que a composição do meio de recuperação afetava a resistência térmica aparente de esporos de B.stearothermophilus quando o pH foi de 7.0 porém não a pH 6,5. Usando esporos de B.coagulans 43P produzidos em um mesmo meio, e usando meio DTB e DTA para subcultura, encontraram valores D sempre maiores para o meio DTA em comparação com DTB.

Em 1946, Olsen & Scott, trabalhando com algumas espécies de Clostridium verificaram que a adição de pequenas quantidades de amido (0,1%), albumina e carvão ativo, promoviam a germinação de esporos sobreviventes de um tratamento térmico. O amido podia proceder de diferentes fontes, porém, o efeito era sempre o mesmo.

Em 1950, Murrell, Olsen & Scott observaram que a adição de amido aumentava a contagem de sobreviventes, possivelmente pela adsorção de agentes inibidores presentes no meio de subcultura. Isso veio a sugerir a existência de inibidores que são efetivos a baixo pH e inibidores efetivos a pH próximo a neutralidade. Eles postularam que os inibidores possivelmente seriam ácidos graxos insaturados presentes no meio. O efeito da adição de amido sobre o declive da

curva de sobreviventes foi marcante podendo inclusive mudar a forma da curva.

3.- TRANSFORMAÇÃO DE ESPOROS A CÉLULAS VEGETATIVAS

Nestes últimos anos tem aumentado o interesse dos investigadores em compreender e analisar as transformações e os mecanismos que sucedem quando um esporo se converte em célula vegetativa. Até agora os mecanismos exatos são desconhecidos, porém, tem-se uma idéia bastante detalhada sobre o que ocorre.

Segundo Murrell (1961), Keynan & Halvorson (1965), a conversão de esporos a células vegetativas está associada a numerosas mudanças bioquímicas. Estes autores definiram três fases principais deste processo : (a) ativação; (b) germinação, também chamada por Murrell de iniciação e (c) crescimento pós-germinativo.

3.1. D o r m ê n c i a

Os esporos maduros são caracterizados por uma alta resistência ao calor e aos agentes físicos e químicos, e por apresentar uma moderada atividade metabólica (Riemann, 1963). Esta atividade metabólica moderada, em comparação com a de células vegetativas é conhecida em sistemas biológicos como dormência (Doi, 1961), e não se deve confundir com outro significado segundo o qual, dormência seria a descrição do fato de que uma suspensão de esporos não responde ou responde fracamente a agentes de germinação em condições que permitem rápida germinação de esporos ativados ou idosos (Keynan & Halvorson, 1965; Riemann, 1963). No decorrer deste trabalho o termo dormência será aplicado com o primeiro significado.

Doi (1961) encontrou atividade enzimática limitada em esporos dormentes inteiros e também em extrato de

esporos que não haviam sido submetidos a nenhuma ativação. As enzimas ativas foram: catalase, racemase de alanina, deaminase de adenosina e pirofosfatase. A presença dessas enzimas ativas, segundo esse autor, indica que a dormência não é o resultado de uma falha dos sistemas enzimáticos, mas sim da estrutura físico-química do esporo.

3.2. A t i v a ç ã o

É um processo reversível que condiciona o esporo dormente, capacitando-o para germinar (Halvorson, Vary & Steinberg, 1966). Não é estritamente definível nem existe uma diferença visual, química ou física entre um esporo ativado e um dormente, pois o esporo ativado retém a maioria das características de esporo dormente (Keynan & Halvorson, 1965). Quando os esporos ativados são expostos a um meio ambiente adequado produz-se a germinação (Cohran & Ordal, 1973).

Segundo Keynan & Halvorson (1965) as mudanças produzidas pela ativação não dependem das reações metabólicas do esporo, e a necessidade deste processo depende do esporo em si, sua história, e as circunstâncias que induzem sua transformação a célula vegetativa.

3.2.1. Efeitos da ativação: A ativação reduz a fase de latência do início de germinação, aumentando, portanto, a taxa de germinação (Keynan e outros, 1964). Também, ativa enzimas dormentes e muda os requerimentos para a indução de germinação (Powell & Hunter, 1955).

Halvorson (1958) estudando a influência da ativação na taxa de germinação, assinalou que a maioria dos esporulados mesófilos aeróbios requerem um leve choque térmico de 15 min. a 85°C, e que se não for dado esse tratamento apenas uma pequena porcentagem germinava rapidamente quando se incubaram em um meio adequado, enquanto que a grande maioria dos esporos apenas germinavam depois de longo período de

incubação.

Doi (1961) trabalhando com extrato de esporos, encontrou que as enzimas que intervêm no metabolismo da glicose como alanina desidrogenase, riboquinase, diaforase e várias outras mostram maior atividade depois dos esporos terem recebido um choque térmico. Indicou este mesmo autor que, estas enzimas ativadas pelo calor poderiam estar presentes no córneo dos esporos, enquanto que as ativas antes do choque térmico poderiam localizar-se no exospório.

Lawrence (1956) investigou o efeito da ativação sobre a mudança dos requerimentos de germinação e encontrou que esporos de B.cereus que normalmente requerem l-alanina para germinar, podiam fazê-lo rapidamente com d-alanina, piruvato e lactato depois do choque térmico.

Hashimoto & Conti (1971) estudaram o efeito do choque térmico na estrutura física da membrana do esporo. Môstraram que, o choque térmico, produzia estrias na membrana e postularam que a desnaturação e liberação dos componentes da membrana durante o aquecimento facilitariam a entrada dos agentes de germinação.

Halvorson (1958) encontrou que o choque térmico produzia uma perda de 5 a 10% do DPA presente no esporo. Como na época, ainda não tinha sido mostrado o efeito do choque térmico nos esporos, assumiu que a ativação aumentava a permeabilidade do esporo, de modo que os agentes de germinação poderiam exercer seu efeito. No entanto, Uehara & Frank (1967) - trabalhando com esporos de P.A.3679, mostraram que a ativação produzia um decréscimo de 5% no valor da absorbância inicial, 18% de liberação do DPA presente no esporo, escurecimento - desprezível e não aceitavam corantes depois de ativadas.

Keynan & Halvorson (1965) resumiram suas experiências explicando o mecanismo de ativação da seguinte maneira: "A nível molecular a ativação modifica a estrutura terciária das proteínas, desnaturando-as". Essa hipótese foi sustentada pelo fato de que todos os agentes que produzem a ativação como calor, baixo pH, e agentes redutores são agen-

tes conhecidos que afetam a estrutura terciária das proteínas. Sugeriram que a macromolécula responsável em manter o estado dormente do esporo era uma proteína rica em cisteína localizada na membrana e estabilizada numa configuração específica por pontes S-S. A redução dessas pontes modificaria a estrutura, resultando em ativação de uma enzima ou em uma mudança de permeabilidade. Isto explicaria porque uma oxidação lenta das ligações retorna o esporo ao estado dormente.

Fields & Finley (1962) estudaram o efeito do armazenamento sobre a ativação, comparando as respostas à destruição térmica de esporos novos e armazenados de bactérias causadoras de "deterioração ácida" dos alimentos. Descobriram que o grau de ativação e a resistência térmica decresciam com a idade e sugeriram que a ativação seria a causa da destruição mais lenta na fase inicial das curvas de destruição térmica.

Stumbo (1973) assinalou que diferentes combinações iniciais da velocidade de ativação e da velocidade de morte térmica produziriam diferentes formas na porção da curva de sobreviventes correspondente à fase de latência, sem isto causar um desvio da ordem logarítmica da morte das bactérias. No entanto, Lewis, Snell & Alderton (1965) relataram que o percurso da curva de ativação e morte de B.coagulans não correspondia ao modelo de duas reações consecutivas de primeira ordem. A porção ascendente da curva de ativação e morte representada em gráfico por estes autores, subia muito lentamente, sugerindo que a hipótese de uma reação de ativação de primeira ordem era inadequada para B.coagulans. Talvez porque, nos esporos individuais a ativação era acelerada a medida que o aquecimento avançava, e além disso a curva da morte começa a uma baixa velocidade, antes que o processo de ativação esteja completo.

Allan (1975), estudando o papel de choque térmico e dos nucleosídeos na germinação de esporos de B.cereus, usou esporos de 6 meses de idade e esporos novos liofilizados. Verificou que os esporos mais velhos germinavam a uma velocidade maior que os esporos liofilizados, que com ou sem

ativação térmica. Também notou que os esporos que receberam choque térmico germinavam mais rapidamente que os não ativados. O aquecimento dos esporos idosos retardou um pouco sua germinação.

3.2.2. Fatores que influem no tempo de ativação:

Stumbo (1973) assinalou alguns fatores que afetam o tempo de aquecimento para uma rápida ativação, de uma determinada população bacteriana. Esses fatores são: (a) espécie e linhagem da bactéria; (b) natureza do meio em que os esporos são produzidos; (c) natureza do meio de suspensão para armazenamento; (d) temperatura de armazenamento; (e) idade dos esporos; (f) natureza do meio de subcultura e (g) temperatura de aquecimento.

3.2.3. Métodos de ativação de esporos bacterianos:

(a) Calor: Curran & Evans (1945) estudando esporos de bactérias mesófilas e termófilas foram os primeiros a demonstrar que o calor a nível subletal induzia a germinação dos esporos dormentes. Estes autores, também, assinalaram o carácter reversível da ativação indicando que, quando a germinação não era efetivada depois da ativação os esporos retornavam ao seu estado dormente.

(b) Agentes redutores: como mercaptoetanol e ácido tioglicólico são indicados como produtores de esporos ativados - (Keynan e outros, 1964; Rowley & Levinson, 1967).

(c) Baixo pH: Keynan, Issahary-Brand & Evenchik (1965) ativaram suspensões de esporos de B.cereus ajustadas com tampão a pH de 1 a 12. Concluíram que, para B.cereus, o pH ótimo que produz ativação a menor tempo estava entre 2-3. A pH entre 3 e 8,5 foi necessário mais tempo para completar a ativação; < 2 e > 8,5 a ativação foi inibida. A < 2, a inibição era irreversível, a > 8,5, a inibição era reversível se a suspensão era lavada várias vezes e incubada a pH neutro. A pH 1 registrou-se uma ativação irreversível, com subsequente germinação dos esporos. A mais de 10 minutos a pH 1, não

foi possível obter germinação.

Lewis e outros (1965) indicaram que quando os esporos eram expostos a um meio ácido por 1 a 3 horas, ocorria - um intercâmbio de iônios entre o esporo e o meio a seu redor, afetando a dormência e a resistência térmica.

(d) Dipicolinato de cálcio: Riemann & Ordal (1961) realizaram um tratamento com quantidades equimolares de cloreto de cálcio e dipicolinato de sódio. Isso resultou em germinação de esporos de várias espécies de Bacillus e Clostridium.

(e) Hidrato de cloral: Lewis e outros (1965) encontraram que soluções concentradas de hidrato de cloral em água ou em etileno glicol substituíam a ativação térmica e por agentes redutores de B.coagulans. A ativação por tratamento térmico e por agentes redutores era reversível pela oxidação lenta dos esporos ativados (Gould & Hitchins, 1963). Cohran & Ordal (1973) inativaram esporos de B.cereus, ativadas previamente por calor, mediante oxidação lenta com perborato de sódio (30mM) obtendo bons resultados.

3.2.4. Métodos para medir a ativação: Keynan e outros (1965) indicaram dois métodos para medir a ativação. O primeiro mede a velocidade de germinação num meio nutriente-apropriado e o segundo mede a porcentagem de esporos que formam colônias em meios de semeadura apropriado. O primeiro método é mais sensível porque duas suspensões podem dar o mesmo número de colônias, porém uma delas pode germinar mais rapidamente que a outra. O segundo método é empregado com esporos altamente dormentes.

3.2.5. Efeito de iônios na ativação: Ainda que um grande número de autores tem encontrado que os iônios aumentam ou inibem a germinação somente poucos tem reportado os efeitos dos iônios na ativação. Levinson & Sevag (1953) encontraram que esporos de B.megaterium foram ativados por Ca^{++} , Ba^{++} e Sr^{++} . Esses mesmos autores, trabalhando com esporos de B.stearothermophilus, encontraram que os mesmos foram ati

vados por iônios H^+ .

Segundo Splittstoesser & Farkas (1966), certos catiônios afetaram a velocidade de ativação por calor de esporos de B. popillae. Eles conseguiram velocidade máxima de ativação em soluções de Ca^{++} a pH 7 ou em tris hidroximetilaminometano a pH 9-10. Uma combinação de Ca^{++} e pH alcalino retardou a ativação. A ativação foi marcadamente reduzida por K^+ e H^+ , porém, Na^+ , Cs^+ e Li^+ não a afetavam. Mg^{++} , Sr^{++} e Mn^{++} venciam o efeito inibidor do K.O fato de que a composição catiônica do meio de aquecimento tinha efeito significativo na ativação, levou estes autores a pensar que as velocidades seriam influenciadas por um forte agente quelante. Testaram, então, EDTA (ácido etileno diamino tetracético) em solução de $10^{-4}M$ a $50^{\circ}C$ a pH 7. Tal solução inibiu a ativação. Quando excesso de EDTA e KCl eram adicionados a esporos que estavam sendo aquecidos em soluções de $CaCl_2$, o potássio inibia mais que o EDTA. Eles concluíram que a efetividade relativa dos dois inibidores era dependente do tempo que eles eram introduzidos. A conclusão geral apresentada pelos autores era de que os catiônios bivalentes poderiam ser necessários para a ativação de esporos dormentes de B. popillae, e que a contribuição de Ca^{++} era dependente do pH da suspensão.

Rowley & Levinson (1967) conseguiram restaurar a capacidade germinativa e a resistência térmica de esporos de B. megaterium tratados com tioglicolato, pela adição de Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} e Ba^{++} no meio de aquecimento ou no meio de germinação. Co^{++} e catiônios monovalentes não foram eficientes, concluindo-se que o tioglicolato produz perda de iônios essenciais para a germinação normal dos esporos de B. megaterium e também para a resistência térmica.

Keynan e outros (1965) também investigaram a influência de sais na ativação térmica. Eles adicionaram NaCl, KCl e LiCl (2,5M de cada sal individualmente) a suspensão de esporos de B. cereus antes da ativação a $65^{\circ}C$, encontrando que se produzia uma inibição da ativação por adsorção dos sais durante o aquecimento, e conseqüente inibição da germinação. Porém, o efeito podia ser revertido, se uma vez ati-

vados, os esporos eram lavados várias vezes.

Doi (1961) indicou que a remoção de metais inibidores de germinação seria um passo necessário antes da ativação e que poderia ser conseguido por adição de um quelante como DPA, assinalando que, se durante a ativação existiam metais inibidores, estes poderiam inibir as enzimas, as quais são ativadas no choque térmico.

3.3. Germinação

3.3.1. Definição: Wynne (1952) foi um dos primeiros em assinalar que eram necessárias diferentes condições para o crescimento e para a germinação de esporos, e propôs que os dois eram processos diferentes. Campbell (1957) definiu a germinação como o resultado da perda das características do esporo originando-se um organismo que não vinha ser ainda uma célula vegetativa.

A germinação é um processo irreversível e degradativo resultando em uma célula que perdeu as características de esporo, sendo metabolicamente ativa, lábil ao calor, não refrátil e que pode ser colorida facilmente pelos corantes comuns (Keynan & Halvorson, 1965; Riemann, 1963).

3.3.2. Mudanças produzidas no esporo durante a germinação. O estudo das transformações que ocorrem durante a germinação é difícil porque a germinação não é um processo sincronizado, não havendo uma separação marcante de tempo entre um e outro evento. Numa suspensão, as diferentes mudanças se entrecruzam no tempo, o que não ocorre em um esporo individual (Keynan & Halvorson, 1965).

Grande parte dos estudos realizados sobre a sequência de eventos que ocorrem durante a germinação tem sido feitos com o auxílio de microscópios de fase e eletrônicos. Vinter (1967) indicou que a germinação iniciava-se com uma alteração das membranas periféricas do esporo, e estava relacionada com a perda da impermeabilidade, hidratação e

entumecimento do cortex. Robinow (1960) estudou a germinação mediante a observação em microscópio de fase, e assim descreveu o início da germinação: " o cortex que era transparente fez-se visível como uma banda escura e a seguir tornava-se entumecido, começando a desaparecer". O cortex logo perdia sua homogeneidade e transformava-se numa espécie de esponja fibrosa, diminuindo sua espessura, enquanto isso o córneo - mostrava algum grau de organização e a capa parecia menos densa e menos rígida (Hunnell & Ordal, 1961; Uehara & Frank, 1967).

Vinter (1967), Hunnell & Ordal (1961) mencionaram a continuação do processo pela ativação de enzimas líticas e a excreção do exudado constituído por Ca, DPA - liberados independentemente ou em uma combinação fraca - e fragmentos de mucopeptídeos provenientes, talvez, do cortex e / ou da capa. Powell & Strange (1953) mostraram que 30% do peso seco do esporo era excretado durante a germinação e cerca de 90% do DPA presente no esporo podia ser liberado no exudado.

Levinson & Hyatt (1966) e Vinter (1967) assinalam que, enquanto essas mudanças ocorriam o esporo perdia, também, a sua resistência ao calor e a agentes tóxicos, tornando-se sensível a altas doses de radiação. Powell (1957) indicou que aparentemente a perda da resistência ocorria bem no início da mudança do grau de refratibilidade e muito antes da excreção do exudado. A velocidade de perda da resistência, era a mesma que a da mudança de refratibilidade e a do aumento da facilidade para ser colorido. Segundo este autor o escurecimento implicava na ausência da resistência, mas não o inverso. Hsieh (1960) relatou que esporos recém germinados de B. coagulans possuíam uma resistência térmica da mesma ordem que a encontrada em células vegetativas deste organismo.

Segundo Uehara & Frank (1967), as mudanças que ocorriam no esporo germinante, eram inicialmente na região periférica "cortex", e a seguir na região central o "córneo". Visualmente, o processo de germinação era inibido por duas

barreiras, uma no cortex e outra na membrana do corno. A sequência de eventos na germinação de esporos de P.A.3679 estudada por esses autores era a seguinte: diminuição inicial da absorvância; perda da resistncia trmica; liberao de DPA; escurecimento do cortex seguido de sua desintegrao, at ser destrudo. Ao final da germinao, o escurecimento era total, o esporo ganhava facilidade para aceitar corantes comuns e produzia-se ainda um pequeno decrcimo da absorvncia provavelmente devido a sada de restos de peptdeos e amino- cidos. Por ltimo, o corno entumecia por possvel hidratao.

Rousseau e outros (1972) sugeriram que a perda da absorvncia e da refratibilidade junto com as mudanas na estrutura superficial podia refletir modificaes qumicas- internas da parede do esporo. Levinson & Hyatt (1966) relataram a sequncia de eventos da germinao de B.megaterium em glicose + l- alanina. As mudanas ocorreram na seguinte ordem: perda da resistncia trmica; liberao de DPA; aquisio de facilidade para ser colorido; perda de absorvncia e, escurecimento quando visto no microscpio de fase. Estes autores assinalam que ao comparar e reconciliar resultados existentes na literatura a este respeito, encontravam-se proposies conflitantes, devido as diferenas de variveis experimentais, mtodos e parmetros usados para medir a germinao. Tambm, sugeriram a existncia de um mecanismo que controlaria a perda de resistncia e sada de DPA e outro responsvel pelo escurecimento, perda de turbidez e capacidade para ser colorido.

Torriani & Levinthal (1967) estudaram a sntese de proteina durante a germinao e crescimento ps-germinativo de B.cereus concluindo que o incio da sntese ocorria na germinao enquanto se produziam as mudanas pticas. Verificaram que quando o esporo no germinava, a sntese de proteina no ocorria ou era muito lenta. Na germinao a sntese - reduzia-se a umas poucas proteinas.

3.3.3. Mtodos para determinar a germinao.

Campbell (1957) e Gould (1971) testaram os seguintes métodos para determinar a germinação: (1) perda da resistência térmica; (2) diminuição da absorvância; (3) determinação da perda de refratibilidade em microscópio de fase e (4) mudança na facilidade para aceitar corantes.

Um outro método comumente usado é a determinação do DPA liberado (Powell & Strange, 1953).

O método mais usado, devido a sua simplicidade e fácil aplicação, mesmo em suspensões com alta velocidade de germinação é o da absorvância.

Uehara & Frank (1967) estudaram todos os métodos acima indicados a fim de determinar quais os que medem as mudanças iniciais e quais as mudanças finais da germinação com maior facilidade. Verificaram que a liberação de DPA, perda da absorvância e gradual escurecimento da periferia - juntamente com perda da resistência térmica, serviam muito bem para determinar o início da germinação. A mudança nas propriedades de coloração e a perda total da refratibilidade, mediam o ponto final da germinação.

3.3.4. Classificação da Germinação. Em 1949, Hills descobriu que a potência germinativa de extrato de levedura para esporos bacterianos podia ser atribuída a substâncias específicas. Esta descoberta marcou época na ciência de esporos e trouxe como consequência a procura de compostos germinativos para uma ou outra espécie.

Em 1960, Rode & Foster agruparam os compostos germinativos em fisiológicos (nutrientes) e químicos (compostos orgânicos e inorgânicos não considerados nutrientes). Estes mesmos autores (1962-b), em busca de uma melhor classificação, separaram os agentes germinativos em iônicos (vários sais) e não iônicos (alanina, inosina e glicose). Outra designação dada por eles foi de eletrólitos fortes (vários sais), eletrólitos fracos (alanina e inosina) e não eletrólitos (como a glicose).

Em 1966, Foerster & Foster concluíram que a ger

minação era desprezível sem a presença de agentes exógenos. Porém em 1963, Riemann já havia classificado a germinação de acordo ao tipo de agente exógeno que a induz, da seguinte forma: (1) germinação fisiológica (induzida por compostos orgânicos como alanina, glicose e adenosina); (2) germinação química (induzida por compostos orgânicos e inorgânicos) e (3) germinação mecânica (causada por agentes físicos como pressão e fricção).

Neste estudo, serão revistos os dois primeiros casos.

3.3.5. Germinação fisiológica de esporos de Bacillus.

Durante o fracionamento de extrato de levedura, para se determinar qual o componente que era responsável pelo estímulo da germinação, Hills (1949) verificou que l-alanina, l-tirosina e adenosina induziam a germinação. O efeito da l-alanina era extremamente reduzido quando adicionada juntamente com d-alanina ao sistema germinante. Desde então, tem-se tentado germinar esporos com agentes metabolizáveis individualmente ou em combinação com compostos químicos não metabolizáveis.

Allan (1975) reportou que l-alanina era provavelmente o agente germinativo mais efetivo para o maior número de espécies e mencionou que este composto e glicose, são os que tinham recebido maior atenção dos investigadores. Entretanto o mecanismo da sua ação é ainda desconhecido. Sogin, McCall & Ordal (1972) sugeriram que existe no esporo vários lugares que podem responder aos estimulantes da germinação, mas não foram especificados.

Rode (1968) correlacionou a estrutura do esporo e suas propriedades usando seis linhagens diferentes de B. megaterium, encontrando que três linhagens germinavam com glicose e nitrato de potássio e as outras três com alanina e inosina. Estas últimas tinham a superfície externa venosa e um aspecto arredondado, enquanto que as primeiras eram achatadas, apresentando um bordo equatorial proeminente e eram significativamente mais resistentes ao calor. Concluiu, desta forma que existia uma relação entre a morfologia de esporos de B. megaterium e suas propriedades de germinação e re-

sistência térmica.

Foerster & Foster (1966) testaram combinações de compostos germinativos fisiológicos com compostos químicos - para várias espécies de Bacillus. Entre os compostos fisiológicos testados, estavam glicose, alanina, inosina, alanina mais inosina, por eles denominados de germinantes "primários". Os resultados obtidos evidenciaram uma grande diversidade, de modelos de germinação, entre espécies e linhagens de uma mesma espécie, assinalando que nenhuma das combinações testadas foi efetiva para todas as linhagens. Concluíram, que há apenas um fator comum a germinação fisiológica, que era a necessidade de eletrólitos fortes. Carboidratos, aminoácidos e ribosídeos produziam individualmente a germinação, mas apenas em poucas linhagens, podendo ser substituídos por outros. Uma mistura ribosídeo-aminoácido provou ser mais efetiva que cada um deles separadamente, para inúmeras linhagens inclusive B.coagulans 10545.

Desrosier & Heiligman (1956) testaram alguns compostos germinativos para B.coagulans, encontrando que l-alanina foi o único aminoácido que estimulou a germinação. Outros como ácido l-glutâmico e l-aspartico e tirosina não deram bons resultados. Estes investigadores obtiveram uma velocidade de germinação elevada combinando glicose, l-alanina e adenosina como compostos germinativos.

Wax, Freeze & Cashel (1967) estudaram a germinação de esporos de B.subtilis, encontrando que existiam linhagens que podiam germinar apenas com l-alanina, enquanto que outras requeriam inosina ou glicose, individualmente ou com alanina. Concluíram que esporos de diferentes linhagens variavam em suas necessidades de agentes germinativos, e que esta variação dependia da linhagem e era uma propriedade hereditária dos esporos.

Bústa & Adams (1972) tentando identificar o sistema ou sistemas ativos na germinação dos esporos de B.subtilis que receberam um tratamento térmico muito alto (UHT). Verificaram que esse tratamento afetava o sistema de germinação

ção do esporo e não causava nenhum efeito no crescimento pós-germinativo e nem no crescimento vegetativo. Nesse caso, os compostos que induziram a germinação mais elevada foram glicose e sais minerais.

Allan (1975) investigou a interação de l-alanina e dos potenciadores inosina e adenosina sobre a germinação usando esporos de B. cereus T. Também, estudaram a ação do inibidor d-alanina. Verificaram que os nucleosídeos por si só não eram germinadores. Quando eram adicionados a l-alanina potenciavam a germinação por atuar contra d-alanina que interferia no local de ação da l-alanina. D-alanina é agente germinativo junto com inosina e choque térmico, possivelmente por formar l-alanina sob ação da alanina racemase. Nesse caso, o choque térmico é um pré-requisito para facilitar a entrada de inosina em quantidade necessária para antagonizar d-alanina. A ativação por calor tem sido considerada essencial para a germinação fisiológica. Para a germinação química e a mecânica, a mesma não era necessária (Rode & Foster, 1961; Lewis e outros, 1965). Todos esses estudos demonstram que os nutrientes que induzem germinação podem diferir amplamente entre esporos de Bacillus de diferentes espécies.

3.3.6. Germinação química. A germinação química é aquela induzida por compostos que não são considerados nutrientes (Riemann, 1963). Em 1956, Brown induziu a germinação de esporos de P.A. 3679 incubando-os em solução de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) e observou completa perda de refratibilidade e resistência térmica. O efeito desse composto quelante, segundo esse autor, seria produzir a germinação por ação quelante com algum metal inibidor, naturalmente presente no esporo (provavelmente o berílio). A quantidade de EDTA usada tem que ser adequadamente estabelecida porque um excesso poderia retirar não somente os inibidores mas, também os iônios necessários para a própria germinação, produzindo-se então a inibição.

Em 1961, Rode & Foster encontraram que algumas

n-alquil aminas primárias induziam a germinação do esporo - observando um decréscimo na refratibilidade e maior facilidade para ser colorido.

Riemann (1963), utilizando os resultados de Brown, investigou a germinação de P.A. 3679 com EDTA em uma faixa de concentração de 10-250mM. Verificou que entre 30 e 50 mM a concentração era ótima para germinação e as concentrações mais elevadas produziam germinação mais lenta e incompleta. No entanto, com esporos de Bacillus, entre eles B.coagulans variedade thermoacidurans, incubadas em soluções de EDTA (10 a 100mM) não se produziu a germinação depois de 5 horas de incubação. Este mesmo autor verificou que o quelato CaDPA 1:1 podia induzir a germinação sem a adição de nutrientes para algumas espécies esporulantes aeróbicas e anaeróbicas mas não estabeleceu um mecanismo de germinação.

3.3.7. Efeito de iônios na germinação de esporos.

Rode & Foster (1962a) descreveram o evento da germinação dependente unicamente de iônios e denominaram essa germinação de "germinação iônica". O termo tem suas limitações porque a ação de iônios é mais estimulante que indutora.

Foerster & Foster (1966) estudaram compostos germinativos fisiológicos, em combinação com cátions e aniônios para 21 linhagens de B.megaterium e 25 das 13 espécies de outros Bacillus. Os aniônios e cátions testados foram F^- , Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , $CO_3^{=}$, $PO_4^{=}$, propionato, succinato e dipicolinato, Mg^{++} , Ca^{++} , Ba^{++} , e Sr^{++} . As respostas de germinação foram medidas como uma porcentagem do decréscimo da absorbância inicial. Os resultados confirmaram que, para a germinação de todas as linhagens investigadas, não havia necessidade absoluta de um iônio em particular. Os iônios orgânicos, como propionato, succinato e DPA, foram equivalentes na germinação, porém, foram necessários para mais linhagens do que os inorgânicos. O DPA, segundo estes autores, foi efetivo para numerosas linhagens, porém não para todas, e foi relatado como um iônio não específico e não co

mo quelante, podendo ser substituído por outros ácidos orgânicos. Os haletos foram eficientes germinadores para a meta de das linhagens estudadas.

B.coagulans 10545 não germinou significativamente em presença de sais de sódio e potássio adicionadas a glicose, alanina e inosina. A germinação dessa linhagem foi maior em uma mistura de l-alanina, inosina, Na⁺, glicose, NaBr e CaCl₂, dipicolinato e propionato de sódio, aminoácidos, levedura e água.

Rode & Foster (1966) estudaram o efeito da substituição de iônios metálicos sobre a capacidade germinativa de esporos. Testando Ca⁺⁺, Ni⁺⁺, Co⁺⁺⁺, Cd⁺⁺ e Zn⁺⁺ na forma de cloretos, concluíram que a composição de iônios intercambiáveis no esporo determinou a necessidade ou não de eletrólitos fortes exógenos para a germinação. Também, indicaram que a fase iônica do esporo pode ser relacionada com o efeito de eletrólitos fortes, junto com alanina e inosina. Rode (1968) encontrou dois tipos de esporos de B.megaterium: um que germinava com glicose e nitrato de potássio e que tinha mais catiônios intercambiáveis ligados fracamente (tais como Ca) em comparação com outro que germinava em alanina mais inosina. Isto sugere uma relação entre o sistema de germinação fisiológica requerido por um esporo e os iônios que podem intercambiar.

Riemann (1963) explicando um modelo de germinação com Ca-DPA, assinalou que o esporo atuaria como uma resina insolúvel de intercâmbio iônico, na qual os materiais solúveis estariam fortemente quelados a uma matriz insolúvel não podendo ser liberados em água enquanto o esporo encontrava-se dormente. Quando um quelante, como Ca-DPA, era adicionado, os complexos quelados dos esporos eram afetados liberando DPA e mudando a permeabilidade do esporo dormente, iniciando-se a germinação.

Foerster & Foster (1966) produziram esporos a partir de células vegetativas de B.megaterium lavadas e suspensas em água deionizada, suplementada com CaCl₂, SrCl₂ e BaCl₂ (esporulação endotrófica). Verificaram diferenças -

significativas na velocidade de germinação dos esporos. Os esporos com Ca^{++} germinaram mais rapidamente que os com Sr^{++} e Ba^{++} , os com Ca^{++} e Sr^{++} não necessitavam de ativação térmica. Concluíram que os catiônios bivalentes, eram os mais efetivos para condicionar o esporo para germinar, e aparentemente são os únicos capazes de suportar a formação de esporos endotroficamente.

Wax, Freeze & Cashel (1967) encontraram mutantes de B. subtilis que podiam germinar por adição de glicose, potássio e/ou amônio. Quando potássio e amônio eram substituídos por sódio, produzia-se uma diminuição da germinação. Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} não tiveram efeito.

A ação de iônios na germinação, também, tem sido reportada como inibidora. Gollakota & Halvorson (1960) - encontraram que zinco, cobalto e níquel inibiam a germinação de esporos de B. cereus, e que esse efeito podia ser revertido por ácido alfa-picolínico. Desrosier & Heiligman (1956) relataram os seguintes compostos como inibidores da germinação de B. coagulans: arseniato de sódio, fluoreto de sódio, ácido iodo-acético e 2,4, dinitrofenol.

3.4. Crescimento pós-germinativo

3.4.1. Definição. O crescimento pós-germinativo compreende as mudanças que se produzem no esporo depois da germinação. É um processo biossintético, caracterizado por uma alta atividade enzimática e síntese de novas proteínas (Keynan & Halvorson, 1965, Riemann, 1963) e que culmina com a primeira divisão celular (Rousseau e outros, 1972).

Segundo indicaram Prentice & Cleg (1974) o crescimento pós-germinativo é um processo mais complexo que a germinação; as suas temperaturas ótimas são diferentes (Keynan & Halvorson, 1965) e as necessidades nutricionais para o crescimento pós-germinativo são, em geral, mais complexas do que para a germinação e o crescimento vegetativo (O'Brien & Campbell, 1957).

3.4.2. Fases e mudanças do crescimento pós-germinativo. Hyatt & Levinson (1957) relataram 4 fases do crescimento pós-germinativo, caracterizadas pelas mudanças morfológicas, que são: (1) entumescimento, (2) emergência, (3) alongamento e (4) divisão celular, segundo estes autores, cada uma delas parece ter requisitos nutricionais diferentes. Rousseau e outros (1972) estudaram a germinação e o crescimento pós-germinativo de esporos de S.cerevisae em microscópio eletrônico e de contraste de fase, registrando as seguintes mudanças: aumento do tamanho da célula (entumescimento) e alteração da forma (forma de pera), aumento súbito de absorvância, aumento progressivo da massa celular, alargamento da célula e aumento da irregularidade superficial, formação do broto e formação de carboidratos solúveis em hidróxido de potássio. Até o momento as mudanças fisiológicas do crescimento pós-germinativo não tem sido estudadas exaustivamente. O assunto que tem merecido maior atenção desta fase do crescimento, de organismos esporulados tem sido a alta atividade biossintética que o caracteriza. Esta atividade tem sido demonstrada pela velocidade de assimilação de uracil e aminoácidos marcados com C-14 e outros elementos radioativos (Keynan & Halvorson, 1965); Torriani & Levinthal, 1967; Rodenberg e outros, 1968; Kobayashi e outros, 1965).

Torriani & Levinthal (1967) estudaram a síntese de proteína em esporos de B.cereus durante a germinação e o desenvolvimento pós-germinativo e apresentaram um modelo em que a síntese de proteína ocorre durante três fases distintas: a primeira, na germinação com formação de umas poucas proteínas; na segunda, produz-se um aumento na velocidade e quantidade de proteína sintetizada no início do crescimento pós-germinativo, e a terceira, ao final desta mesma fase, em que a velocidade de síntese é similar a da célula vegetativa. Estes autores, assinalam que, na prática, a germinação pode ser estudada separadamente do crescimento pós-germinativo mediante o uso de meios favoráveis à germinação, porém que lhes falte algum nutriente necessário

para o crescimento pós-germinativo, ou com inibidores específicos de síntese de macromoléculas.

Rodenberg e outros, (1968) relataram que a adição de um suplemento completo de aminoácidos e uracil a um meio otimizado para B.cereus, suportou altas velocidades de síntese de ácidos ribonucléicos e proteínas, durante o desenvolvimento pós-germinativo. Kobayashi (1965) relatou que além da síntese de macromoléculas, no crescimento pós-germinativo, sintetizavam-se novas enzimas que antes não existiam no esporo dormente.

3.4.3. Efeito de iônios no crescimento pós-germinativo.

A ação de iônios no crescimento pós-germinativo não tem sido até agora investigada profundamente. Existem apenas alguns poucos trabalhos a respeito, em grande parte investigando a germinação e o crescimento pós-germinativo em conjunto.

Fujioka & Frank (1966) estudaram os requerimentos nutricionais para germinação, crescimento pós-germinativo e crescimento vegetativo de esporos de P.A. 3679 em um meio quimicamente definido, concluindo que K^+ e cisteína eram necessários para emergência ; Na^+ para alongação e certos aminoácidos, como cisteína e valina para a divisão celular. Para o crescimento vegetativo, no entanto, foram necessários aminoácidos, glicose, $MgSO_4$, $FeSO_4$ e $MnSO_4$, K_2HPO_4 e Na^+ .

Hyatt & Levinson (1957) estudaram o crescimento pós-germinativo de B.megaterium e encontraram que o $MnSO_4$ estimulava a germinação, uma investigação mais profunda levou-os a conclusão de que o iônio Mn^{++} era necessário para a germinação enquanto que o iônio SO_4^{--} era necessário para a fase de alongamento do esporo durante o crescimento pós-germinativo. O sulfato podia ser substituído por compostos que continham enxofre. Estes mesmos autores testaram o efeito inibidor de vários metais, encontrando que apenas Ni^{++} e Co^{++} tinham efeito inibidor. O cobalto interferia com as mudanças que ocorriam antes da emergência; e níquel inibia todas as fases do crescimento pós-germinativo. Os dois iônios não ini

biam a germinação.

Labbe & Duncan (1970) estudaram a inibição do crescimento de esporos de Cl.perfringens por níveis comerciais de nitrito de sódio (0,2% residual máximo) a fim de determinar se a inibição ocorria a nível de germinação ou de crescimento pós-germinativo. Verificaram que este sal afetava o crescimento pós-germinativo de esporos sensíveis e resistentes ao calor. A germinação podia ocorrer a concentrações maiores do sal.

Vinter e outros (1969) estudaram o efeito do nível de catiônios externos bivalentes em concentrações de 0,2 a 0,5M adicionados em forma de cloretos ao meio de germinação, sobre o crescimento pós-germinativo e a germinação. Estes autores encontraram que, para esporos enriquecidos com Ca-DPA, as altas concentrações de Ca^{++} externo (0,4 a 0,5M) inibiam a germinação e o crescimento pós-germinativo; com 0,2M de Ca adicionado, o esporo germinava e crescia. Altas concentrações de $SrCl_2$ e $MgCl_2$ (0,5M) também tinham um efeito similar ao Ca^{++} . NaCl não tinha influência sobre a germinação, porém, em altas concentrações afetava o crescimento pós-germinativo. A adição de catiônios e aniônios bi e monovalentes após a germinação inibiam o crescimento pós-germinativo. Esporos deficientes em CaDPA eram capazes de germinar normalmente em 0,5M de $CaCl_2$, onde a germinação de esporos ricos em CaDPA falhavam. No entanto o crescimento pós-germinativo era inibido em ambos os casos.

M A T E R I A L E M É T O D O S

BACTÉRIA: Para todas as experiências utilizou-se Bacillus coagulans 56-186A da coleção de microorganismos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, fornecido pela National Canners Assotiation U.S.A. Inicialmente, partiu-se de uma suspensão pura de esporos do mencionado bacilo, e para as experiências seguintes manteve-se em estoque a 6°C uma suspensão aquosa de esporos limpos em frasco Erlenmeyer provido de tampão de algodão e com pérolas de vidro em seu interior para facilitar a agitação. Tratando-se de uma bactéria termófila utilizou-se em todas as experiências 55°C como temperatura de incubação com exceção de alguns casos que serão indicados.

M A T E R I A L

Empregou-se material de vidro, esterilizado a 160°C por 1 hora em estufas ou a 121°C por 15 minutos em autoclave, antes de cada experiência.

Os seguintes aparelhos e instrumentos também foram usados:

- Banho para tratamento térmico a temperatura constante; tratava-se de um banho com controle automático de temperatura e agitação mecânica constante do líquido, mediante um agitador de palhetas. O aparelho é provido de relê e termostato de mercúrio com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Um termômetro adicional foi colocado junto ao material a ser aquecido para controlar a uniformidade da temperatura.
- Microscópio de campo claro Carl Zeiss, objetiva Apocromática 100x.
- Microscópio de fase Nikon - Modelo L-Ke, objetiva 40xDLL.
- Balança analítica de precisão com compensação de tara, - Mettler H 35.

- Centrífuga refrigerada, modelo B 20A da International Equipment Co.
- Vibrador ultrasônico tipo banho da Heat Systems Ultrasonic.
- Contador de Colonias da Erma.
- Potenciômetro Corning Digital 110, de escala expandida e resolução de - 0,01 pH (0,001pH expandido).
- Bomba de vácuo miniatura da Millipore.
- Espectrofotômetro Spectronic 20, da Bausch and Lomb, equipado com estabilizador automático.
- Congelador Ultra Low Revco.
- Liofilizador de bandeja da Virtus Co.

M É T O D O S

1.- Teste de crescimento em diferentes meios.

Foram testados três meios diferentes, cuja composição é dada no apêndice nº 1. Estes meios foram: caldo de glicose triptona ou dextrose triptone broth "Difco" (DTB) recomendado pela National Cannery Association (NCA, 1968) e a American Public Health Association (APHA, 1966) para subcultura de termófilas e termófilas facultativas; termoacidurans - agar modificado (TAM) e meio de tomate (MT-50%). O período de incubação para todos os testes de crescimento foi de 72 horas.

Para testar o crescimento em meio DTB, tomou-se uma amostra equivalente a 0,5 ml de suspensão de esporos e B.coagulans 56-186A transferindo-a com pipeta a um tubo com tampão de algodão, esterilizado contendo 10 ml de meio DTB. Os esporos do tubo foram ativados em banho de temperatura controlada a 80°C por 5 minutos, resfriando-se, a seguir, em um copo Beaker com água fria para ser posteriormente incubado.

O crescimento nos tubos foi observado pela tur-

bidez ou mudança de cor do meio de violeta e amarelo, devido a produção de ácido. Para confirmar os resultados e obter uma quantidade suficiente de cultura a ser usada como inóculo na produção de esporos, transferiu-se 1 ml da cultura dos tubos acima a cada um dos 4 frascos Erlenmeyer de 250cc, contendo cada um 150 ml de meio DTB estéril. Estes frascos foram incubados para posterior observação. O crescimento em meio TAM foi observado em tubos com tampão de algodão contendo cada um deles 10 ml de meio solidificado em forma inclinada, e inoculados com a suspensão ativada de esporos, utilizando alça de platina.

No caso do meio MT-50%, distribuiu-se 40 ml deste meio em cada uma das 4 garrafas de 200 ml de capacidade. As garrafas foram arrolhadas com algodão e esterilizadas colocando-se a seguir em posição inclinada para solidificação do meio. Transferiu-se, então, o inóculo com pipeta estéril, correspondendo a cada garrafa 1 ml de suspensão de esporos - ativados, e depois foram levadas a incubação.

2.- Produção , colheita e limpeza de esporos.

a) Produção: A fim de obter uma produção abundante de esporos , suficiente para todos os testes a serem realizados e para determinar o meio mais eficiente para promover a esporulação, foram testados os seguintes meios: TAM indicado por Stumbo (1965) como meio de esporulação de termófilas e MT a 10 e a 50% (ver composição no apêndice nº 1).

A experiência com TAM realizou-se da seguinte maneira: foram distribuídos 40 ml do meio em cada uma das 20 garrafas de vidro de 200 ml de capacidade, fechando-as com rolhas de algodão. As garrafas foram esterilizadas em autoclave, deixando-as, a seguir, solidificar o meio em forma inclinada. Dos frascos Erlenmeyer inoculados com cultura ativada em meio DTB, onde o crescimento tinha sido mais abundante, transferiu-se com pipeta, 2 ml para cada garrafa com meio TAM tomando-se cuidado para que a distribuição do inóculo seja uniforme. As garrafas foram incubadas na posição in-

clinada.

A inoculação em garrafas com meio MT foi feita da mesma forma que para o meio TAM, utilizando-se neste caso 10 garrafas com meio MT-10% e 10 com meio MT-50%. O tempo de incubação foi de 9 dias em ambos os casos.

Para observar ao microscópio a produção de esporos fizeram-se lâminas úmidas cada dois dias da seguinte forma: colocou-se em uma lâmina limpa uma alçada da amostra a ser observada e adicionou-se uma gota de água estéril, cobrindo-se então com uma lamínula. As bordas da lamínula foram vedadas com parafina mediante um bastão de vidro aquecido e embebido nessa substância, evitando desta forma o deslocamento do líquido. A observação foi feita em microscópio de fase a 400X e 1000X de aumento.

b) Colheita: Quando a esporulação mostrou ser mais de 80% calculada pela observação microscópica, foi feita a colheita dos esporos da seguinte forma: adicionou-se 5 ml de água destilada estéril a cada garrafa, agitando-se para desprender as colônias e recolhendo, a seguir, a suspensão obtida de cada garrafa, em um frasco Erlenmeyer de 500 ml estéril. Adicionou-se novamente 2 ml de água destilada estéril a cada garrafa para retirar as colônias remanescentes da superfície, misturando-se, então, esta suspensão com a da primeira colheita. A suspensão assim obtida foi denominada de suspensão bruta e foi armazenada a 6°C para logo ser submetida a limpeza.

c) Primeira Limpeza: No presente caso, os resíduos e solutos do meio de esporulação foram eliminados por centrifugação e lavados com água destilada estéril, da seguinte maneira: distribuiu-se a suspensão bruta em tubos de centrifuga estéreis completando-se com água destilada até dois terços do volume do tubo, submetendo-os a centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm (aproximadamente 9.000g). O sobrenadante dos tubos foi desprezado, adicionando-se ao precipitado água destilada estéril e agitando-se para ressuspender os es

poros e para remover os solutos. Esta operação foi repetida três vezes.

Para eliminar as células vegetativas da suspensão de esporos foi seguida a seguinte marcha: inicialmente completou-se o resíduo da centrifugação a 80 ml, com água - destilada estéril. A seguir, ajustou-se o pH a 11,0 com NaOH 2N e adicionou-se 0,024 g de lisozima (Difco), conforme a recomendação de Stumbo (1965).

Para favorecer a ruptura das células vegetativas, colocou-se a suspensão contendo lisozima por 5 minutos em um agitador ultrasônico, centrifugando-se a seguir por 10 minutos a 10.000rpm (aproximadamente 9.000g), eliminando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspense em 60 ml de água estéril e colocado em frasco Erlenmeyer com pérolas de vidro para facilitar a agitação. Esta suspensão, denominada LI, foi armazenada a 6°C para ser usada em experiências posteriores.

d) Segunda Limpeza: Prêviamente aos testes de germinação, e a fim de retirar praticamente todas as células vegetativas remanescentes na suspensão LI, foi feita uma segunda limpeza de esporos seguindo-se o método de limpeza de Fields (1975). As enzimas empregadas foram lisozima e tripsina (Difco). Uma vez feita a limpeza, para testar a suspensão quanto a presença de células vegetativas, foi feita coloração de esporos pela técnica de Fields (1975). A suspensão resultante desta segunda limpeza foi armazenada a 6°C e denominada SLI. A contagem dos esporos desta suspensão foi feita por diluição e semeadura em placas, usando-se meio DTA como meio de subcultura, e incubando-se as placas por 48 horas.

3.- Contagem de esporos.

A população inicial de esporos da suspensão LI foi contada depois de aplicar calor suficiente para ativá-los. Empregaram-se duas técnicas comuns para enumerar os esporos: (a) diluição e semeadura em placas e (b) número mais

provável (NMP).

a) Diluição e semeadura em placas: para essa técnica foram estabelecidas as seguintes condições:

i - tempo e temperatura de ativação = 10 a 60 minutos, com intervalos de 10 minutos, a 80°C;

ii-tempo e temperatura de incubação = 48 horas a 55°C;

iii-meio de contagem : meio glicose triptona agar (DTA)-(ver composição em apêndice nº 1);

iv-grau de diluição da suspensão: suficiente para obter 30 a 300 colônias por placa;

v -meio de diluição adequado: água destilada e

vi-asepsia constante durante todas as fases de trabalho.

A técnica usada foi a seguinte: distribuiu-se 1 ml de suspensão LI em cada um dos 6 tubos de cultura arrolhados com algodão, contendo 9 ml de água destilada estéril. Estes tubos foram levados ao banho com temperatura controlada a 80°C para ativação dos esporos, e a cada intervalo de tempo pré-estabelecido, retirou-se um tubo, o qual foi resfriado rapidamente em um copo Beaker com água fria. A seguir fizeram-se diluições decimais sucessivas transferindo 1 ml da suspensão para tubos rosqueados contendo 9 ml de água estéril. Para a semeadura em placas das 4 últimas diluições, pipetou-se 1 ml para cada placa de Petri e adicionou-se o meio de contagem, aproximadamente 20 ml de meio liquefeito e resfriado para cada placa, deixou-se solidificar o meio incubando-se, a seguir, as placas invertidas. Foi feita a contagem direta de colônias às 24 e 48 horas. Os resultados foram expressos em número de esporos por ml de suspensão LI, tomando-se a média da contagem das duas placas por diluição, contendo 30 a 300 colônias cada. Esta experiência foi repetida duas vezes.

b) Número mais provável (NMP). Testaram-se neste caso 2 meios de aquecimento: (1) água e (2) suco de tomate 1:1. A técnica consistiu em diluir a suspensão de esporos antes da ativação, de modo que se obtém um esporo ou menos por unidade de tubo com meio de aquecimento. A seguir foi feita a ati

vação térmica em alíquotas de uma unidade de volume e após a ativação adicionou-se o meio de subcultura e incubou-se para permitir o crescimento da bactéria. A contagem foi obtida mediante a relação entre tubos de subcultura positivo - quanto ao crescimento e aqueles negativos.

1) NMP de esporos suspensos em água: foram feitas diluições decimais sucessivas a partir de 1 ml da suspensão LI. Depois da quarta, sexta e oitava diluição, foram feitas agitações ultrasônicas de 3 minutos cada uma, para assegurar a distribuição homogênea dos esporos nos tubos. Desta maneira obteve-se uma suspensão com uma população com a média prevista de 1 esporo/ml. Esta suspensão foi distribuída com pipeta em 60 tubos de cultura vazios estéreis, arrolhados com algodão, colocando-se 1 ml em cada tubo, tomando-se cuidado para que a suspensão a ser colocada nos tubos, não se deposite nas paredes dos mesmos.

As condições estabelecidas para esta contagem foram similares as da contagem em placas com ligeiras variações, ou seja:

- i - tempo e temperatura de ativação: 10 a 60 minutos, com intervalos de 10 minutos, a 80°C;
- ii- tempo e temperatura de incubação: 10 dias a 55°C;
- iii- meio de subcultura: DTB;
- iv- meio de aquecimento: água destilada estéril e
- v - assepsia constante durante todas as fases do trabalho.

Ativaram-se séries de 10 tubos para cada tempo no banho com temperatura controlada a 80°C. Retirou-se de uma só vez toda uma série após o intervalo de aquecimento pré-fixado, resfriando-se os tubos em copo Beaker com água fria, e em cada tubo, foi adicionado 9 ml de meio de subcultura. O meio adicionado foi previamente esterilizado em tubos com tampão de algodão, contendo cada um 9 ml de meio, de maneira que para cada tubo com suspensão ativada existia um tubo de meio de subcultura o qual era adicionado ao tubo com suspensão ativada, diminuindo-se assim os riscos de contaminação. Após a incubação, o aspecto de crescimento posi-

tivo foi indicado pela turbidez e mudança de cor do meio de violeta a amarelo, resultante do crescimento e produção de ácido. A contagem por NMP, foi repetida 3 vezes; os resultados foram expressos como número de tubos positivos de cada dez tubos correspondentes a um tempo de ativação. A população de esporos para cada tempo foi calculado mediante a equação de Halvorson & Ziegler (1932), que é a seguinte:

$$\bar{X} = 2,303 \log n/q, \text{ onde:}$$

\bar{X} = número mais provável (NMP) de esporos por ml de suspensão aquecida;

a = volume em ml de cada amostra aquecida;

n = número de tubos sujeitos a cada combinação tempo e temperatura;

q = número de tubos sujeitos a cada combinação tempo e temperatura, que deram resultado negativo ao crescimento em subcultura.

2). NMP de esporos suspensos em suco de tomate 1:1. Determinou-se a população inicial de esporos ativados e o tempo ótimo de ativação em uma suspensão de esporos usando como meio de aquecimento suco de tomate 1:1 em substituição a água destilada esterilizada.

Para preparar a suspensão em suco de tomate diluiu-se e ajustou-se em água esterilizada, uma alíquota da suspensão LI até obter uma população de 10 esporos/ml. Tomou-se 10 ml desta suspensão ajustada, e em uma proveta estéril foram adicionados a 40 ml de água destilada estéril e 50 ml de suco de tomate duplamente concentrado. A suspensão assim obtida foi transferida a um frasco Erlenmeyer de 250 ml, estéril e provido de um tampão de algodão, agitando-se com ultrassom por 5 minutos para homogenizar.

As condições de ativação, meio de subcultura e temperatura de incubação foram as mesmas do ensaio com a suspensão aquosa. Apenas o tempo de incubação foi reduzido a oito dias. Pelo fato da mudança de cor do meio não ser um indi

cativo suficientemente claro do crescimento, pela interferência da cor do suco de tomate, mediu-se o pH depois do período de incubação, considerando-se positivos aqueles tubos que apresentaram um pH inferior a 5,0 e negativos os tubos com pH superior ou igual a 5,0. O pH do suco de tomate concentrado foi ajustado para pH 5,1 antes da esterilização. A população de esporos para cada tempo foi calculada do mesmo modo que para a suspensão aquosa. Esta experiência foi repetida 3 vezes.

4.- Determinação da resistência térmica de Bacillus Coagulans 56-186A a 93°C.

Foi determinada a resistência térmica em: (a) suspensão aquosa de esporos e (b) suspensão de esporos em suco de tomate 1:1.

(a) Em suspensão aquosa de esporos : foi usada uma variação do método do tubo não selado (Schmidt, 1950) empregando-se tubos arrolhados com algodão como recipiente a ser submetido ao tratamento térmico, e aquecidos em um banho com temperatura controlada em lugar de aquecimento ao vapor. Para esfriá-los, usou-se um copo Beaker com água fria como substituto do esfriamento em água sob pressão. A suspensão aquosa de esporos, denominada LI_1 , usada nesta experiência foi obtida por diluição a partir da suspensão LI e foi ajustada a uma população de $1,0 \times 10^6$ esporos / ml.

A contagem de sobreviventes após o tratamento pelo calor foi feita usando as duas técnicas já indicadas anteriormente, isto é: diluição e semeadura em placas e NMP. No primeiro caso, o meio de subcultura foi DTA e no segundo DTB.

O tratamento térmico para aplicar na técnica da diluição e semeadura em placas foi dado como segue: distribuiu-se 1,5 ml de suspensão aquosa ajustada LI_1 em cada um dos 48 tubos arrolhados com algodão e estêreis. Colocaram-se os tubos no banho a 93°C e retiraram-se 4 tubos a cada tempo pré-estabelecido. Os tempos escolhidos para aquecimento foram de 40 a 150 minutos, variando de 10 em 10 minutos.

A semeadura em placas foi feita retirando-se 1 ml de um tubo e transferindo-o a uma placa de Petri estéril. As 48 placas assim obtidas adicionou-se meio DTA, agitando-se a seguir para distribuição uniforme do inóculo e uma vez solidificado o meio foram incubadas invertidas por 48 horas. Foi feita a contagem cada 24 horas no contador de colônias. A população de sobreviventes para cada tempo foi obtida calculando-se a média das contagens obtidas após 48 horas nas 4 placas.

O tratamento térmico utilizado para a técnica de NMP foi como segue: distribuiu-se 1 ml da suspensão ajustada em cada um dos 120 tubos vazios arrolhados com algodão e estêreis. A seguir, todos os tubos foram levados ao banho de temperatura controlada a 93°C. Os tempos de aquecimento foram os mesmos utilizados na técnica de diluição e semeadura em placas; a cada tempo, retirou-se uma série de 10 tubos de uma só vez, esfriando-os imediatamente e adicionando a cada um deles o conteúdo de um tubo com 9 ml de meio DTB esterilizado. O tempo de incubação foi de 12 dias, sendo o número mais provável de sobreviventes determinado pela mesma técnica já indicada para a contagem de esporos por NMP.

(b) Em suspensão de esporos em suco de tomate 1:1. Preparou-se uma suspensão de esporos, em suco de tomate diluído à concentração natural, ajustando-se a uma população de $1,0 \times 10^6$ esporos/ml. Distribuiu-se em tubos arrolhados com algodão e estêreis, submetendo-os a tratamento térmico no banho por 40, 60, 80, 100, 120 e 140 minutos, e procedeu-se do mesmo modo que para a determinação da resistência da suspensão aquosa. O meio de subcultura foi DTB e o tempo de incubação foi de 8 dias. O critério adotado para estabelecer os tubos positivos e a população de sobreviventes foi o mesmo que para a contagem de esporos por NMP em suspensão de suco de tomate.

5.- Teste de anaerobiose.

Distribuiu-se com pipeta 1,5 ml da suspensão aquosa LI₁ em cada um de 12 tubos tampados com algodão e es-

têreis. Foi dado tratamento térmico a 93°C por 100, 110 e 120 minutos, retirando-se a cada tempo de aquecimento 4 tubos do banho e esfriando-os imediatamente em copo Beaker com água fria. Um ml de cada tubo foi transferido para outro tubo vazio e estéril, adicionando, a seguir, 9 ml do meio DTA. Após solidificação foram incubados por 48 horas e foi feita contagem direta nos tubos, observando-se as mudanças de coloração.

6.- Determinação da influência da adição de 1,5% de ágar ao meio DTB, sobre o número de tubos positivos obtidos na contagem por NMP.

Ativou-se uma suspensão de esporos ajustada a 1 esporo/ml, durante 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos a 80°C e a seguir, aplicou-se a técnica do NMP para a contagem como já foi descrito. A subcultura foi conduzida em meio DTB ao qual tinha-se adicionado 1,5% de ágar (Difco), mantendo os outros componentes do meio invariáveis. O meio preparado foi distribuído em tubos tampados com algodão e esterilizados. Estes tubos foram mantidos em banho a 47°C para evitar a solidificação antes de serem usados. Após a inoculação e solidificação os tubos foram incubados por 8 dias antes de proceder a observação.

7.- Determinação da influência da variação na concentração de ágar adicionado ao meio DTB.

Prepararam-se seis meios com diferentes porcentagens de ágar, adicionado ao meio DTB.

Estes meios foram:

| | |
|-----------------------|-------------------|
| 600 ml de DTB (Difco) | 0,1% ágar (Difco) |
| 600 ml de DTB (Difco) | 0,3% ágar (Difco) |
| 600 ml de DTB (Difco) | 0,6% ágar (Difco) |
| 600 ml de DTB (Difco) | 1,0% ágar (Difco) |
| 600 ml de DTB (Difco) | 1,5% ágar (Difco) |
| 600 ml de DTB (Difco) | 2,0% ágar (Difco) |

Todos estes meios foram esterilizados em tubos tampados com algodão contendo cada tubo 9 ml de meio. Após a esterilização, os tubos dos dois últimos meios mencionados foram colocados em banho a 47°C para manter o meio líquido antes de ser transferidos a suspensão ativada. Ativou-se as suspensões de esporos, ajustadas a 1 esporo/ml durante 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos a 80°C. A cada suspensão ativada foi adicionado um dos meios acima indicados. O período de incubação foi de 15 dias. A técnica de NMP foi usada para a contagem.

8.- Determinação do efeito da adição de amido, ácido etileno diaminotetracético (EDTA), extrato solúvel de agar, extrato solúvel calcinado de agar, e agar lavado ao meio DTB.

Todos estes compostos foram adicionados individualmente ao meio DTB. O extrato solúvel de ágar, o extrato solúvel calcinado de ágar e o ágar lavado foram adicionados ao meio na proporção equivalente a 1,5% de ágar original. O amido foi adicionado a 0,5% e 0,1%, o EDTA em concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80 ppm.

Antes das experiências foram preparados o extrato solúvel de ágar, o extrato solúvel calcinado de ágar e o ágar lavado da seguinte forma:

(a) Preparação do extrato solúvel de ágar. Preparou-se um litro de solução aquosa de ágar comum Difco a 3%, e deixou-se congelar em um Beaker de plástico coberto, durante dois dias em congelador a -36°C. Retirou-se e triturou-se em um almofariz de porcelana, a seguir foi filtrado em um funil de Buchner com o auxílio de uma bomba de vácuo. O resíduo foi lavado com um litro de água destilada. Coletou-se o filtrado e a água de lavagem obtendo-se desta maneira uma solução dos solúveis do ágar com uma concentração equivalente a solução de 1,5% de ágar. Utilizou-se um litro desta solução em substituição de água na preparação do meio DTB + extrato solúvel de ágar equivalente a 1,5%.

(b) Preparação do extrato solúvel calcinado de ágar. Preparou-se meio litro de extrato solúvel de ágar equivalente a 1,5% na forma indicada acima e concentrou-se por calor até se obter 100 ml, distribuiu-se em duas placas de Petri e se levou a um liofilizador de bandeja por 48 horas, as escamas obtidas após liofilização foram trituradas e levadas a uma mufla por 24 horas a 500°C. As cinzas foram dissolvidas em HCl 1N e neutralizados com NaOH 1N. Adicionou-se água até completar 500 ml. Esta solução foi empregada na preparação de meio litro de meio DTB + extrato solúvel calcinado de ágar equivalente a 1,5%.

(c) Preparação de ágar nobre lavado. Preparou-se um litro de ágar nobre em solução aquosa a 1,5% e deixou-se solidificar, a seguir cortou-se em cubos de aproximadamente 1,5 cm de lado, os cubos foram colocados em uma sacola plástica lavada e perfurada a qual foi submersa em um tanque de vidro cheio de água destilada submetida a circulação por um agitador, acionado por um motor elétrico, permanecendo assim por 4 dias. A água de lavado era trocada diariamente. Após o quarto dia retiraram-se os cubos de ágar, e foram redissolvidos por aquecimento em banho maria. Se usou esta solução para preparar o meio DTB + ágar nobre lavado.

Os meios, uma vez preparados, tiveram seu pH ajustados a 6,7 com NaOH 1N e foram distribuídos em tubos com tampões de algodão e esterilizados em autoclave.

A seguir, e para cada meio, ativou-se durante 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos a 80°C uma suspensão de esporos ajustada por diluição a uma população de 1 esporo/ml, a partir da suspensão LI. Após o esfriamento da suspensão - foi adicionado o meio, correspondente ao tratamento e incubou-se por 12 dias os tubos com esporos ativados e meio experimentalizado.

9.- Determinação da germinação de esporos de B.coagulans

56-186A

Foi usada uma suspensão ajustada a uma popula -

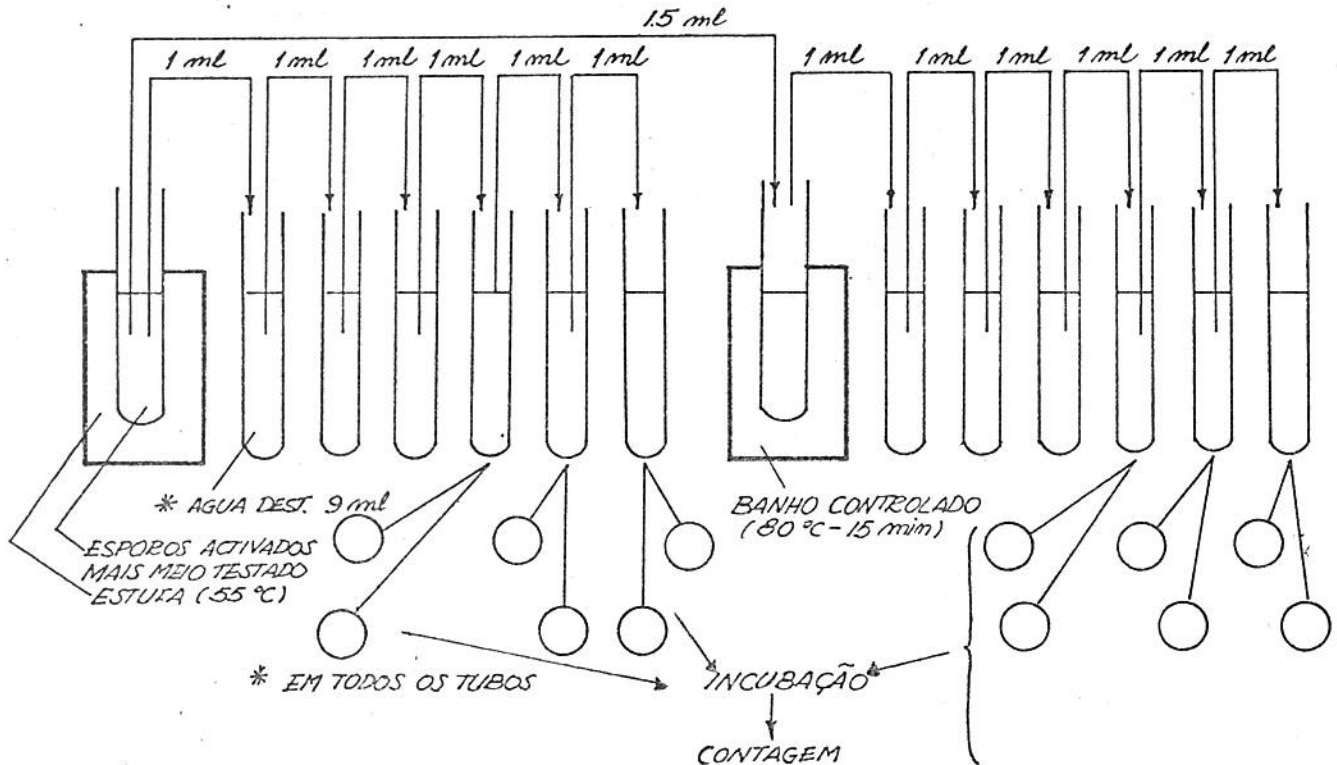
ção de 5×10^7 esporos/ml, diluindo-se a partir da suspensão SLI, esta suspensão ajustada foi distribuída em 9 tubos (1 ml cada) e ativada por tratamento a 80°C durante 40 minutos. Os meios testados foram DTB, DTB + extrato solúvel de ágar - equivalente a 1,5% e DTB + Fe^{++} equivalente a 5 ppm. Dos 9 tubos com esporos ativados 3 foram testados com meio DTB, 3 com DTB + extrato solúvel de ágar e 3 com DTB + Fe^{++} equivalente a 5 ppm. 9 ml do meio correspondente foi adicionado em cada tubo. A germinação foi medida utilizando-se os seguintes parâmetros:

- (a) Perda da resistência térmica;
- (b) Decréscimo da absorbância;
- (c) Perda da refractibilidade observada em microscópio de fase.

Os métodos usados para medir estes parâmetros - foram os de Campbell (1957) e Gould (1971) como indicados em Fields (1975). A seguir os tubos foram incubados em estufa de 55°C por um tempo que varia de acordo ao método empregado. Um esquema de cada método é apresentado a seguir:

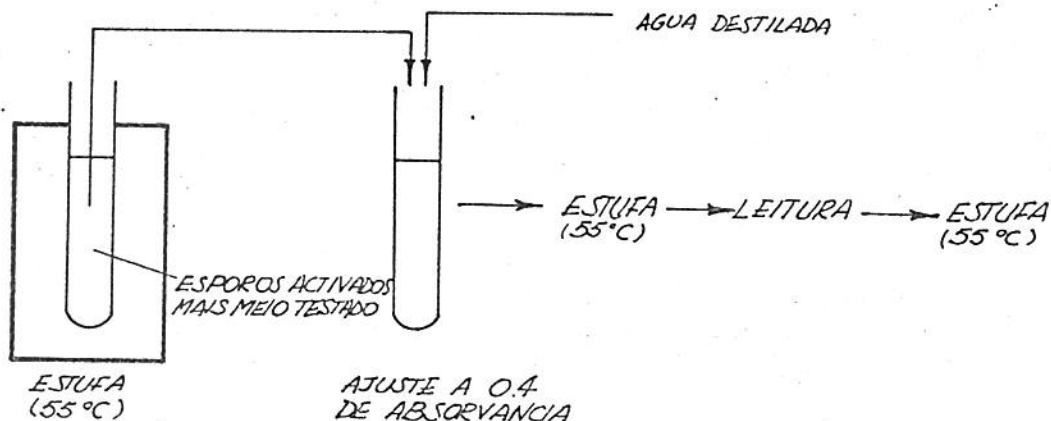
- (a) Determinação da perda da resistência térmica: realizaram-se determinações na 2^a, 5^a e 10^a hora de incubação nos meios testados. O choque térmico para destruição dos esporos germinados foi de 15 minutos a 80°C . A porcentagem de germinação foi calculada pela equação de Campbell (1957):

$$\%G = \frac{\text{Contagem depois do choque térmico}}{\text{Contagem antes do choque térmico}} \times 100.$$



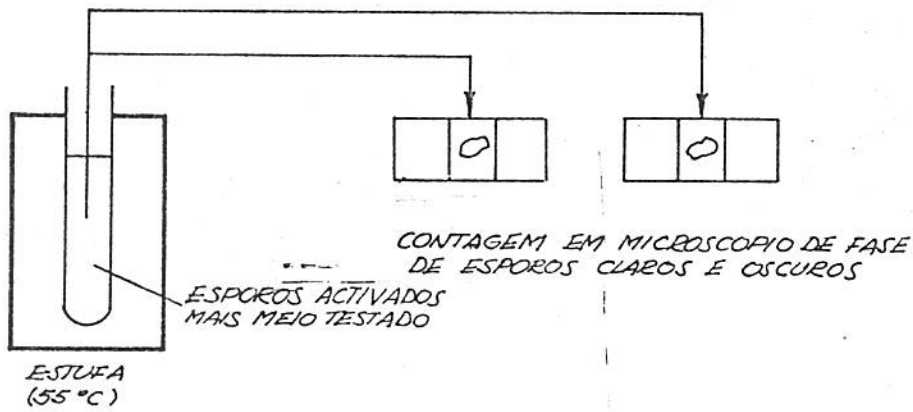
(b) Determinação do decréscimo da absorbância: seguiu-se o decréscimo da absorbância durante as primeiras 10 horas de incubação, usando-se um espectrofotômetro a 590nm. No tempo zero, ajustou-se a leitura da suspensão a 0,4 com água destilada estéril; durante a primeira meia hora fizeram-se leituras cada 10 minutos, e posteriormente, a cada meia hora. Também, foram feitas leituras as 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. A porcentagem de germinação foi expressa pela equação seguinte:

$$\% G = \frac{\text{Leitura}}{0,4} \times 100 \quad (\text{Campbell, 1957})$$



(c) Determinação da perda de refractibilidade observada com microscópio de fase: as lâminas para microscópio de fase foram preparadas pelo método de Wolf & Thorley (1947). No microscópio, foram contados 500 esporos de cada vez, anotando-se separadamente aqueles que se tornaram escuros. Adotou-se o critério de Riemann- (1963), considerando aqueles esporos com refractibilidade reduzida, ainda que não estivessem totalmente escuros, como sendo esporos germinados. Durante as 10 horas de experiência, fizeram-se contagens com intervalos de uma hora. A porcentagem de germinação foi dada pela equação de Campbell (1957):

$$\%G = \frac{\text{Número de esporos escuros}}{\text{Número total de esporos(500)}} \times 100$$



10.- Determinação do efeito da adição de catiônios e aniônios ao meio DTB.

Foram adicionados ao meio DTB, catiônios e aniônios nas mesmas proporções em que eles estão presentes no ágar comum (Bacto-ágar Difco) a fim de determinar se algum deles exercia efeito favorável ao crescimento aumentando portanto, a contagem pela técnica do NMP.

As proporções em que estes catiônios e aniônios estão presentes no ágar, foram obtidas das análises fornecidas pelos laboratórios Difco:

| Bacto-ágar | Concentração | Bacto-ágar | % |
|------------|--------------|------------|-------|
| Cadmio | 0,0 - 0,5ppm | Cinza | 4,50% |
| Cromo | 0,0 - 0,1ppm | Cálcio | 0,13% |
| Cobalto | 0,0 ppm | Bario | 0,01% |
| Cobre | 0,5 - 1,5ppm | Sílica | 0,19% |
| Ferro | 1,5 - 5,0ppm | Cloreto | 0,43% |
| Chumbo | 0,0 - 0,5ppm | Sulfato | 2,54% |
| Magnésio | 210 - 430ppm | Nitrogênio | 0,17% |
| Manganês | 0,0 - 0,5ppm | | |
| Titânio | 0,0 ppm | | |
| Zinco | 5,10 ppm | | |

Os catiônios e aniônios testados no presente estudo foram:

Ca⁺⁺ adicionado em forma de Ca Cl₂.2H₂O
Ba⁺⁺ adicionado em forma de Ba Cl₂.2H₂O
SO₄⁼ adicionado em forma de Mn SO₄
Mg⁺⁺ adicionado em forma de Mg SO₄.7H₂O
Zn⁺⁺ adicionado em forma de Zn SO₄.7H₂O
Cu⁺⁺ adicionado em forma de Cu SO₄.5H₂O
Mn⁺⁺ adicionado em forma de Mn SO₄
Pb⁺⁺ adicionado em forma de Pb (CH₃COO)₂.3H₂O
Cr⁺⁶ adicionado em forma de Cr O₃
Fe⁺⁺ adicionado em forma de Fe SO₄.7H₂O
Fe⁺⁺ adicionado em forma de Fe Cl₂.4H₂O
Fe⁺⁺⁺ adicionado em forma de Fe Cl₃.6H₂O

Após a adição dos iônios, o pH foi ajustado a 6,7 e os meios distribuídos em tubos vazios, (9 ml em cada-tubo) arrolhados com algodão e esterilizados.

Prepararam-se assim 12 meios diferentes. Cada um destes meios foi empregado como meio de subcultura na de terminação do NMP de uma suspensão de esporos ativados a 80°C por 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos a qual tinha sido ajustada a 1 esporo/ml. Quando os resultados eram positivos, realizava-se uma segunda experiência confirmatória. O perío do de incubação em cada caso foi de 10 dias.

11.- Teste para estabelecer o efeito da variação da quantidade de Fe⁺⁺ adicionado ao meio de subcultura.

O sal empregado, FeSO₄.7H₂O foi adicionado ao meio em proporção equivalente a 5, 10, 20 e 100 ppm de ferro no ágar. Cada quantidade era separadamente adicionada a 1 lt de meio DTB, e, o pH era ajustado a 6,7. Uma vez esterilizados os meios em tubos tampados, foram utilizados para

subcultura de esporos ativados, usando a técnica do NMP para contagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.- Características da Cultura e Esporulação.

Nas tabelas 1 e 2 são apresentados os resultados dos testes iniciais de crescimento em meio DTB, TAM e MT-50%, e de produção de esporos em meio TAM, MT-50% e MT-10%. O Bacillus coagulans cresceu nos tres meios com formação de colônias morfológicamente típicas sendo que, nos dois últimos meios essas eram semelhantes às descritas por Smith, Gordon & Clark (1952). O meio com crescimento mais abundante foi o meio TAM, que conforme se verifica na tabela 2, foi o que apresentou maior porcentagem de esporulação.

TABELA 1: Teste de crescimento de Bacillus coagulans 56-186A nos diferentes meios de cultura

Temperatura e tempo de ativação: = 80°C por 5 minutos;

Incubação: = 72 horas a 55°C.

| Meios | Observações de Crescimento |
|---|---|
| Caldo de glicose Tryptona (DTB) | Crescimento positivo, indicado pela mudança de cor do meio de violeta para amarelo com turbidez e sedimentação. |
| Meio thermoacidurans ágar modificado (TAM) | Crescimento positivo e abundante, colônias arredondadas, brancas e opacas. |
| Meio de tomate (MT-50%) | Crescimento positivo, colônias arredondadas, branco amareladas. |

TABELA 2: Teste de produção de esporos de Bacillus coagulans 56-186A em diferentes meios

| Meios | Tempo de Incubação Dias a 55°C | Observações em lâminas de microscópio |
|---------------------------------------|-----------------------------------|--|
| Thermoacidurans ágar modificado (TAM) | 6 | 50% de esporulação. Esporos ovais, subterminais e terminais. |
| Thermoacidurans ágar modificado (TAM) | 9 | 80% de esporulação |
| Meio de tomate (MT-50%) | 6 | Ausência de esporos |
| Meio de tomate (MT-50%) | 9 | Ausência de esporos |
| Meio de tomate (MT-10%) | 6 | Encurtamento das células |
| Meio de tomate (MT-10%) | 9 | 40% de esporulação. Esporos ovais subterminais e terminais. |

A influência da porcentagem de suco de tomate adicionado ao meio MT pode ser observada na tabela 2, quando 50% de suco de tomate foi adicionado ao meio, registrou-se uma ausência de esporulação durante o período de incubação de 9 dias, enquanto que no mesmo período, registrou-se 40% de esporulação quando adicionou-se apenas 10% de suco. Isto pode ser explicado levando-se em conta que o meio MT-10% é mais pobre do que o meio MT-50% em nutrientes provenientes do suco de tomate e de acordo com Grelet (1957), as células vegetativas de certas espécies de Bacillus produzem esporos com consequência do esgotamento de nutrientes. Outra explicação seria que, quando são adicionadas altas porcentagens de suco de tomate, a concentração de sólidos é maior, principalmente

de certos açúcares que poderiam reduzir a esporulação (Stumbo, 1973).

2.- Contagem de Sobreviventes e Resistência Aparente.

A tabela 3 mostra as contagens da suspensão LI de esporos, obtidas pela técnica de semeadura em placas e por NMP em meio DTA e DTB, respectivamente, a diferentes tempos de ativação. Os resultados para o meio DTB estão apresentados como o número de tubos positivos de cada 10 tubos submetidos a cada combinação tempo e temperatura, utilizando-se como meio de aquecimento água e suco concentrado de tomate com diluição de 1:1 na ocasião do preparo do meio.

Em cada caso, a média da máxima contagem foi incluída, o que ocorreu após 40 minutos de ativação, este tempo representa o "tempo de ativação". A média da máxima-contagem obtida por diluição e semeadura em meio DTA foi 18 vezes maior que a média da contagem por NMP no meio DTB tanto quando se usou suspensão aquosa como em suco de tomate diluído a concentração original. Pode-se concluir, que o meio DTB não permite crescimento de muitos dos indivíduos - da população de esporos no inóculo.

TABELA 3: Comparação das contagens de esporos de Bacillus coagulans 56-186A, pela técnica de semeadura em placas, inoculando com diluição de 10^{-7} , e pelo número mais provável (NMP), inoculando com diluição de 10^{-9} em 10 tubos para cada tempo de ativação.

Temperatura de ativação = 80°C .

| Tempo de ativação (min.) | Contagem no meio DTA, por semeadu ra em placas | | Contagem no meio DTB, pelo NMP (número de tubos positivos) | | | | | |
|------------------------------------|--|-----|---|----|----|--|----|----|
| | Repetições | | Meio de aqueci mento : água | | | Meio de aqueci mento: suco de tomate | | |
| | 1º | 2º | 1º | 2º | 3º | 1º | 2º | 3º |
| 10 | 68 | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 101 | 108 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 93 | 123 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 40 | 187 | 164 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 50 | 136 | 135 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 60 | 67 | 62 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3' | 1 |
| Média da contagem a 40 min. | $1,8 \times 10^9/\text{ml}$ | | $0,1 \times 10^9/\text{ml}$ | | | $0,1 \times 10^9/\text{ml}$ | | |

' Valor não considerado na média.

Estudando o meio caldo de bromocresol e o meio bromocresol ágar empregados para subcultura de B. stearothermophilus, Evancho e outros (1974) encontraram uma situação semelhante: as contagens por NMP realizadas em caldo de bromocresol eram inferiores as obtidas em meio bromocresol ágar determinadas por semeadura em placas. Esses mesmos autores assinalaram que a composição do meio de subcultura afeta a recuperação de esporos. Em nossos ensaios, a contagem média com DTB, foi da ordem de 5,5% da contagem média com DTA, sendo que ambos os meios diferem em composição apenas pela presença de ágar no meio DTA.

O efeito da composição do meio de subcultura (DTB e DTA) e o efeito do meio de aquecimento (água e suco de tomate 1:1) sobre a resistência térmica aparente de esporos de Bacillus coagulans 56-186A pode ser visto na figura 1. Ne-la estão apresentadas as curvas de destruição térmica, e os valores D, calculados graficamente das curvas construídas de acordo com os dados experimentais obtidos. Em todos os casos, a população inicial foi de 1×10^6 esporos/ml, ajustado de acordo a contagem em meio DTA. O efeito da composição do meio de subcultura foi denominado de "efeito na resistência térmica aparente ao calor" por Murrell e outros (1950), por ser causado aparentemente por inibidores específicos presentes no meio. Alguns fatores do meio de subcultura que influenciam a contagem de sobreviventes e do valor D de B. coagulans 43P foram estudados por Yokoya & York (1965). Eles concluíram que uma pequena mudança na composição do meio ou mesmo uma variação do pH pode variar grandemente os valores destes parâmetros.

Nos ensaios realizados, a adição de 1,5% de ágar ao meio DTB, transformando-o em DTA produz um aumento do valor D de 31 a 68 minutos (curva A e C), sugerindo um efeito estimulante a recuperação dos esporos submetidos ao tratamento térmico.

A curva D foi obtida com os dados do ensaio de anaerobiose, usando-se DTA em tubos como meio de subcultura. Essa curva é similar a C, e o valor D obtido em ambos os ca-

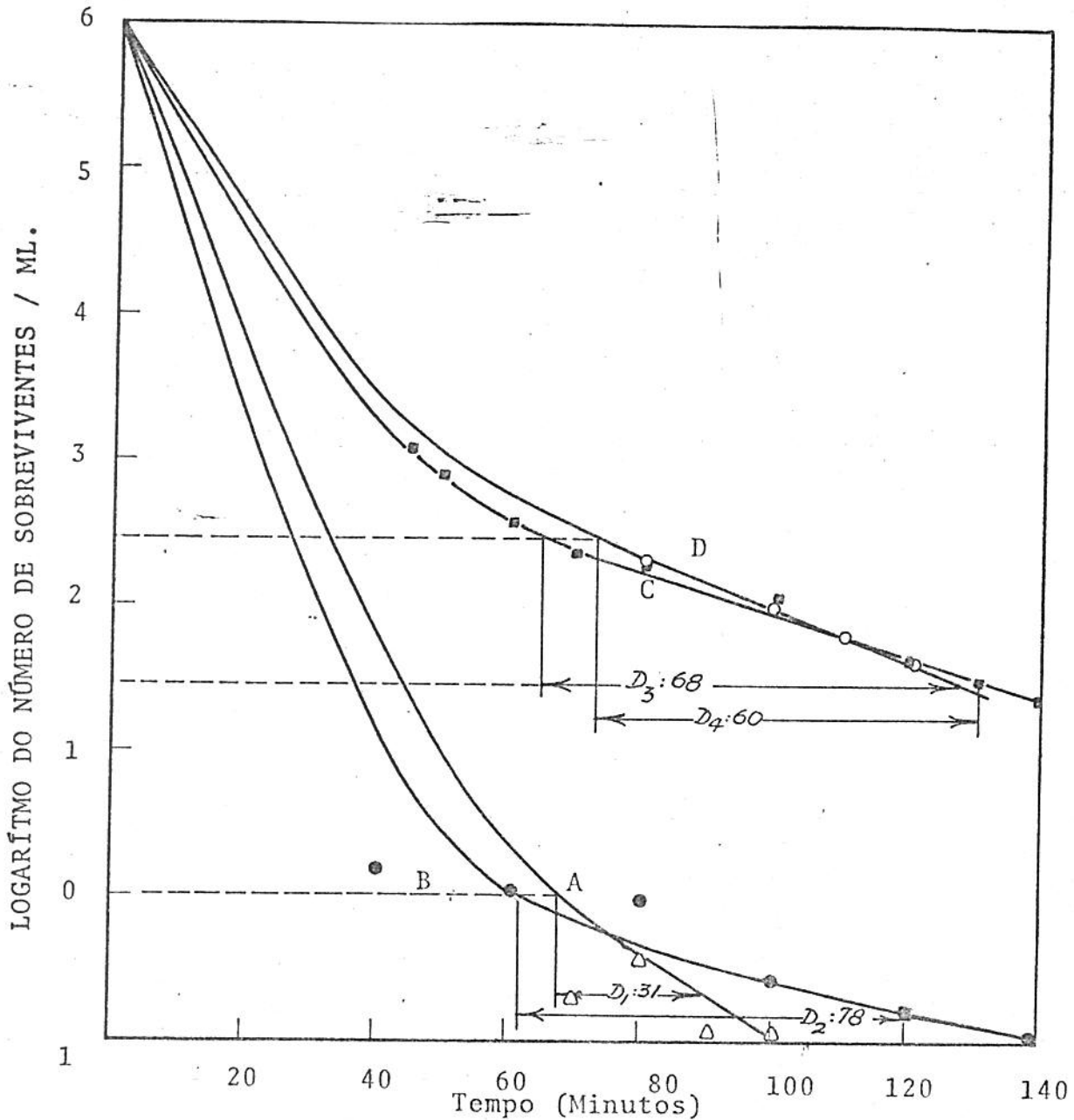


FIGURA 1. COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA APARENTE AO CALOR DOS ESPOROS DE BACILLUS COAGULANS 56-186 A AQUECIDOS A 93°C.

Condições do Ensaio:

- A (Δ) Técnica do NMP, meio de subcultura DTB; aquecimento com água destilada.
- B (\bullet) Técnica do NMP; meio de subcultura DTB; aquecimento com suco de tomate 50%.
- C (\blacksquare) Técnica da contagem: de diluição e semeadura, meio DTA; aquecimento com água destilada.
- D (\circ) Técnica de contagem direta; meio de subcultura DTA em tubos.

sof foi bastante próximo sugerindo que os valores D obtidos com meio DTA em tubos e em placas, apesar de corresponderem a resistência aparente dos esporos, poderiam estar mais próximos do valor real.

A curva B representa a destruição térmica em suspensão de esporos em suco de tomate 1:1 determinada por NMP. O valor D de 78 minutos é muito superior ao correspondente D de 31 minutos obtido em suspensão aquosa pela mesma técnica. Este incremento na resistência seria provavelmente produzido pelos açúcares, sais e nutrientes presentes no meio de aquecimento (suco de tomate). Altas concentrações de açúcares tendem a aumentar a resistência térmica. Anderson e outros (1949) encontraram que, ao adicionar sacarose e glicose (50%), aumentou a resistência térmica de B. thermoacidurans. Em resumo pode-se afirmar que a deficiência na recuperação de sobreviventes apresentada pelo meio DTB é vencida quando se usa suco de tomate a concentração natural como meio de aquecimento.

3.- Efeito do Ágar na Recuperação de Esporos.

Tomando em conta que a presença de ágar no meio DTA produz contagens mais altas de esporos ativados em comparação com os obtidos com meio DTB, foi adicionado ágar a este último meio, em diferentes porcentagens; desde 0,0 a 2,0%; os resultados destas experiências são mostrados nas tabelas 4 e 5.

TABELA 4: Efeito da adição de 1,5% de ágar no meio de subcultura, técnica do NMP. Meio de aquecimento = água destilada; diluição da suspensão original = 10^{-9} . Resultados em número de tubos positivos - dos 10 tubos incubados para cada tempo de ativação a 80°C .

| Tempo de ativação (min.) | Meio DTB (da Tab. 3) | Meio DTB+1,5% agar | |
|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------|
| | | 1 ^a | 2 ^a |
| 10 | 0 | 3 | 0 |
| 20 | 0 | 4 | 1 |
| 30 | 0 | 4 | 3 |
| 40 | 1 | 5 | 5 |
| 50 | 1 | 3 | 3 |
| 60 | 1 | 0 | 1 |
| Média da contagem a 40 minutos | $0,1 \times 10^9/\text{ml}$ | $0,69 \times 10^9/\text{ml}$ | |

TABELA 5. Efeito da concentração de ágar no meio de subcultura.

Diluição da suspensão original = 10^{-9} ;
 meio de aquecimento = água destilada.
 Resultados em número de tubos positivos dos 10 tubos inoculados para cada tempo de ativação a 80°C .

| Tempo de ativação (min.) | Porcentagem de ágar adicionado | | | | | | |
|-----------------------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0,0 | 0,1 | 0,3 | 0,6 | 1,0 | 1,5 | 2,0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 40 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 5 | 2 |
| 50 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 |
| 60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 |

Na tabela 4, o número de tubos positivos obtidos em meio DTB é comparado com o número correspondente ao meio DTB+1,5% de ágar. A média da contagem obtida para DTB + 1,5% ágar a 40 minutos foi aproximadamente 7 vezes maior que a correspondente ao meio sem ágar.

Na tabela 5 pode-se observar que até 0,3% o efeito do ágar adicionado sobre o número de tubos positivos foi nulo. A partir de 0,6% e até 1,5%, o número de tubos positivos acompanhou o aumento da porcentagem de ágar adicionado. Isso indicou uma ação estimulante do ágar sobre a contagem de esporos, que foi máxima na porcentagem de 1,5%. Com 2% de ágar, registrou-se um decréscimo do número de tubos positivos.

4.- Efeito da Adição de substâncias Quelantes, adsorventes e Derivados de ágar.

O efeito no aumento do número de tubos positivos pela adição de amido de batata, EDTA, extrato solúvel de ágar, extrato solúvel calcinado de ágar e ágar lavado ao meio DTB, na contagem de esporos ativados, obtida por NMP, pode ser apreciado na Tabela 6. O efeito do amido como adsorvente de substâncias inibidoras da germinação, adicionado nas proporções indicadas por Olsen & Scott (1946) foi nulo. Também o quelante ácido etileno diamino tetracético (EDTA), teve um efeito nulo na faixa de concentração usada por Riemann (1963) de 10 - 80ppm. Cabe ressaltar que estas concentrações não foram consideradas inibidoras do crescimento pós-germinativo por esse autor.

Estes resultados indicaram que a possibilidade da existência de substâncias inibidoras no meio que pudessem ser removidas é bastante remota. Daí tentou-se determinar a presença no ágar de algum agente ou agentes estimulantes, que atuassem favorecendo o incremento da contagem de esporos ativados. O ágar foi portanto, adicionado em diferentes formas para eliminar certos componentes e favorecer a ação dos outros.

Como pode-se ver na Tabela 6, o meio DTB ao qual foi adicionado extrato solúvel de ágar equivalente a 1,5% forneceu a contagem obtida a 40 minutos aproximadamente igual à obtida com meio DTA por semeadura em placas. Isso indica que o agente ou agentes estimulantes presentes no ágar, estariam na fração solúvel do mesmo.

Evancho e outros (1974) relataram que as contagens realizadas em caldo de bromocresol preparado com a água de lavagem de ágar aproximavam-se as contagens obtidas em bromocresol ágar. Para verificar se o efeito estimulante provocado pela fração solúvel do ágar, era devido a sais inorgânicos do mesmo, adicionou-se extrato solúvel calcinado de ágar em quantidade equivalente a 1,5%. Como pode-se observar na Tabela 6, o efeito foi nulo. Mas este resultado

TABELA 6. Efeito da adição de amido de batata, ácido etileno diamino tetra-cético (EDTA), extrato solúvel calcinado de ágar equivalente a 1,5%), extrato solúvel de ágar obtido por filtração (equivalente a 1,5%), e ágar nobre lavado (1,5%), ao meio DTB para subcultura de esporos de Bacillus coagulans 56-186A ativados a 80°C em água destilada. Resultado em número de tubos positivos dos 10 inoculados para cada tempo. Diluição da suspensão $LI = 10^{-9}$.

| Tempo de ativação (min.) | Amido adicionado- 0,1% | 0,5% | EDTA adicionado- 10-80 ppm | Extrato solúvel calcinado de ágar (equivalente a 1,5%) | Extrato solúvel de ágar* (equiv. a 1,5%) | Ágar nobre lavado (1,5) |
|--------------------------------|------------------------------|------|----------------------------------|--|--|----------------------------------|
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 |
| 40 | 1 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 |
| 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 60 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |

* NMP calculado pela equação de Halvorson e Ziegler (1932) = $1,1 \times 10^9$ esporos/ml

é questionável, devido a possível oxidação e/ou volatilização dos sais de ágar durante a calcinação, e problema de solubilização do resíduo calcinado ao ser adicionado ao meio (Thiers, 1957). A possível ação das macromoléculas componentes do ágar, também foi estudada, adicionando-se ao meio DTB 1,5% de ágar "Nobre" lavado, não se registrando nenhum aumento na contagem de esporos ativados.

5.- Agente Estimulante no Aumento da Contagem.

Uma vez estabelecido que o agente ou os agentes estimulantes provinham da fração solúvel do ágar, tentou-se identificá-los adicionando-se individualmente ao meio DTB , iônios e testando o seu efeito sobre a contagem de esporos ativados. Os resultados destes testes são mostrados na Tabela 7.

TABELA 7. Efeito da adição de cátions e aniônios ao meio DTB para subcultura de esporos de Bacillus coagulans 56-186A ativados a 80°C em água destilada. Resultados apresentados em número de tubos positivos em 10 tubos inoculados com suspensão LI diluída 9 vezes.

| Iônios | Concentração equivalente (ppm) | Tempo de ativação (min.) | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|----|----|----|----|----|
| | | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| Ca ⁺⁺ | 1300 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ba ⁺⁺ | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SO ₄ ⁼ | 25.400 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mg ⁺⁺ | 500 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Zn ⁺⁺ | 10 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Cu ⁺⁺ | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mn ⁺⁺ | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pb ⁺⁺ | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cr ⁺⁶ | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fe ⁺⁺ (a) | 5,0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | 1 |
| Fe ⁺⁺ (b) | 5,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fe ⁺⁺⁺ | 5,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

(a) adicionado como FeSO₄·7H₂O

(b) adicionado como FeCl₂·4H₂O

De todos os iônios testados, apenas o Fe^{++} adicionado na forma de sulfato, apresentou um efeito estimulante. O mesmo catiônio testado como cloreto não apresentou efeito nenhum, do mesmo modo que o cloreto férrico. Dos outros iônios apenas o Zn^{++} produziu algum estímulo, mais foi praticamente desprezível. O mecanismo de ação do Fe^{++} é desconhecido, é provável que sua ação fosse vencer a inibição produzida por outros agentes que não puderam ser retirados do meio com amido ou EDTA. Wang & Newton (1969) relataram que certos microrganismos necessitam de altas concentrações de ferro, para vencer a inibição do crescimento produzida por altas concentrações de Cr^{++} , Co^{+++} e Al^{+++} , presentes no meio de crescimento. Davis e outros (1971) registraram inibição causada por Al^{+++} ao crescimento de Bacillus megaterium SK-300 e Sk-11 que foi vencida pelo incremento da concentração de Fe^{++} de 5 a 25 vezes, respectivamente a quantidade existente no meio. Estes mesmos autores indicaram que os iônios mencionados podem interferir diretamente com o transporte ou assimilação intracelular do Fe^{++} , mediante copolimerização e/ou coprecipitação.

Uma outra possibilidade seria que o agente ou agentes inibidores estivessem ligados ao ferro do meio DTB, impedindo desta forma seu aproveitamento pela bactéria. Uma adição da pequena quantidade de ferro fornecida pelo extrato solúvel de ágar seria suficiente para cobrir as necessidades metabólicas da bactéria e vencer a inibição. Ashton e outros (1968) relataram uma inibição deste tipo em B. stearothermophilus, causada por caseína ligando o ferro disponível do meio e causando deficiências que produziam inibição da germinação e crescimento vegetativo. Quando Fe^{++} , Fe^{+++} , Ca^{++} e Mg^{++} eram separadamente adicionados, o crescimento produzia-se normalmente.

Esta possível ligação do inibidor com o ferro do meio explicaria o fato de que o suco de tomate quando usado como meio de aquecimento elimina a deficiência do meio DTB sobre a recuperação, já que, além de fornecer excesso de ferro, o suco de tomate, estaria diminuindo o pH, o que, junto

com o tratamento térmico elevado poderiam facilitar a ruptura da ligação inibidor-ferro deixando este último livre para ser utilizado pela bactéria.

A Tabela 8 mostra o efeito da variação da concentração de Fe^{++} adicionada ao meio DTB sobre o número de tubos positivos obtidos na contagem de esporos ativados. A 5 ppm, que é a proporção em que o ferro está presente no ágar, registrou-se maior número de tubos positivos, em comparação com os valores obtidos para 10, 20 e 100 ppm.

TABELA 8. Efeito da concentração de Fe^{++} no meio de subcultura DTB sobre a contagem de esporos de Bacillus coagulans 56-186A ativados a $80^{\circ}C$ em água destilada. Resultados apresentados em número de tubos positivos em 10 tubos inoculados - com suspensão LI diluída 9 vezes.

| Tempo de ativação (min.) | Concentração de $FeSO_4$ equivalente (ppm) | | | | |
|--------------------------|--|---|----|----|-----|
| | 0 | 5 | 10 | 20 | 100 |
| 10 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 40 | 0 | 3 | 2 | 1 | 1 |
| 50 | 0 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 60 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |

O efeito estimulante do sulfato ferroso não foi tão marcante quanto ao extrato solúvel de ágar. É provável que

além do sulfato ferroso, existam no extrato solúvel outros componentes e/ou elementos estimulantes. Essa hipótese é bastante aceitável porque as combinações de compostos que podem existir no ágar são muitas, e neste estudo, não foram testadas todas as possibilidades deixando esse campo aberto para novas investigações. Ademais, poder-se-ia testar os mesmos elementos com base em outros aniônios; neste estudo a maioria deles foi adicionada como sulfato.

6.- Efeito dos Iônios na Germinação e Crescimento Pós-germinativo.

Um meio de avaliar a ativação, de acordo com Cochran & Ordal (1973) é testar as respostas de germinação dos esporos no meio de subcultura usado. Para determinar o efeito do Fe^{++} e o extrato solúvel de ágar sobre a germinação, foram feitos testes de germinação de esporos com os seguintes meios: DTB, DTB + extrato solúvel de ágar equivalente a 1,5% e DTB + Fe^{++} equivalente a 5 ppm.

Os resultados são mostrados na Tabela 9 e nas Figuras 2 e 3. A Tabela 9 apresenta as porcentagens de germinação dos tres meios calculados pelo método de perda de resistência térmica. Em geral, as porcentagens de germinação vão aumentando em função do tempo de incubação nos meios testados. Em todos os casos, após 2 horas de incubação no meio, mais de 30% dos esporos haviam germinado, e depois de 10 horas mais de 90%. A habilidade dos meios para permitir a germinação dos esporos determinada pelas porcentagens obtidas foi semelhante para os tres meios. Aparentemente a deficiência na recuperação de sobreviventes apresentada pelo meio DTB não é devido a germinação, e o sulfato ferroso e o extrato solúvel de ágar não estimulam a germinação.

TABELA 9. Porcentagens de germinação dos esporos de Bacillus coagulans 56-186A, ativa - dos a 80°C por 40 minutos, utilizando diferentes meios de subcultura. Dados obtidos pelo método da perda da resistência térmica usando choque térmico - de 80°C por 15 minutos. Meio de contagem de sobreviventes: DTA incubando a 55°C por 72 horas.

| Tempo de incubação (horas) | População antes do choque térmico | População após choque térmico | % de esporos germinados |
|---|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| <u>Meio DTB</u> | | | |
| 2 | 6,4 x 10 ⁷ | 3,1 x 10 ⁷ | 52 |
| 5 | 7,1 x 10 ⁷ | 1,1 x 10 ⁷ | 84 |
| 10 | 18 x 10 ⁷ | 0,22 x 10 ⁷ | 99 |
| <u>Meio DTB + Extrato solúvel de ágar equivalente a 1,5%</u> | | | |
| 2 | 6,5 x 10 ⁷ | 2,5 x 10 ⁷ | 62 |
| 5 | 3,4 x 10 ⁷ | 1,1 x 10 ⁷ | 68 |
| 10 | 6,8 x 10 ⁷ | 0,40 x 10 ⁷ | 94 |
| <u>Meio DTB + Fe⁺⁺ equivalente a 5 ppm no ágar</u> | | | |
| 2 | 1,6 x 10 ⁷ | 1,1 x 10 ⁷ | 33 |
| 5 | 2,0 x 10 ⁷ | 0,85 x 10 ⁷ | 58 |
| 10 | 7,7 x 10 ⁷ | 0,50 x 10 ⁷ | 94 |

A Figura 2 apresenta as curvas de decréscimo da absorvância em função do tempo de incubação para cada um dos tres meios testados. O decréscimo da absorvância, chega até 31% da absorvância inicial. As curvas obtidas para os tres meios são típicas de germinação, medida pelo declínio da absorvância. Gráficos similares foram obtidos por Bell & Parker (1975) e Prentice & Clegg (1974) para B.subtilis e Allan (1975) para B.cereus. Na figura observa-se que inicialmente produz-se um declínio rápido da absorvância, a seguir sobrevém uma fase estacionária que dura de 4 a 7 horas de acôrdo com o meio e logo um decréscimo pronunciado.

Similarmente aos resultados da Tabela 9, o comportamento dos tres meios foi semelhante quanto a germinação, destacando-se apenas o fato de que a fase estacionária observada na curva corresponde ao meio DTB (curva A) foi menor que para os outros meios. Porém, ao final da curva tende a um valor constante superior ao dos outros meios.

Na Figura 3 estão representadas as curvas de porcentagens de germinação x tempo obtido pelo método de perda de refractibilidade observada com microscópio de fase, para os tres meios. O comportamento dos meios foi similar, porém, o meio DTB + Fe^{++} equivalente a 5 ppm partiu de um valor inicial inferior ao dos outros meios, mantendo-se assim durante o intervalo de 10 horas. Apenas ao fim da 10^a hora, apresentou as mesmas porcentagens dos outros meios.

Os tres métodos apresentaram resultados concordes entre si. No entanto, não há entre eles uma correspondência direta, visto que cada um deles se baseia na determinação de características diferentes, assim, o método de decréscimo da absorvância mede mudanças da suspensão germinante, como um todo, enquanto que os outros dois métodos baseiam-se na medida das mudanças dos esporos como indivíduos (Levinson & Hyatt, 1966). Além disso, o método da perda da refractibilidade introduz um fator subjetivo (Uehara & Frank, 1967). Pode-se afirmar, a partir de todos os resultados obtidos nos ensaios sobre germinação, que a deficiência do meio DTB não afeta a germinação dos esporos e

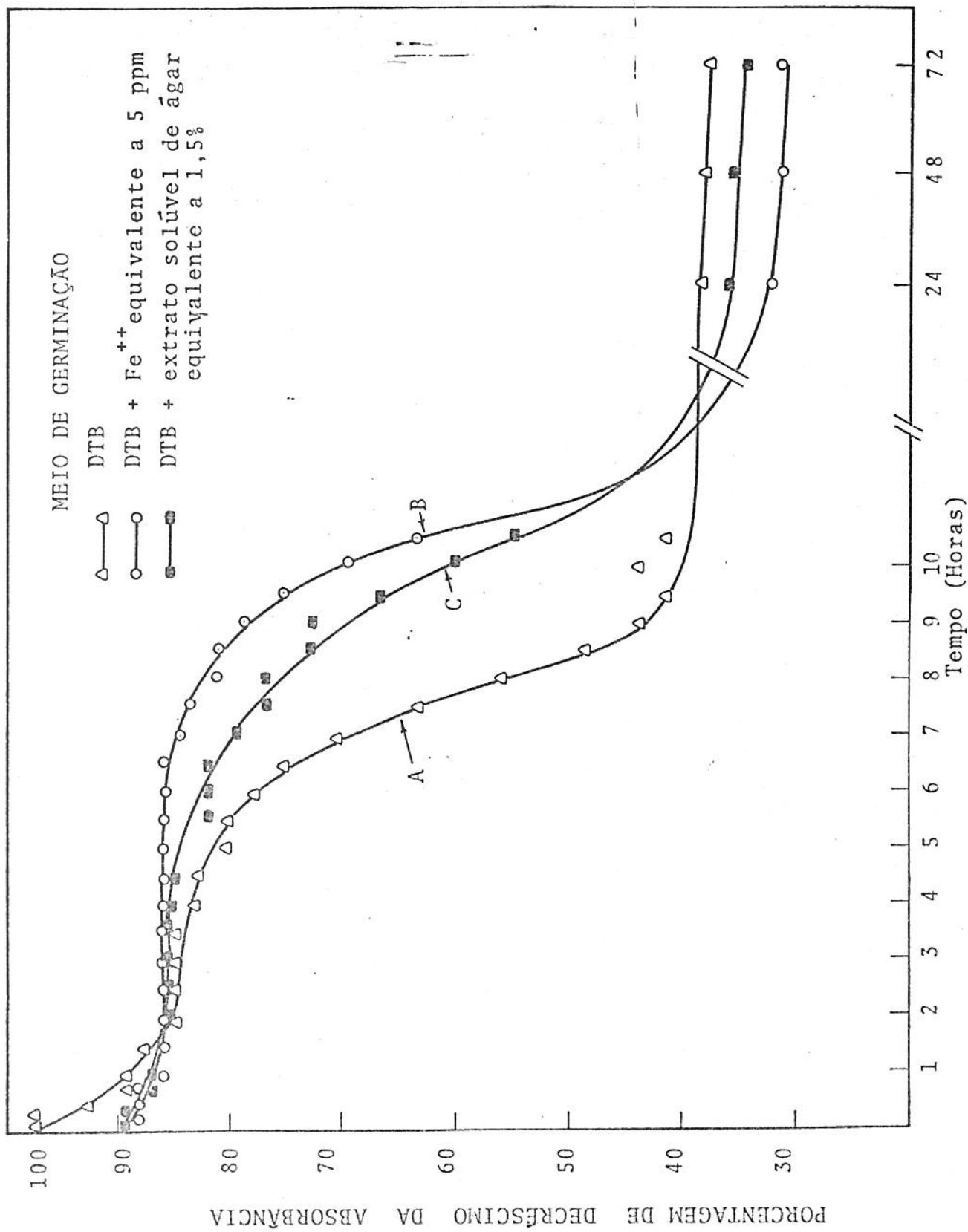


FIGURA 2. CURVAS DE PORCENTAGEM DE DECRÉSCIMO DA ABSORBÂNCIA X TEMPO.

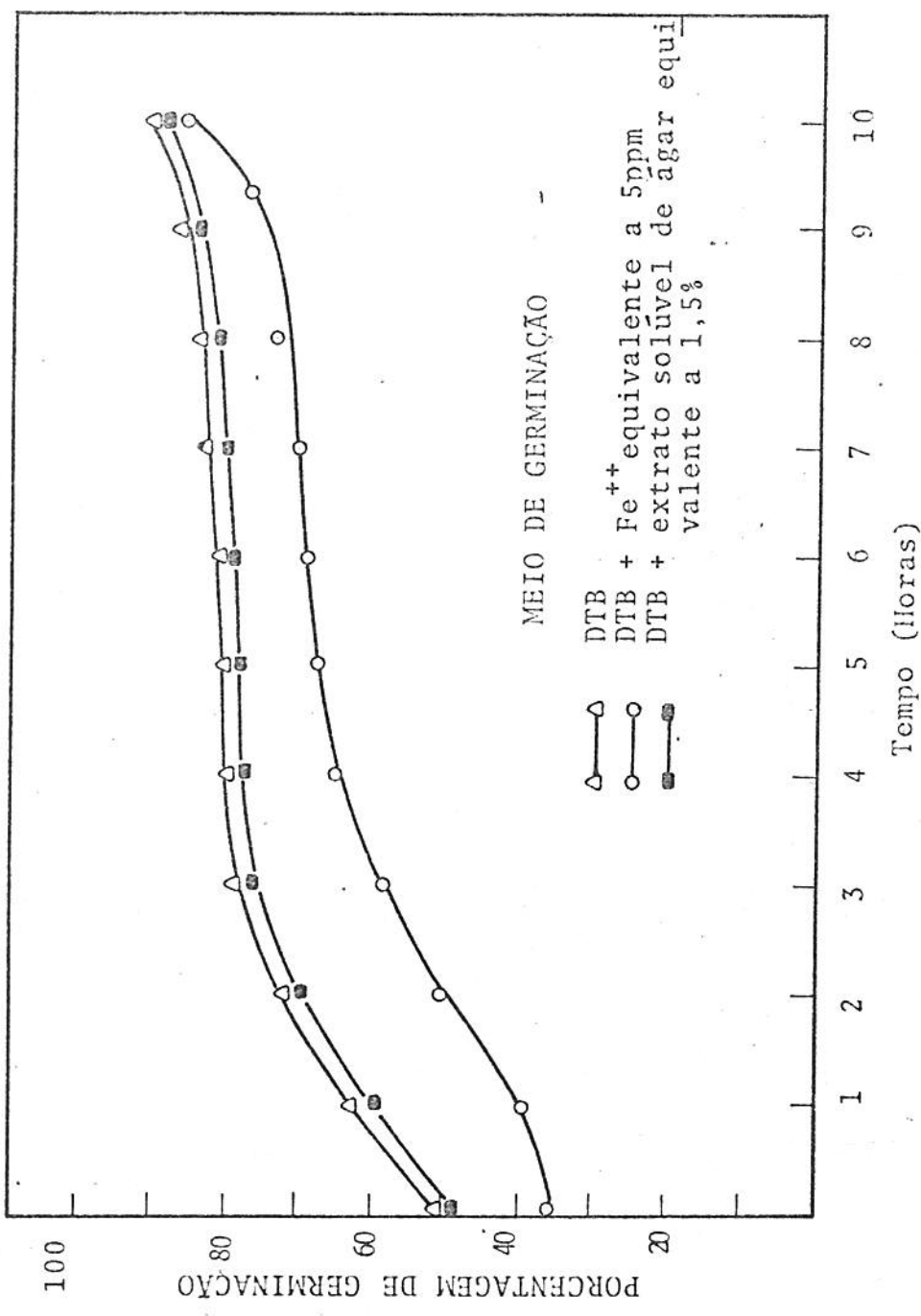


FIGURA 3. CURVAS DE PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO X TEMPO. MÉTODO DE PERDA DA REFRACTIBILIDADE OBSERVADA COM MICROSCÓPIO DE FASE.

que os meios com ferro e com extrato solúvel de ágar não estimulam a germinação.

De acôrdo com Labbe & Duncan (1970) o cresci -
mento pós-germinativo dos esporos pode ser determinado pelo
aumento da absorbância-subsequente ao decrêscimo inicial da
mesma, devido a germinação. A Figura 4 apresenta as curvas
de absorbância versus tempo após germinação prolongado a
144 horas nos meios DTB, DTB + extrato solúvel de ágar equi
valente a 1,5% e DTB + Fe⁺⁺ equivalente a 5 ppm no ágar,

Pode-se apreciar que, para o meio DTB a absor-
bância manteve-se em um valor aproximadamente constante ,
durante todo o tempo, enquanto que para os outros dois meios,
a partir das 72 horas de incubação, iniciou-se um aumento -
da absorbância o que indica crescimento pós-germinativo. Con
clui-se daí que, o efeito estimulante dos meios com Fe⁺⁺ e
com extrato solúvel de ágar ocorre no crescimento pós-germi
nativo. Campbell (1957) demonstrou que certos esporos podem
germinar em condições inadequadas para o crescimento pós-ger
minativo. É provável que isto seja o que ocorre no nosso ca
so. Prentice & Cleg (1974) indicaram que por ser o crescimen
to pós-germinativo um processo mais complexo que a germina
ção, e de caráter mais biosintético que degradativo é mais
susceptível de ser afetado por fatores ambientais. Não exis
tem referências sobre a ação e o mecanismo do Fe⁺⁺ no cres
cimento pós-germinativo de esporos de B.coagulans e as in
vestigações neste campo ainda são escassas.

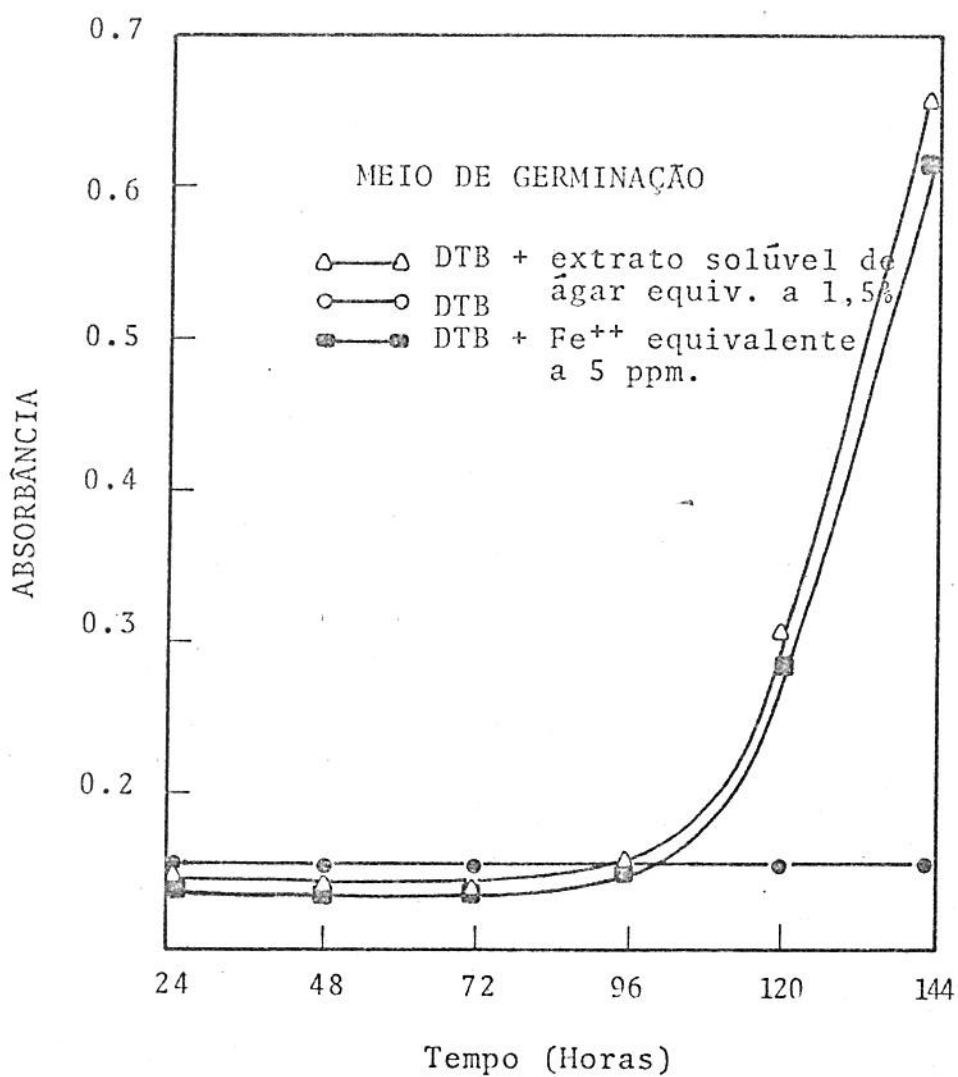


FIGURA 4. CURVAS DE ABSORBÂNCIA X TEMPO, APÓS GERMINAÇÃO.

B I B L I O G R A F I A

- Alderton, G.P.; Thompson, T.A. & Snell, N. 1964. Heat adaptation and ions exchange in Bacillus megaterium spores. *Sci.* 143: 141-143.
- Allan, A.J. 1975. Germination of Bacillus cereus endospores: A proposed roll for heat shock and nucleosides. *Can. J. Microbiol.* 21: 1192-1197.
- Anderson, E.E.; Esselen, W.B. & Fellers, C.R. 1949. Effect of acids, salts, sugar and other food ingredients on thermal resistance of Bacillus thermoacidurans. *Food Res.* 14: 499-510.
- APHA. 1966. "Recommended methods for the microbiological examination of foods". Ed. Scharf, J.M., 2da.ed. American Public Health Association, Inc.
- Ashton, D.H.; Busta, F.F. & Warren, J.A. 1968. Relief of casein inhibition of Bacillus stearothermophilus by iron, calcium and magnesium. *Appl. Microbiol.* 4: 628-635.
- Bell, N.D.S. & Parker, M.S. 1975. The effect of sporulation temperature on the resistance of Bacillus subtilis to a chemical inhibitor. *J. Appl. Bacteriol.* 38: 295-299.
- Boballius, A. & Zacharias, B. 1971. Variation in the metal content of some commercial media and their effect on microbial growth. *Appl. Microbiol.* 22: 260-262.
- Brown, W.L. 1956. In "Germination of Bacterial Spores with chelators" Riemann, H. 1963. Ph.D. Thesis, Universidade de Copenhagen, Dinamarca.
- Brown, M.R.W. & Melling, J. 1971. Inhibition and destruction of microorganism by heat. In "Inhibition and destruction of the microbial cell. Ed. Hugo, W.D. Academic Press, New York, N.Y., U.S.A.

- Busta, F.F. & Adams, D.M. 1972. Identification of a germination system on Bacillus subtilis spores affected by heat. Appl. Microbiol. 24: 412-417.
- Campbell, L.L.Jr. 1957. Bacterial spore germination definition and methods of study. In "Spores", Ed. Halvorson, H.O., Am. Inst. Biol. Sci. Washington, D.C., U.S.A. p. 33-41.
- Cohran, S.A. & Ordal, Z.J. 1973. Oxidate activation of Bacillus cereus spores. Appl. Microbiol. 25: 173-179.
- Cook, A.M. & Brown, M.R.W. 1964. The relation between heat activation and colony formation for the spores of Bacillus stearothermophilus. J. Pharm. Pharmacol. 16: 725-732.
- Curran, H.R. & Evans, F.R. 1945. Heat activation inducing germination in spores of thermotolerant and thermophilic aerobic bacteria. J. Bacteriol. 49: 335-346.
- Davis, W.B.; McCauley, M.J. & Byers, B.R. 1971. Iron requirement and aluminum sensitivity of and hydroxaminoacid requiring strain of Bacillus megaterium. J. Bacteriol. 105: 589.
- Desrosier, N.W. & Heiligman, F. 1956. Heat activation of bacterial spores. Food Res. 21: 54-62.
- Doi, R. 1961. Control of the metabolical activity and its relationship with breaking the dormant state. In "Spores II". Ed. Halvorson, H.O. Minneapolis, Minnesota, U.S.A. p. 237-254.
- Duncan, C.L. & Foster, E.M. 1968. Effect of sodium nitrite, sodium chloride and sodium nitrate on germination and outgrowth of anaerobic spores. Appl. Microbiol. 16: 406-411.
- El-Bisi, H.M.; Lechowich, R.V.; Amaha, M. & Ordal, Z.J. 1962. Chemical events during death of bacterial endospores by moist heat. J. Food Sci. 27: 219-231.
- Ernst, R.R. 1968. In "Desinfection, sterilization and preservation". Ed. Lawrence, O.A. Block, A.S. Philadelphia, U.S.A. p. 703-740.

- Evancho, G.M.; Hashton, D. & Carson, L.M. 1974. Effect of calcium supplementation of bromocresol purple broth on recovery counts of Bacillus stearothermophilus. J. Food Sci. 39: 1161-1162.
- Fields, M.L. 1975. "Método de estudo das bactérias termófilas esporulantes". Trad. Yokoya, F. & Canhos, V.P. Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos. Campinas, Brasil. p. 35-93.
- Fields, M.L.; Chen Lee, P.P. & Wang, D. 1974. Relationship of soils constituents to spore counts and heat resistance of Bacillus stearothermophilus. Can. J. Microbiol. 20: 1625-1631.
- Fields, M.L. & Findley, N. 1962. Studies on heat responses of bacterial spores causing flat sour spoilage in canned food III: Effect of storage time on activation and thermal destruction responses. University of Missouri, Coll. Agr. Res. Bull. 8071962 p. 1-12.
- Foerster, H.F. & Foster, J.W. 1966. Response of Bacillus spores to combination of germinative compounds. J. Bacteriol. 91: 1168-1177.
- Frank, H.A. 1955. The influence of cationic environments on the thermal resistance of Bacillus coagulans. Food Res. 20: 315-321.
- Fujioka, R.S. & Frank, H.A. 1966. Nutritional requirement for germination, outgrowth and vegetative growth of P.A. 3679 in a chemically defined medium. J. Bacteriol. 92: 1515-1520.
- Gollakota, K.M.G. & Halvorson, H.O. 1960. Biochemical changes occurring during sporulation of Bacillus cereus. J. Bacteriol. 79: 1.
- Gould, G.W. 1971. Methods for studying bacterial spores. In "Methods in Microbiology". Norris, J.R. Ribbons, D.W., Academic Press, New York, N.Y., U.S.A. 6A: 325-381.
- Gould, G.W. & Hitchins, A.A. 1963. Sensitization of bacterial

- spores to lisozyme and hydrogen peroxide with agents which ruptured disulfide bonds S.J. Gen. Microbiol. 33: 413-423.
- Grelet, N. 1957. Growth limitation and sporulation. J. Appl. Bacteriol. 20: 315.
- Halvorson, H.O. 1958. In "Germination of bacterial spores with chelators". Riemann, H. 1963. Ph.D. Thesis Universidade de Copenhagen, Dinamarca. p. 34.
- Halvorson, H.O. & Howitt, C. 1961. The role of DPA in bacterial spores. In "Spores II". Ed. Halvorson, H. O. Minneapolis, Minnesota, U.S.A. p. 149-254.
- Halvorson, H.O.; Vary, J.C. & Steinberg, W. 1966. Developmental changes during the formation and breaking of the dormant state in bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 20: 169-188.
- Halvorson, H.O. & Zeigler, N.R. 1932. Application of statistic in bacteriology. J. Bacteriol. 25: 101.
- Harris, N.D. 1963. J. Appl. Bacteriol. 26: 387-397.
- Hashimoto, T. & Conti, S.F. 1971. Ultra structural changes associated with activation and germination of Bacillus cereus T spores. J. Bacteriol. 105: 361-368.
- Hills, G.M. 1949. Chemical factors on the germination of spore bearing aerobes. The effect of yeast extract on the germination of Bacillus anthracis and its replacement by adenosina. Biochem. J. 45: 353-362.
- Hsieh, W.T. 1960. Changes in chemical composition and heat resistance of spores of Bacillus coagulans due to pré-germination. M.S. Thesis. University of Illinois Urbana, Illinois, U.S.A.
- Hunnell, J.W. & Ordal, Z.J. 1961. Cytological and chemical changes in heat killed and germinated bacterial spores. In "Spores II". Ed. Halvorson, H.O. Minneapolis, Minnesota, U.S.A. p. 101-112.
- Humphrey, A.E. & Nickerson, J.T.R. 1961. Testing thermal death

- rate for significant non logarithmic behaviour. Appl. Microbiol. 9: 282-286.
- Hyatt, M.T. & Levinson, H.S. 1957. Sulfur requirement for post-germinative development of Bacillus megaterium spores. J. Bacteriol. 74: 87-93.
- Keynan, A; Evenchik, Z.; Halvorson, H.O. & Hasting, J.W. 1964. Activation of bacterial endospores. J. Bacteriol. 88: 313-318.
- Keynan, A. & Halvorson, H.O. 1965. Transformation of a dormant spore into a vegetative cell. In "Spores III". Ed. Campbell, L.L. & Halvorson, H.O. Am. Soc. Microbiol. Ann Arbor, Michigan, U.S.A. p. 174-179.
- Keynan, A; Issahary-Brand, G. & Evenchik, Z. 1965. Activation of Bacterial spores. In "Spores III". Ed. Campbell, L.L. & Halvorson, H.O. Am. Soc. Microbiol. Ann Arbor, Michigan, U.S.A. p. 180-187.
- Kobayashi, Y.; Steinberg, W.; Higa, A.; Halvorson, H. O & Levinthal, C. 1965. Sequential synthesis of macromolecules during outgrowth of bacterial spores. In "Spores III". Ed. Campbell, L.L. & Halvorson, H.O. Am. Soc. Microbiol. Ann Arbor, Michigan, U.S.A. p. 200-212.
- Labbe, R.G. & Duncan, C.L. 1970. Growth from spores of Clostridium perfringens in the presence of sodium nitrite. Appl. Microbiol. 19: 353-359.
- Lawrence, N.L. 1956. The relationship between the cleavage of purine ribosides by bacterial spore and the germination of the spores. J. Bacteriol. 70: 583-587.
- Lechowich, R.L. 1958. Studies on thermally induced changes in the bacterial endospore and on the relationship of its chemical composition to thermal resistance. Ph.D. Thesis University of Illinois, Urbana, Illinois, U.S.A.
- Levinson, H.S. & Hyatt, M.T. 1964. Effect of sporulation medium on heat resistance, chemical composition and germination of Bacillus megaterium spores. J. Bacteriol. 87: 876-886.

- Levinson, H.S. & Hyatt, M.T. 1966. Sequence of events during Bacillus megaterium spore germination. *J. Bacteriol.* 91: 1811-1818.
- Levinson, H.S. & Sevag, M.G. 1953. Stimulation of germination and respiration of spores of Bacillus megaterium by manganese and monovalent cations. *J. Gen. Physiol.* 36: 617-629.
- Lewis, L.C.; Snell, N.S. & Alderton, G. 1965. Dormancy and activation of bacterial spores. In "Spores III". Ed. Campbell, L.L. & Halvorson, H.O. Am. Soc. Microbiol. Ann Arbor, Michigan, U.S.A. p. 47-54.
- McCalla, T.M. 1940. Cation adsorption by bacteria. *J. Bacteriol.* 40: 23.
- Miller, R.J. & Davey, C.B. 1965. Influence of the microphysical structure of a system on the growth of bacteria. *Can. J. Microbiol.* 11: 761-763.
- Murrell, W.G. 1961. Spore formation and germination as a microbial reaction to the environment. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 11: 100-150.
- Murrell, W.G.; Olsen, A.W. & Scott, W.J. 1950. The enumeration of heated bacterial spores II: Experiments with Bacillus species. *Australian J. Sci. Res.* 3: 234-244.
- Murrell, W.G. & Warth, A.S. 1965. Composition and heat resistance of bacterial spores. In "Spores III". Ed. Campbell, L.L. & Halvorson, H.O. Am. Soc. Microbiol. Ann Arbor, Michigan, U.S.A. p. 1-23.
- Nelson, F.E. 1943. Factors which influence the growth of heat treated bacteria, I: A comparison of four agar media. *J. Bacteriol.* 45: 396-397.
- NCA. 1968. "Laboratory Manual for Food Canners and Processors" Vol. 1, 3rd ed., AVI Publishing Co., Westport, Conn. U.S.A.
- O'Brien, R.T. & Campbell, L.L. Jr. 1957. The nutritional requirement for germination and outgrowth of spores

- and vegetative cell growth of some aerobic spore forming bacteria. *J. Bacteriol.* 73: 522-525.
- Olsen, A.M. & Scott, W.J. 1946. Influence of starch in media used for detection of heated bacterial spore. *Nature*, 157: 337.
- Powell, E.D. 1957. The appearance of bacterial spores under phase contrast illumination. *J. Appl. Bacteriol.* 20: 342-348.
- Powell, J.F. & Hunter, J.R. 1955. Spore germination in the genus Bacillus: The modification of germination requirement as a result of pre-heating. *J. Gen. Microbiol.* 13: 59.
- Powell, J.F. & Strange, R.E. 1953. Biochemical changes occurring during germination of bacterial spores. *Biochem. J.* 54: 205-209.
- Prentice, G.A. & Clegg, L.F.L. 1974. The effect of incubation temperature on the recovery of spores of Bacillus subtilis 8057. *J. Appl. Bacteriol.* 37: 501-513.
- Riemann, H. 1963. Germination of bacterial spores with chelators. Ph.D. Thesis. Universidade de Copenhagen Dinamarca.
- Riemann, H. & Ordal, Z.J. 1961. Germination of bacterial endospores with calcium and DPA. *Sci.* 133: 1703-1704.
- Roberts, T.A. & Ingram, M. 1966. The effect of sodium chloride, potassium chloride, potassium nitrate and sodium nitrite on the recovery of heated spores. *J. Food Technol.* 1: 147-163.
- Robinow, C.F. 1960. "The bacteria : A treatise on Structure and Function. I. Structure". Academic Press, New York, N.Y., U.S.A.
- Rode, L.J. 1968. Correlation between spore structure and spore properties in Bacillus megaterium. *J. Bacteriol.* 95: 1979-1986.
- Rode, L.J. & Foster, J. W. 1960. Mechanical germination of

- Vinter, V. 1967. Developmental cycle of Sporeformers: A cellular Type of Differentiation in bacteria. *Fol. Microbiol.* 12: 89-100.
- Vinter, V., Stastná, J. & Caslavská, J. 1969. Interference of some cations and basic compounds with the germination and outgrowth of bacterial spores. In "Spores IV". Ed. Campbell, L.L., Am. Soc. Microbiol. Bethesda, Maryland, U.S.A. p. 289-297.
- Wang, C.C. & Newton, A. 1969. Iron transport in E.coli relationship between chromium sensitivity and high iron requirements in mutants of Escherichia coli. *J.Bacteriol.* 98: 1135.
- Wax, R.; Freeze, E. & Cashel, M. 1967. Separation of two functional roles of l-alanina in the initiation of Bacillus subtilis spore germination. *J.Bacteriol.* 94: 522-529.
- Williams, O.B. 1929. In "Inhibition and Destruction of the microbial cell". Ed. Hugo, W.D. Academic Press, London, England.
- Wolf, J. & Thorley, C.M. 1947. The effect of various germination agents on the spores of some strains of Bacillus subtilis. *J.Appl. Bacteriol.* 20: 384-389.
- Wynne, E.S. 1952. Some physiological aspects of bacterial spore formation and spore germination. *Bacteriol. Rev.* 16: 101-110.
- Yokoya, F. & York, G.K. 1965. Effect of several environmental condition on the thermal death rate of endospores of aerobic thermophilic bacteria. *Appl. Microbiol.* 13: 993-999.

A P Ê N D I C E N º 1

1.- COMPOSIÇÃO DOS MEIOS.

a) Meio Caldo de glicose Triptona (DTB)

| | |
|-------------|-------|
| Triptona | 10g |
| Glicose | 5g |
| Bromocresol | 0,04g |
| Água | 1 lt |
| pH final | 6,7 |

b) Meio Thermoacidurans Ágar Modificado (TAM)

| | |
|---------------------------------|------|
| Extrato de levedura | 5g |
| Proteose peptona | 5g |
| Glicose | 5g |
| K ₂ HPO ₄ | 4g |
| Agar | 20g |
| Água | 1 lt |
| MnSO ₄ | 10mg |
| pH final | 5,2 |

c) Meio de Tomate 50% (MT-50%)

| | |
|-----------------|--------|
| Triptona | 10g |
| Glicose | 5g |
| Ágar | 20g |
| Bromocresol | 0,04g |
| Água | 500 ml |
| Suco de tomate | |
| 2 x concentrado | 500 ml |

d) Meio de Tomate 10% (MT-10%)

| | |
|----------|-----|
| Triptona | 10g |
| Glicose | 5g |
| Ágar | 20g |

| | |
|-----------------|--------|
| Bromocresol | 0,04g |
| Água | 900 ml |
| Suco de tomate | |
| 2 x concentrado | 100 ml |

e) Meio Glicose triptona Ágar (DTA)

| | |
|-------------|-------|
| Triptona | 10g |
| Glicose | 5g |
| Bromocresol | 0,04g |
| Ágar | 15g |
| Água | 1 lt |
| pH final | 6,7 |

f) Meio Basal para a formulação dos meios a seguir:

| | |
|-------------|----------|
| Triptona | 10g/lt |
| Glicose | 5g/lt |
| Bromocresol | 0,04g/lt |

A estes componentes foram adicionados em cada caso os compostos que se detalham a seguir, e que caracterizam os meios.

f₁) Meio caldo de glicose triptona mais amido

| | |
|-----------------|----------------------------------|
| Amido de Batata | 5g/lt (para meio com 0,5% amido) |
| Amido de Batata | 1g/lt (para meio com 0,1% amido) |
| pH final | 6,7 |

f₂) Meio caldo de glicose triptona mais EDTA

| | |
|-----------------------------------|---|
| Ácido etileno diamino tetracético | 10, 20, 40, 60, 80 ppm (cada concentração corresponde a 1 meio) |
| pH final | 6,7 |

f₃) Meio DTB + Ca⁺⁺ equivalente a 0,13% (p/p) no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.

| | |
|--------------------------------------|--------|
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 70 ppm |
| pH final | 6,7 |

- f₄) Meio DTB + Fe⁺⁺ equivalente a 5 ppm no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.
- | | |
|--------------------------------------|----------|
| SO ₄ Fe.7H ₂ O | 0,37 ppm |
| pH final | 6,7 |
- f₅) Meio DTB + Mg⁺⁺ equivalente a 500 ppm no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.
- | | |
|--------------------------------------|--------|
| SO ₄ Mg.7H ₂ O | 75 ppm |
| pH final | 6,7 |
- f₆) Meio DTB + Zn⁺⁺ equivalente a 10 ppm no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.
- | | |
|--------------------------------------|----------|
| SO ₄ Zn.5H ₂ O | 0,65 ppm |
| pH final | 6,7 |
- f₇) Meio DTB + Cu⁺⁺ equivalente a 1,5 ppm no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.
- | | |
|--------------------------------------|----------|
| SO ₄ Cu.5H ₂ O | 0,08 ppm |
| pH final | 6,7 |
- f₈) Meio DTB + Mn⁺⁺ equivalente a 0,5 ppm no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.
- | | |
|--------------------|----------|
| SO ₄ Mn | 0,02 ppm |
| pH final | 6,7 |
- f₉) Meio DTB + Pb⁺⁺ equivalente a 0,5 ppm no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.
- | | |
|--|----------|
| Pb (CH ₃ COO) ₂ .3H ₂ O | 0,01 ppm |
| pH final | 6,7 |
- f₁₀) Meio DTB + Ba⁺⁺ equivalente a 0,01% (p/p), no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.
- | | |
|--------------------------------------|---------|
| BaCl ₂ .2H ₂ O | 2,6 ppm |
| pH final | 6,7 |

- f₁₁) Meio DTB + Fe⁺⁺⁺ equivalente a 5 ppm no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.
- | | |
|--------------------------------------|---------|
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0,3 ppm |
| pH final | 6,7 |
- f₁₂) Meio DTB + Cr⁺⁶ equivalente a 0,1 ppm no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.
- | | |
|------------------|----------|
| CrO ₃ | 0,02 ppm |
| pH final | 6,7 |
- f₁₃) Meio DTB + SO₄⁼ equivalente a 2,54% (p/p) no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.
- | | |
|--------------------|---------|
| SO ₄ Mn | 800 ppm |
| pH final | 6,7 |
- f₁₄) Meio DTB + Fe⁺⁺ equivalente a 5 ppm no ágar, em uma solução ao 1,5% (p/v) de ágar.
- | | |
|---------------------------------------|----------|
| Fe Cl ₂ ·4H ₂ O | 0,26 ppm |
| pH final | 6,7 |
- f₁₅) Meio DTB + extrato solúvel de ágar.
- | | |
|---|------|
| Solução de extrato solúvel de ágar equivalente a 1,5% | 1 lt |
| pH final | 6,7 |
- f₁₆) Meio DTB + extrato solúvel calcinado de ágar equivalente a 1,5%
- | | |
|---|------|
| Solução de extrato solúvel calcinado de ágar equivalente a 1,5% | 1 lt |
| pH final | 6,7 |
- f₁₇) Meio DTB + ágar nobre lavado
- | | |
|--------------------------------------|------|
| Solução de 1,5% de ágar nobre lavado | 1 lt |
| pH final | 6,7 |

